

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO

DAYANNA JOYCE MARQUES QUEIROZ

**HIPOVITAMINOSE D EM PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA: PREVALÊNCIA
E INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO BsmI (rs 1544410) DO GENE VDR NA
SUPLEMENTAÇÃO COM VITAMINA D SOBRE MARCADORES DE PROCESSO
INFLAMATÓRIO E ESTRESSE OXIDATIVO**

João Pessoa

2021

DAYANNA JOYCE MARQUES QUEIROZ

**HIPOVITAMINOSE D EM PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA: PREVALÊNCIA
E INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO BsmI (rs 1544410) DO GENE VDR NA
SUPLEMENTAÇÃO COM VITAMINA D SOBRE MARCADORES DE PROCESSO
INFLAMATÓRIO E ESTRESSE OXIDATIVO**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em
Ciência da Nutrição do Centro de Ciência da Saúde,
Universidade Federal da Paraíba, como requisito para
obtenção do título de Doutor em Ciências da Nutrição.

Orientadora: Dra. Maria da Conceição Rodrigues Gonçalves

João Pessoa

2021

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

Q3h Queiroz, Dayanna Joyce Marques.

Hipovitaminose D em pacientes com fibrose cística : prevalência e influência do polimorfismo BsmI (rs 1544410) do gene VDR na suplementação com vitamina D sobre marcadores de processo inflamatório e estresse oxidativo / Dayanna Joyce Marques Queiroz. - João Pessoa, 2021.

127 f. : il.

Orientação: Maria da Conceição Rodrigues Gonçalves.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCE.

1. Vitamina D. 2. Hipovitaminose D. 3. Polimorfismo genético. 4. Fibrose cística. 5. Inflamação. I. Gonçalves, Maria da Conceição Rodrigues. II. Título.

UFPB/BC

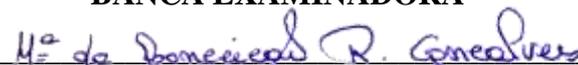
CDU 577.161.2(043)

DAYANNA JOYCE MARQUES QUEIROZ

**HIPOVITAMINOSE D EM PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA: PREVALÊNCIA
E INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO BsmI (rs 1544410) DO GENE VDR NA
SUPLEMENTAÇÃO COM VITAMINA D SOBRE MARCADORES DE PROCESSO
INFLAMATÓRIO E ESTRESSE OXIDATIVO**

Tese apresentada em João Pessoa, por videoconferência, em 28 de Setembro de 2021.

BANCA EXAMINADORA



Dra. Maria da Conceição Rodrigues Gonçalves

Orientadora - Presidente da Banca Examinadora
PPGCN / DN / CCS / UFPB



Dr. Alexandre Sérgio Silva

Examinador Interno Titular
PPGCN / DN / CCS / UFPB



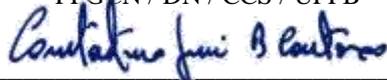
Dra. Darlene Camati Persuhn

Examinadora Interna Titular
PPGCN / DN / CCS / UFPB



Dra. Rafaela Lira Formiga Cavalcanti de Lima

Examinadora Interna Suplente
PPGCN / DN / CCS / UFPB



Dr. Constantino Giovanni Braga Cartaxo

Examinador Externo Titular
Hospital Universitário Lauro Wanderley – HULWUFPB



Dr. Alcides da Silva Diniz

Examinador Externo Titular
Examinador Externo Titular DN/UFPE

Dra. Juliana Padilha Ramos Neves

Examinadora Externa Suplente
DN/UNINASSAU

Dedico esta Tese a Deus que é meu Refúgio e Fortaleza. A minha filha que é minha força e inspiração para ser melhor a cada dia. Aos meus pais, por todo amor apoio em todas as etapas da minha vida. E ao meu esposo por ser meu maior incentivador acadêmico e na vida, amo-te.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pelo dom da vida, por toda força, amor, sabedoria, inteligência e por sua misericórdia infinita que me fortaleceu em todos os momentos desta caminhada.

Aos meus queridos pais, **João Maria Porcino** e **Damiana de Cassia** a quem amo e admiro, pelo exemplo de vida e de luta, pelo seu amor e dedicação, que por diversas vezes renunciaram seus sonhos para viver os meus. Ao meu irmão **Danilo Queiroz**, obrigada pela sua admiração e companheirismo.

Ao meu melhor amigo e esposo **Rayner Anderson**, pelo seu amor, amizade, companheirismo. Obrigada amor por todo apoio acadêmico, por muitas vezes sentar comigo para dar uma aula sobre genética com toda paciência, por entender os dias que tive que está longe de casa e por acreditar em mim sempre, seja na vida acadêmica ou profissional. A minha filha, pois foi ela que me fortaleceu para finalizar essa caminhada, fonte de todo meu amor e dedicação. **Ana Sofia** todas minhas lutas e conquistas hoje é para que você tenha orgulho de mamãe e para que eu possa te proporcionar um futuro melhor, você é meu maior tesouro nessa terra.

A minha eterna orientadora professora **Maria da Conceição** por ter me acolhido desde o mestrado quando cheguei de Natal sem conhecer ninguém. Através da senhora conheci o quanto um docente pode ser humano, alegre e sempre confiante. Obrigada por todos os ensinamentos, confiança, carinho, dedicação e paciência durante todo o curso de doutorado. Guardarei a senhora no meu coração sempre.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição (PPGCN) e a coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa, tornando possível a execução e finalização da pesquisa. A equipe da pesquisa, as meninas do PIBIC, residentes do HULW e do IMIP e em especial a **Celso Costa** e **Maria Paula** por toda amizade, parceria e apoio. Construímos além de um grupo de pesquisa, um laço de amizade que jamais será esquecido.

Aos professores doutores **Alexandre Sérgio, Darlene Persuhn, Constantino Cartaxo, Patricia Bezerra e Juliana Padilha** por toda contribuição acadêmica na pesquisa e na tese. Gratidão por todas as considerações e ainda mais por todo incentivo pessoal de seguir adiante acreditando que colheríamos bons frutos. Agradeço a professora **Dra. Rafaela Lira Formiga** e Professor **Jose Luiz** por todo apoio na análise estatística dos artigos que foi fundamental para conclusão desta tese.

Aos colegas do LETFADS e do laboratório de biologia molecular, que me auxiliaram sempre que precisei, em especial a **Mateus Duarte** e a **Carol Severo** que estiveram presentes em todas as análises me auxiliando com toda paciência. Obrigada por tudo. Aos funcionários **Sr. Carlos, Marcos e Ana Flávia** do PPGCN e do Departamento de Nutrição/CCS/UFPB respectivamente, pela colaboração, presteza e atenção sempre.

E por fim, **todos os pacientes e familiares de fibra** que gentilmente acreditaram na proposta da pesquisa e prontamente participaram de todas as etapas. São vocês que nos movem a buscar avanços na nutrição.

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana”.

Carl Jung.

RESUMO

Pacientes com Fibrose Cística possuem risco de deficiência de vitamina devido à insuficiência pancreática. A vitamina tem sua deficiência possivelmente associada com estado inflamatório e estresse oxidativo. A presença de polimorfismo genéticos no VDR parece ter papel na reposta da suplementação da vitamina D e efeitos clínicos como atuação na redução do processo inflamatório e estresse oxidativo. O objetivo do presente estudo foi avaliar a prevalência da hipovitaminose D e influência do polimorfismo BsmI (rs 1544410) do gene VDR na suplementação de megadose de vitamina D sobre marcadores de processo inflamatório e estresse oxidativo em pacientes com Fibrose Cística. Foi realizado um estudo transversal multicêntrico, seguido de estudo pré e pós não randomizado de braço único com pacientes que apresentaram insuficiência ou deficiência de 25(OH)D. Os pacientes com Fibrose Cística tinham idade > 5 anos de ambos os sexos. Na primeira etapa do estudo participaram 48 pacientes com Fibrose Cística que foram entrevistados quanto ao perfil sociodemográfico, foto tipo de pele e exposição solar, dados antropométricos (peso, altura, Índice de Massa Corporal), consumo alimentar, avaliação bioquímica para análise de função renal e hepática, cálcio, paratormônio (PTH), processo inflamatório (proteína C reativa (PCR) e alfa-1-glicoproteína ácida - A1GPA) e estresse oxidativo (malondialdeído - MDA e capacidade antioxidante total - CAOT) e determinação genotípica do polimorfismo BsmI (rs 1544410). Os pacientes diagnosticados com insuficiência e/ou deficiência de vitamina D, foram suplementados vitamina D, 4000 UI/dia para crianças de 5 a 10 anos e 10.000 UI/dia para crianças maiores de 10 anos, adolescentes e adultos, durante 8 semanas. A Análise estatística foi realizada através do “*Statistical Package for the Social Sciences*” e *Prism 6*, adotando-se significância de $p < 0,05$. Observou-se que a maioria da população tinha Insuficiência e/ou deficiência de vitamina D (64,6 %). Não houve associação entre os níveis de vitamina D com sexo, exposição solar, foto tipo de pele, estado nutricional e variação genotípica do polimorfismo BsmI. Após análise de regressão linear multivariada, o MDA apresentou associação inversa aos valores sanguíneos de 25- Hidroxivitamina D ($p = 0,01$), porém condicionada aos marcadores de processo inflamatório. Quando avaliado somente o estresse oxidativo, essa relação essa associação desaparece. Os indivíduos com os genótipos BB e Bb apresentaram aumento dos níveis séricos de 25(OH)D, mas não os com genótipo bb do polimorfismo BsmI do gene VDR. O Analise pareada o genótipo BB apresentaram redução do A1GPA. Já o genótipo bb apresentaram níveis elevados de MDA comparado ao momento pré intervenção. Em conclusão, verificou-se uma alta prevalência de hipovitaminose D nos pacientes com Fibrose Cística, apresentando uma relação inversa estresse oxidativo quando associado aos marcadores de processo inflamatório. Quanto do polimorfismo BsmI do gene VDR, houve um efeito da variação dos genótipos com os níveis de vitamina D e marcadores de processo inflamatório e estresse oxidativo. Sugerimos que nossos estudos com maior tempo e maior número de pacientes para compreender níveis ideais para correção da vitamina D e a relação com polimorfismos genéticos no gene VDR.

Palavras-chave: hipovitaminose D; polimorfismo genético; Fibrose Cística; inflamação

ABSTRACT

Patients with Cystic Fibrosis are at risk for vitamin deficiency due to pancreatic insufficiency. Vitamin deficiency is possibly associated with an inflammatory state and oxidative stress. The presence of genetic polymorphisms in the VDR appears to play a role in supplementation response and clinical effects. The aim of the present study was to evaluate the prevalence of hypovitaminosis D and the influence of the VDR gene's BsmI polymorphism (rs 1544410) on vitamin D megadose supplementation on inflammatory process and oxidative stress markers in patients with Cystic Fibrosis. A multicenter cross-sectional study was performed, followed by a single-arm nonrandomized pre and post-study with patients who had 25(OH)D insufficiency or deficiency. Patients with Cystic Fibrosis were > 5 years old, both genders. In the first stage of the study, 48 patients with Cystic Fibrosis participated, who were interviewed regarding sociodemographic profile, skin type photo and sun exposure, anthropometric data (weight, height, Body Mass Index), food consumption, biochemical evaluation for analysis of renal function and liver, calcium, parathyroid hormone (PTH), inflammatory process (C-reactive protein (CRP) and alpha-1-acid glycoprotein- A1GPA) and oxidative stress (malondialdehyde- MDA and total antioxidant capacity- CAOT) and genotypic determination of the BsmI polymorphism (rs 1544410). Patients diagnosed with insufficiency and/or vitamin D deficiency, were supplemented with vitamin D, 4000 IU/day for children aged 5 to 10 years and 10,000 IU/day for children over 10 years, adolescents and adults, for 8 weeks. Statistical analysis was performed using the "Statistical Package for the Social Sciences" and Prism 6, adopting a significance level of $p < 0.05$. It was observed that the majority of the population had Vitamin D insufficiency and/or deficiency (64.6%). There was no association between vitamin D levels and gender, sun exposure, photo skin type, nutritional status and genotypic variation of the BsmI polymorphism. After multivariate linear regression analysis, the MDA showed an inverse association with the blood values of 25-Hydroxyvitamin D ($p = 0.01$), but conditioned by markers of the inflammatory process. When only oxidative stress is evaluated, this association disappears. Individuals with the BB and Bb genotypes showed increased serum levels of 25(OH)D, but not those with the bb genotype of the BsmI polymorphism of the VDR gene. The analysis paired with the BB genotype showed a reduction in A1GPA. The bb genotype showed high levels of MDA compared to the pre-intervention period. In conclusion, there was a high prevalence of hypovitaminosis D in patients with Cystic Fibrosis, presenting an inverse relationship with oxidative stress when associated with markers of the inflammatory process. As for the BsmI polymorphism of the VDR gene, genotype variation seems to influence vitamin D levels and markers of inflammatory process and oxidative stress. The presence of polymorphism appears to influence the effect of supplementation and clinical response in patients with Cystic Fibrosis. We suggest that our studies take longer and more patients to understand ideal levels for vitamin D correction and the relationship with genetic polymorphisms in the VDR gene.

Keywords: hypovitaminosis D; genetic polymorphism; Cystic Fibrosis; inflammation

LISTA DE ILUSTRAÇÕES DA TESE

TABELAS DA TESE

Tabela 1: Fontes alimentares de vitamina D	22
Tabela 2: Níveis séricos de 25(OH) D de acordo com a literatura científica	26
Tabela 3: Estudos de vitamina D e Fibrose Cística no Brasil	29
Tabela 4: Doses para suplementação diária individual de vitaminas lipossolúveis em pacientes com Fibrose Cística.....	31
Tabela 5: Estudos que avaliaram a suplementação com vitamina D em pacientes com Fibrose Cística nos últimos 10 anos	32
Tabela 6: Descrição do fototipo da pele	41

QUADROS DA TESE

Quadro 1: Classificação do estado nutricional segundo adequação da CB.....	42
Quadro 2: Classificação dos índices antropométricos para adolescentes de 5 a 10 anos	43
Quadro 3: Classificação dos índices antropométricos para adolescentes de 10 – 19 anos..	43
Quadro 4: Classificação do Índice de Massa Corporal adultos	43

ILUSTRAÇÕES DA TESE

Figura 1: Triagem neonatal positiva para Fibrose Cística.....	18
Figura 2: Classificação das classes de mutações no CFTR.....	19
Figura 3: Frequência das 15 variantes mais identificadas entre os pacientes com Fibrose Cística REBRAFC (2016)	20
Figura 4: Estrutura química dos principais metabólitos da vitamina D	22
Figura 5: Metabolismo da Vitamina D	24
Figura 6: Posição dos polimorfismos do gene VDR	27
Figura 7: Fatores associados a hipovitaminose D em pacientes com FC.....	30
Figura 8: Fluxograma da Pesquisa.....	40
Figura 9: Variantes do polimorfismo BsMI nos pacientes com Fibrose Cística	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGPA	Alfa 1 Glicoproteína Ácida
ALT	Alanina Amino Transaminase
AST	Aspartato Amino Transaminase
CAOT	Capacidade antioxidante total
CEP	Comitê de ética em Pesquisa
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i>
CFF	Fundação de Fibrose Cística Norte Americana
DPPH	Determinação de capacidade antioxidante do plasma
DRI	<i>Dietary Reference Intakes</i>
DRFC	Diabetes relacionado à Fibrose Cística
EAR	<i>Estimated Average Requirement</i>
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
FC	Fibrose Cística
HDL	<i>High-density lipoprotein</i> (lipoproteína de alta densidade)
IMC	Índice de Massa Corporal
IMIP	Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira
IOM	<i>Institute of Medicine</i>
LDL	<i>Low-density lipoprotein</i> (lipoproteína de baixa densidade)
LETFADS	Laboratório de Estudos do Treinamento Físico Aplicado ao Desempenho e a Saúde
MDA	Malondialdeído
MSM	Método de Nutrientes Residuais
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Proteína C reativa
PTH	Paratormônio
VDR	<i>Vitamin D receptor</i> (receptor de vitamina D)
SNPs	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TALE	Termo de Assentimento Livre e Esclarecido
UFPB	Universidade Federal da Paraíba ,

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 FIBROSE CÍSTICA	17
2.1.1 Etiologia, diagnóstico e fisiopatologia da Fibrose Cística	17
2.2 VITAMINA D	21
2.2.1 Metabolismo, funções e recomendações da vitamina D em pacientes com FC ...	23
2.3 POLIMORFISMO DO GENE VDR	26
2.4 HIPOVITAMINOSE D E SUPLEMENTAÇÃO NA FIBROSE CÍSTICA	29
2.4.1 Tratamento e gestão da deficiência de vitamina D	34
3 METODOLOGIA	36
3.1 TIPO DE ESTUDO	36
3.2 ASPECTOS ÉTICOS	36
3.3 CÁLCULO AMOSTRAL	36
3.4 DESENHO DO ESTUDO	38
3.4.1 Critérios de inclusão	38
3.4.2 Critérios de exclusão	38
3.5 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	39
3.6 PRIMEIRO MOMENTO DO ESTUDO	41
3.6.1 Coleta de dados	41
3.6.2 Fototipo da pele e exposição ao sol	41
3.6.3 História clínica	41
3.6.4 Avaliação antropométrica	42
3.6.5 Ingestão dietética	44
3.7 ANÁLISE BIOQUÍMICA E GENÉTICA	44
3.7.1 Vitamina D (25(OH)D)	45
3.7.2 Paratormônio, cálcio sérico e fósforo	45
3.7.3 Avaliação de atividade de enzimas hepáticas e renais, glicemia e hemograma ..	45
3.7.4 Avaliação do estresse oxidativo	46
3.7.5 Avaliação de marcadores inflamatórios	47
3.7.6. Análise genética	47
3.7.7 Análise do polimorfismo VDR (BsmI (rs1544410)	48
3.8 SEGUNDO MOMENTO DA PESQUISA.....	49

3.8.1 Suplementação de megadose de vitamina D	49
3.8.2 Avaliação antropométrica e consumo alimentar	49
3.8.3 Avaliação dos parâmetros bioquímicos	49
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49
4.0 RESULTADOS	51
REFERÊNCIAS	52
APÊNDICES	
APÊNDICE A.....	62
APÊNDICE B.....	79
APÊNDICE C.....	97
APÊNDICE D.....	101
APÊNDICE E.....	107
APÊNDICE F	113
APÊNDICE G	118
APÊNDICE H.....	124
ANEXOS	
ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ HULW	126
ANEXO B- APROVAÇÃO IMIP	127
ANEXO C- PONTOS DE CORTES DOS EXAMES LABORATORIAIS	128

1 INTRODUÇÃO

A Fibrose Cística (FC) é a doença autossômica recessiva mais comum em brancos, causada por mutações no gene *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*), localizado no braço longo do cromossomo sete. Uma doença letal caracterizada por hiperinflamação pulmonar, seguida por destruição das paredes das vias aéreas e fibrose, causando um declínio gradual da função pulmonar (SEXAUER *et al.*, 2014). No Brasil, estima-se que a incidência de FC seja de 1:7.576 nascidos vivos (RASKIN *et al.*, 2007; ATHANAZIO *et al.*, 2017).

A FC é acompanhada de alterações metabólicas multisistêmica, caracterizada por infecção pulmonar crônica e inflamação, insuficiência pancreática, incluindo má absorção intestinal e deficiências nutricionais; perda de massa magra corporal, intolerância à glicose, inflamação, estresse oxidativo e anormalidades em ácidos graxos. Devido à insuficiência pancreática com má absorção crônica os pacientes possuem alto risco desenvolver deficiência de vitaminas lipossolúveis, atingindo cerca de 90% dos pacientes com a forma clássica, resultando em má absorção dessas vitaminas, entre elas a vitamina D (SEXAUER *et al.*, 2014; WOESTENENK *et al.*, 2014; ATHANAZIO *et al.*, 2017).

A descoberta de que a maioria dos tecidos do corpo e as células abrigam receptores de vitamina D e que vários destes tecidos possuem o equipamento enzimático para converter a forma primária desta vitamina na circulação em sua forma ativa, proporcionou novos conhecimentos sobre a função deste hormônio esteroide (CABRAL *et al.*, 2013). Acredita-se que a forma ativa da vitamina D exerça seus efeitos principais interagindo com o receptor de alta afinidade, chamado receptor de vitamina D (VDR), um fator de transcrição ligante-dependente que regula a transcrição gênica e a função celular em diversos tecidos (SHAB-BIDAR; NEYESTANI; DJAZAYERY, 2011; JOLLIFFE *et al.*, 2015). O que pode justificar seu papel em diversas funções fisiológicas do organismo.

Porém nos portadores da FC as baixas concentrações séricas de vitamina D, podem surgir devido a várias alterações acometidas pela fisiopatologia da doença, incluindo insuficiência pancreática exócrina, falta de atividade ao ar livre e alterações do metabolismo da vitamina D (CHESDACHAI *et al.*, 2016). Por isso, devido o alto risco de desenvolver deficiência de vitaminas lipossolúveis, a diretriz brasileira de FC sugere a suplementação de rotina de dose de 400 a 2000 UI de vitamina D (ATHANAZIO *et al.*, 2017).

Observa-se uma alta prevalência de insuficiência de 25 hidroxivitamina D nos indivíduos com FC, variando entre 40 a 90 % (ROVNER *et al.*, 2007; GREEN *et al.*, 2010; WANI *et al.*, 2019). No Brasil alguns estudos avaliaram a prevalência da hipovitaminose D. O Ongaratto *et al.* (2018) e Assis *et al.* (2018) investigaram a hipovitaminose em crianças e adolescentes na região sul e Nordeste e encontraram uma prevalência de insuficiência/deficiência de vitamina D em 54 % e 33,3% respectivamente nessa população.

Diante da elevada insuficiência da vitamina D e possível papel na fisiopatogênese da FC, estudos com a suplementação de vitamina D vem sendo realizados, porém são heterogêneos quanto à metodologia e população e avaliam diferentes posologias de vitamina D e formas de suplementação (TANGPRICHA *et al.*, 2012; FERGUSON; CHANG, 2014, OLSZOWIEC-CHLEBNA *et al.*, 2019).

A vitamina D exerce suas ações através da ligação da 1,25-di-hidroxivitamina D metabolicamente ativa ao receptor de vitamina D (VDR). Portanto, a variabilidade genética no VDR pode ter um grande impacto na atividade e na função da vitamina D (BAO *et al.*, 2017). Até o momento não foram encontrados estudos avaliando a associação do gene VDR na suplementação e processo inflamatório e estresse oxidativo na população com FC. Os Polimorfismos no gene VDR são possíveis fatores predisponentes a doenças, estando também associados com diferentes respostas a suplementação de vitamina D (CAVALCANTE *et al.*, 2015).

A *Cystic Fibrosis Foundation*, enfatizou em sua diretriz a necessidade da realização de estudos para avaliar dosagens, tempo de suplementação e a influência de polimorfismos genéticos nas concentrações séricas de vitamina D (TANGPRICHA *et al.*, 2012). Uma vez que não há consenso sobre a dosagem ideal e qual a forma mais eficaz, onde estudos têm demonstrando uma falta de sucesso na manutenção das concentrações ideais de vitamina D, não mostrando benefícios ou efeitos adversos decorrentes desta, novos estudos são necessários para definição de uma dose ótima para suplementação (FERGUSON; CHANG, 2014; SHEPHERD *et al.*, 2013).

Diante do exposto, a insuficiência/deficiência de vitamina D parece ser prevalente e pouco estudada no Brasil em pacientes com FC, podendo promover impactos deletérios saúde óssea, imunológica e pulmonar. Além disso, devido às funções extra esqueléticas da vitamina D é necessário avaliar neste grupo a ação desta vitamina em outros aspectos, como inflamação e estresse oxidativo em paciente com polimorfismos no gene VDR.

Nesse sentido, este estudo teve como objetivo avaliar a prevalência da hipovitaminose D e influência do polimorfismo BsmI (rs 1544410) do gene VDR na suplementação de

megadose de vitamina D sobre marcadores de processo inflamatório e estresse oxidativo em pacientes com Fibrose Cística

E os objetivos específicos foram: determinar o perfil sócio-econômico dos pacientes com FC; determinar a prevalência de insuficiência/deficiência da vitamina D em pacientes com FC; determinar os fatores associados à deficiência/insuficiência de vitamina D; determinar o perfil metabólico nestes pacientes; determinar a frequência do polimorfismo BsmI (rs 1544410) do gene VDR nesta população; verificar a associação entre as concentrações séricas de marcadores metabólicos e os níveis de vitamina D, e; avaliar a influência do polimorfismo BsmI sobre os valores de vitamina D, marcadores metabólicos em pacientes suplementados com megadose de vitamina D3. .

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 FIBROSE CÍSTICA

2.1.1 Etiologia, diagnóstico e fisiopatologia da Fibrose Cística

A Fibrose Cística (FC) é uma doença de herança autossômica recessiva com acometimento multissistêmico (sistema respiratório, gastrointestinal, hepático, geniturinário e musculoesquelético). Inicialmente foi considerada uma doença das populações caucasianas, entretanto, atualmente não se pode isentar nenhum grupo étnico de desenvolver a doença (SILVA FILHO; CASTAÑOS; RUÍZ, 2016)

É uma doença monogênica, cujo gene se localiza no braço longo do cromossomo 7, locus q 31, éxon 102 (FIRMIDA; MARQUES; COSTA, 2011). A mutação do gene responsável pela codificação da CFTR (regulador de condutância transmembranar de fibrose cística) provoca ausência ou disfunção da glicoproteína CFTR, afetando a produção de muco (HAACK; ARAGÃO; NOVAES, 2013). Esta consistência anormal de muco leva a infecções, inflamação, desnutrição e, finalmente, disfunção progressiva de múltiplos órgãos (BIERLAAGH, *et al.*, 2021)

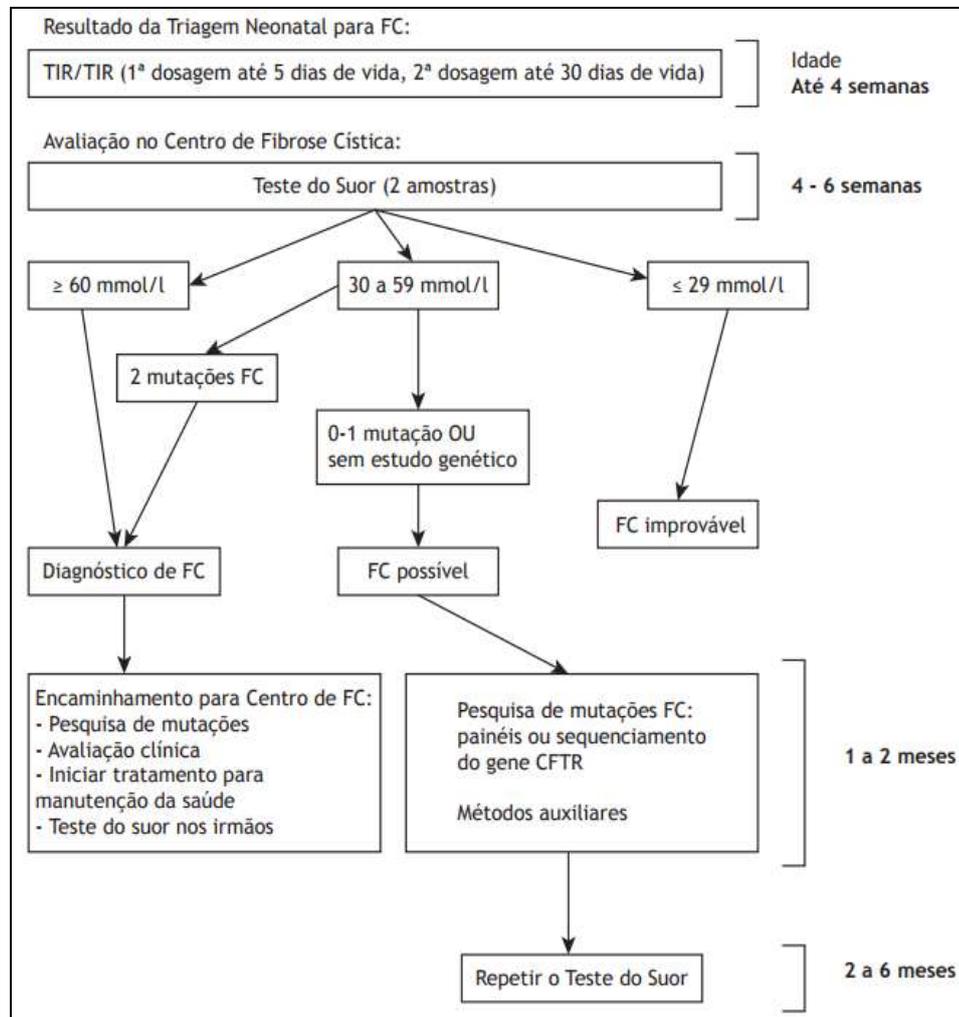
A CFTR possui 1480 aminoácidos e é uma glicoproteína expressa principalmente nas células epiteliais da árvore respiratória, trato digestório, glândulas sudoríparas e aparelho reprodutor, mas também em outros tipos de células, incluindo linfócitos (RIORDAN *et al.*, 1989; YOSHIMURA *et al.*, 1991; BRUSCIA *et al.*, 2009; CHAVES; CUNHA, 2012). Além de seu papel como um canal de Cl^- , é crucial na regulação do transporte de íons, particularmente Na^+ e HCO_3^- (COAKLEY *et al.*, 2003).

Tanto a incidência quanto a prevalência da FC apresentam diferenças de acordo com a região estudada. A incidência nos Estados Unidos da América é de 1 para 2.835 e na Europa é de 1 para 2.000 a 3.000 nascidos vivos de acordo com a localização. Na Ásia, a FC parece ser mais rara apesar de ser sub diagnosticada (FIRMIDA; LOPES, 2011). No Brasil, estima-se que a incidência de fibrose cística seja de 1:7.576 nascidos vivos; porém, apresenta diferenças regionais, com valores mais elevados nos estados da região Sul. No Registro Brasileiro de FC (REBRAFC) de 2016, foram registrados na base de dados 4654 pacientes com FC no Brasil, sendo 800 casos Nordeste (GBEFC, 2015).

Nas últimas décadas, houve um avanço em relação ao diagnóstico precoce da doença. O Brasil dispõe de um programa de ampla cobertura para a triagem neonatal e centros de

referência distribuídos na maior parte dos estados para o seguimento desses indivíduos. A seguir o fluxograma da condução dos casos com triagem neonatal positiva para FC, adaptado de Farrel *et al.* (2008) disponível nas Diretrizes Brasileiras de Diagnóstico e Tratamento da Fibrose Cística (ATHANAZIO *et al.*, 2017) (figura 1).

Figura 1: Triagem neonatal positiva para Fibrose Cística



Legenda: FC = fibrose cística; e TIR = tripsinogênio imunorreativo.

Fonte: ATHANAZIO *et al.*, 2017.

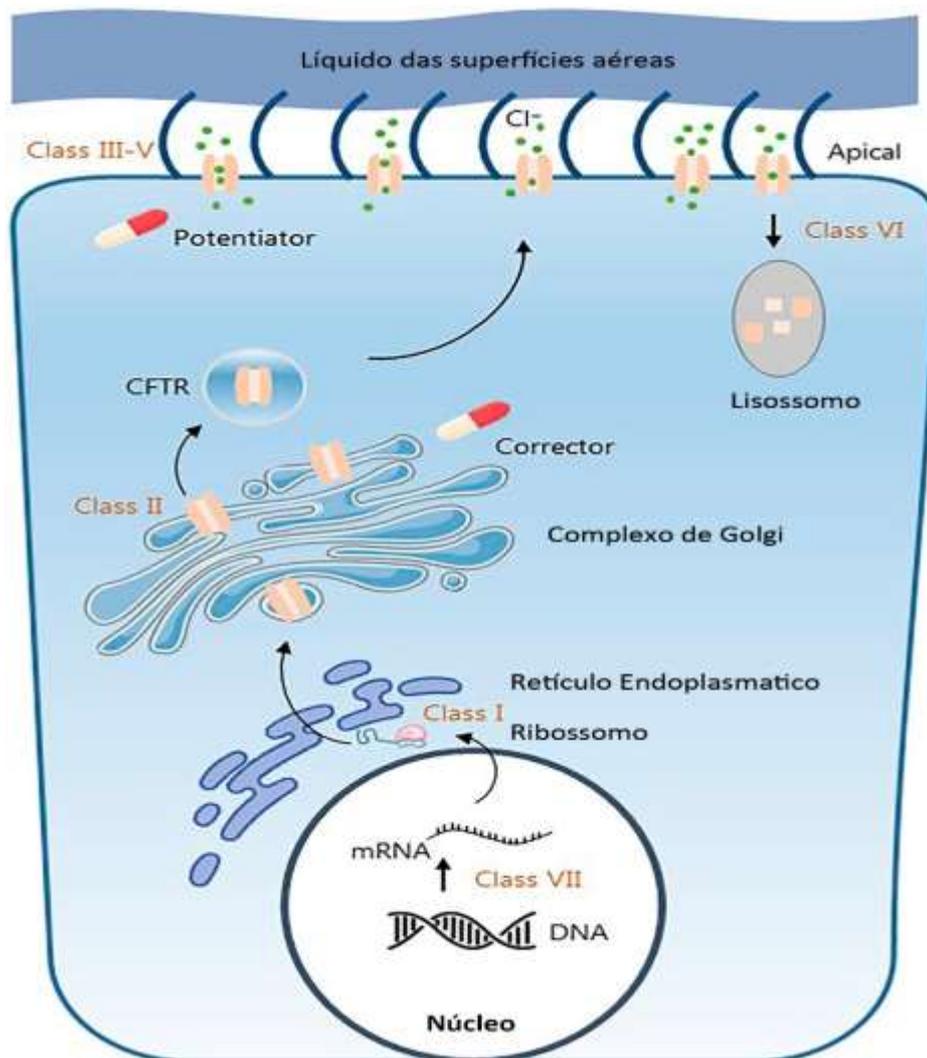
O diagnóstico da FC é realizado pela presença dos sinais e sintomas da doença, pela alteração no teste de suor (2 testes com cloreto ≥ 60 mmol/L) e/ou pelo mapeamento genético do paciente (presença de duas mutações) (FARREL, *et al.*, 2017).

A FC "Clássica" se caracteriza por doença pulmonar progressiva, disfunção pancreática, eletrólitos de suor elevados e infertilidade masculina. Outras características pulmonares importantes são hiperinflamação pulmonar, seguida por destruição das paredes

das vias aéreas e fibrose, resultando em um declínio gradual da função pulmonar. No entanto, uma ampla variabilidade na expressão clínica é encontrada entre os pacientes (DEQUEKER *et al.*, 2002; SEXAUER *et al.*, 2014).

O CFTR é expresso nos intestinos, pâncreas, pulmões, glândulas sudoríparas e rins, trazendo o caráter multissistêmico da doença. A literatura já identificou cerca de mil mutações que podem ser categorizadas em 7 classes de crescente gravidade da doença, as classes I a III estão associadas a pouca ou nenhuma função CFTR e, portanto, associadas a um fenótipo mais grave. As classes IV a VII têm função residual de CFTR e tendem a ser menos graves (figura 2).

Figura 2: Classificação das classes de mutações no CFTR.

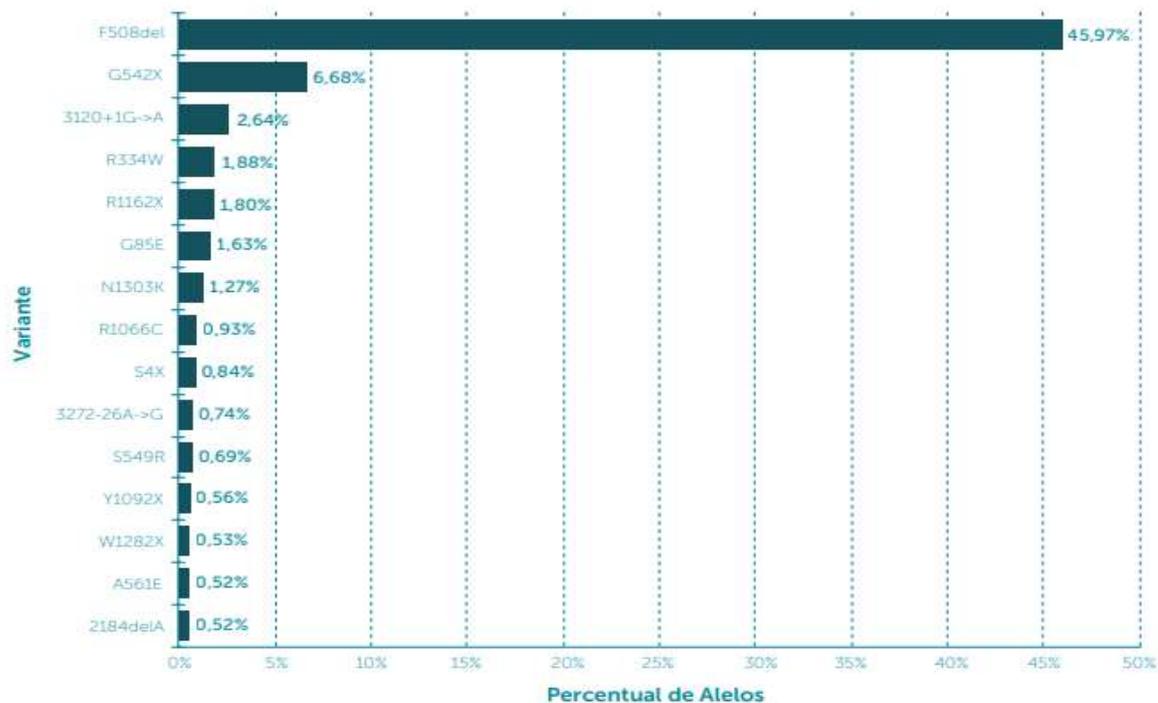


Fonte: figura adaptada de BIERLAAGH, *et al.* 2021.

Algumas mutações da FC causam disfunção de mais de 99% da CFTR, acarretando o comprometimento funcional do pâncreas exócrino. A insuficiência pancreática exócrina afeta aproximadamente 90% dos pacientes. A CFTR é necessária para a passagem de ânions e, conseqüentemente, água para o lúmen dos ductos pancreáticos. No lúmen, os cloretos são trocados por bicarbonato. O comprometimento da CFTR resulta em maior acidez e redução do conteúdo hídrico da secreção pancreática. Estas alterações contribuem para a obstrução dos ductos pancreáticos e autólise e fibrose do pâncreas. A intensidade deste processo determina a progressão da doença pancreática (FIRMIDA *et al.*,2011; HAACK *et al.*, 2013).

No Brasil a investigação genética começou a ser realizada em diversas regiões do país. Segundo o último Registro Brasileiro de Fibrose Cística em 2016, mais de 160 variantes foram identificadas entre os pacientes e um total de 15 variantes com maior frequência no Brasil (figura 3).

Figura 3: Frequência das 15 variantes mais identificadas entre os pacientes com Fibrose Cística no REBRAFC (2016)



Fonte: REBRAFC (2016).

A insuficiência pancreática é caracterizada por diarreia crônica com presença de alimentos não digeridos, causando a deficiência de vitaminas lipossolúveis, como a vitamina D. A diminuição na secreção de bicarbonato de sódio reduz a eficácia das enzimas

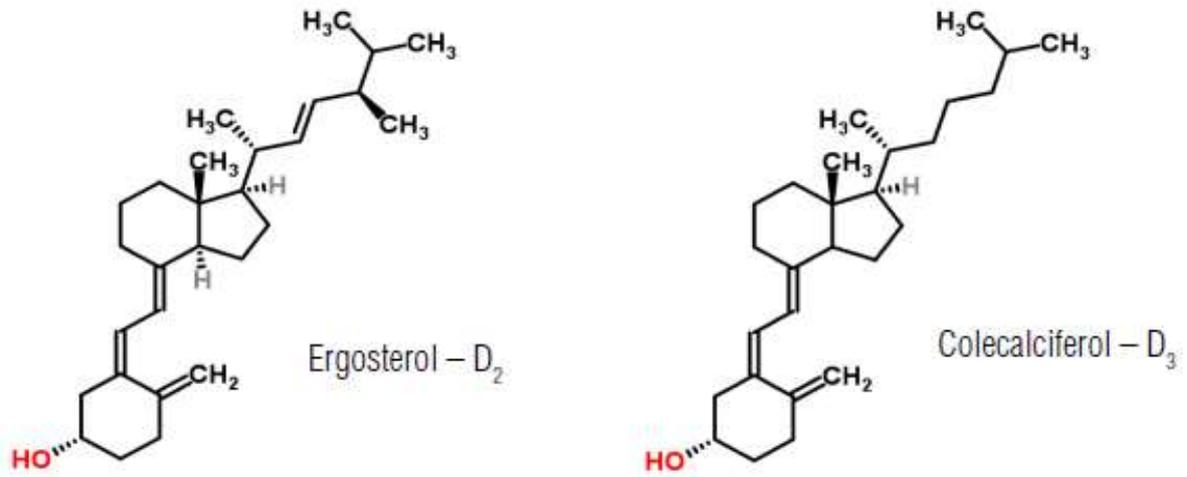
pancreáticas e precipita os sais biliares, contribuindo para a má absorção (REIS *et al.*, 1998). Às vezes, os sinais clínicos de esteatorréia não são evidentes e a única manifestação de disabsorção é a dificuldade de ganho ponderal. Alguns pacientes com insuficiência pancreática exócrina também desenvolvem disfunção do pâncreas endócrino evolutivamente, manifestando o diabetes relacionado à FC (DRFC) (FIRMIDA *et al.*, 2011).

Outra característica da doença é o alto grau inflamatório. A inflamação é um importante contribuinte para a progressão da doença da FC, e as terapias anti-inflamatórias podem melhorar os resultados clínicos (GROSSMANN *et al.*, 2012; OLSZOWIEC-CHLEBNA *et al.*, 2019). A infecção crônica resultante e inflamação das vias aéreas podem levar a destruição progressiva do pulmão aumentando a gravidade da doença (TANGPRICHA, 2019). O estresse oxidativo e a disfunção endotelial vascular também são características estabelecidas da fibrose cística (FC) (TUKER *et al.*, 2019). A literatura demonstra o papel da vitamina D na redução da resposta inflamatória e produção de interleucinas anti-inflamatórias e papel antioxidante (MCELVANEY *et al.* 2019; OLSZOWIEC-CHLEBNA *et al.*, 2019).

2.2 VITAMINA D

Embora seja denominada vitamina, um número significativo de pesquisadores tem sugerido que conceitualmente se trata de um pré-hormônio. Juntamente com o paratormônio (PTH), atuam como importantes reguladores da homeostase do cálcio e do metabolismo ósseo (MAEDA *et al.*, 2014). Evidências recentes sugerem o envolvimento da vitamina D na regulação do sistema imunológico, doenças crônicas como o câncer, doenças cardiovasculares, hipertensão arterial, diabetes e doenças autoimunes (HOLICK, 2006; ALMIRALL *et al.*, 2010; SHAB-BIDAR *et al.*, 2011; FU *et al.*, 2011; MAI *et al.*, 2012; CABRAL, *et al.*, 2013).

Considerada um secosteróide lipossolúvel, a vitamina D é encontrada sob as formas de ergosterol (vitamina D2) sintetizado em plantas e fungos, e colecalciferol (vitamina D3) produzido por tecido animal através da síntese cutânea pela ação dos raios UVB no 7-dehidrocolesterol (7-DHC) podendo ser encontrada na epiderme e na derme (Figura 4) (COZZOLINO, 2012; HOSSEIN-NEZHAD *et al.*, 2013). Pode ser produzida endogenamente ou obtida de fontes exógenas, a partir da dieta e/ ou suplementação. Estima-se que 80 a 90% da vitamina D corpórea seja obtida através da síntese cutânea, e apenas 10 a 20% provenientes da dieta (CASTRO, 2011).

Figura 4: Estrutura química dos principais metabólitos da vitamina D

FONTE: Adaptado de WACKER; HOLICK, 2013.

A alimentação é fonte complementar para obtenção da vitamina D, estando presente em quantidades significativas apenas em alguns alimentos. Suas maiores concentrações são encontradas em óleos de fígado e de peixes, seguidos pela carne dos mesmos. É encontrada, em concentração menor e variável, em leites, queijos, manteigas, nata, gema de ovo e carnes (GARCIA; MARTINI, 2010). A tabela 1 apresenta a quantidade de vitamina D2 e D3 encontrada em alguns alimentos.

Tabela 1: Fontes alimentares de vitamina D

Alimento	Porção	Conteúdo de Vitamina D por porção
Salmão Selvagem	100g	~ 600 – 1000 UI de Vitamina D3
Salmão de Criação	100g	~100-250 UI de Vitamina D3
Sardinha em Conserva	100g	~300 UI de Vitamina D3
Cavala em Conserva	100g	~250 UI de Vitamina D3
Atum em Conserva	100g	~230 UI de Vitamina D3
Óleo de fígado de bacalhau	5 ml	~400-1000 UI de Vitamina D3
Gema de ovo	1 unidade	~20 UI de Vitamina D3
Cogumelo Fresco	100g	~100 UI de Vitamina D2
Cogumelo seco ao sol	100g	~1600 UI de Vitamina D2

FONTE: HOLICK, 2007.

Outra estratégia para obtenção da vitamina D tem sido o desenvolvimento de programas de fortificação de alimentos, incluindo leites, manteigas, margarinas e certos cereais. A vitamina D é bastante estável, resistindo a altas temperaturas e longos períodos de armazenamento, o que favorece tais medidas (MAHAN *et al.*, 2010). Porém, essa fortificação acontece somente em alguns países como os Estados Unidos, não existindo essa prática no Brasil (CHAN *et al.*, 2010; MAEDA, 2014). No Brasil mesmo sem uma política pública voltada para isso, já possível encontrar no mercado produtos fortificados com vitamina D como os leites, manteiga.

Níveis adequados de vitamina D são mantidos por meio de sua síntese cutânea e ingestão oral, porém uma série de fatores podem influenciar a fotossíntese e biodisponibilidade da vitamina D, dentre esses fatores estão: pigmentação da pele, hora do dia, estação, latitude, altitude e poluição do ar, bem como algumas enfermidades cutâneas que também podem interferir negativamente nos níveis de vitamina D do organismo (MAEDA *et al.*, 2010; MALLAH *et al.*, 2011;).

2.2.1 Metabolismo, funções e recomendações da vitamina D em pacientes com Fibrose Cística

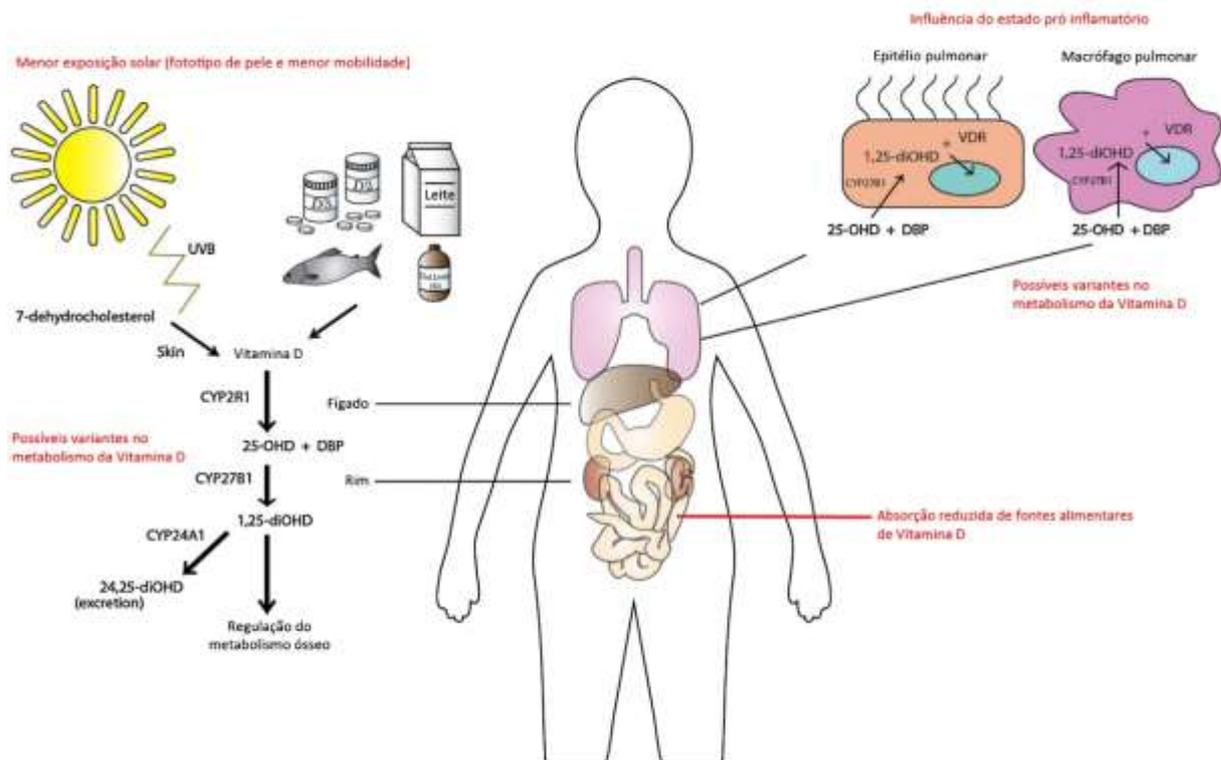
Tanto a vitamina D formada na pele quanto à ingerida precisam ser metabolizadas para originar a forma ativa da vitamina D. Para tanto as duas formas de vitamina D, a ergosterol (vitamina D₂) e colecalciferol (vitamina D₃), são incorporadas aos quilomícrons e são liberadas no sistema linfático, através do qual, entram na corrente sanguínea, onde acoplam à proteína ligadora de vitamina D (DBP) e são transportadas ao fígado, onde ocorre uma hidroxilação do carbono 25 (CYP27B1) dando origem a 25-hidroxivitamina D ou calcidiol (25(OH)D), o principal metabólito circulante da vitamina D. Depois da etapa hepática, a 25(OH) D é transportada para os rins pela DBP, ocorrendo mais uma hidroxilação, formando a 1,25-dihidroxivitamina D ou calcitriol (1,25(OH)₂D), finalmente a forma ativa. Em seguida, a 1,25-OH₂D é liberado na corrente sanguínea até alcançar seus tecidos-alvo por meio dos receptores da vitamina D (figura 5). Este processo é regulado pelo paratormônio (PTH) e pelas concentrações sanguíneas de cálcio e fósforo (HOSSEIN-NEZHAD *et al.*, 2013; MAEDA *et al.*, 2014).

Nos indivíduos com FC essa via metabólica acontece nessa via clássica, porém como pode ser observado na figura 5, os quadros em vermelho destacam os possíveis pontos que

podem ser afetados, ocasionando uma menor absorção e/ou utilização na vitamina D no organismo e suas funções metabólicas (HERSCOVITCH; DAULETBAEV; LANDS, 2013)

A 1,25(OH)2D executa muitas das suas funções biológicas de regulação da transcrição do gene através de um receptor de vitamina D nuclear de afinidade elevada (VDR) (figura 5) (HOSSEIN-NEZHAD *et al.*, 2013). De maneira mais simples, a vitamina D opera através deste receptor nuclear VDR, que funciona como um tipo de “interruptor genético”, ativando o seu receptor VDR, que migra para o núcleo da célula, e exerce seus efeitos regulatórios ligando-se a sequências específicas do DNA (FELDMAN *et al.*, 2005). Os principais órgãos-alvos para a 1,25 (OH) 2D são intestino, osso, as glândulas paratireoides e o rim. Entretanto, a presença do VDR já foi encontrada em diversos outros tecidos (figura 5) (MAEDA, *et al.*, 2014).

Figura 5: Metabolismo da Vitamina D e possíveis anormalidades dos indivíduos com FC.



Fonte: Adaptado de HERSCOVITCH; DAULETBAEV; LANDS, 2013.

As funções mais conhecidas da vitamina D estão relacionadas ao metabolismo ósseo, onde seu papel é crucial, uma vez que promove a maior eficiência de absorção do cálcio e fósforo no intestino delgado, além de regular a atividade osteoblástica e osteoclástica dos ossos (COZOLLINO, 2012). O calcitriol também pode agir em outros locais no organismo,

como cérebro, coração, pâncreas, células mononucleares e linfócitos ativados e pele, ou seja, onde houver necessidade de regulação (HOLICK, 2011a; COZZOLINO, 2012).

Recentes estudos têm sugerido efeitos extra ósseos da vitamina D. Funções exercidas pela vitamina D podem ser observadas na secreção de insulina, na inibição de produção de interleucinas, na eritropoiese e ainda na modulação da proliferação celular. Portanto, a deficiência de vitamina D foi associada com o risco e/ou a gravidade de muitas doenças, incluindo o câncer, doenças cardiovasculares, obesidade, aumento do processo inflamatório e estresse oxidativo (HOLICK, 2011; ELAMIN *et al.*, 2011; HOLICK, 2012; PINCIKOVA *et al.*, 2017).

Na FC especialmente a Vitamina D tem sido associada, além do clássico metabolismo ósseo, à ação anti-inflamatória, melhor estado nutricional, menor tempo de internação, melhor composição da microbiota, função pulmonar e efeito anti-inflamatório (FERGUSON *et al.*, 2014; PINCIKOVA *et al.*, 2017).

A vitamina D pode ser adquirida em menor quantidade pela via alimentar. A recomendação de ingestão alimentar de vitamina D para indivíduos com FC segue a mesma indicação que indivíduos saudáveis. A ingestão recomendada de vitamina D pela DRI (*Dietary Reference Intakes*) é de 10 a 15 mcg/dia (IOM, 2011).

Ainda não há um consenso acerca dos níveis, bem como da ingestão diária de vit. D ideais para crianças e adolescentes. Desta forma se observa que os dados quanto à faixa de normalidade para os níveis séricos de 25(OH)D ainda é motivo de conflito na literatura. De acordo com o IOM, são considerados suficientes níveis séricos > 20 ng/mL (> 50 nmol/L); essas recomendações concentram-se na saúde óssea (absorção do cálcio, densidade mineral óssea e osteomalácia/raquitismo) (IOM, 2010). Já em 2011 a *Endocrine Society* publicou a Diretriz para avaliação, tratamento e prevenção da deficiência de vitamina D onde recomenda que a deficiência de vitamina D seja definida como um nível sérico de 25(OH)D < 20 ng/mL (< 50 nmol/L), insuficiência entre 21 e 29 ng/mL (52,5–72,5 nmol/L) e suficiência de vitamina D > 30 ng/mL (> 75 nmol/L) para as crianças e adultos. A fundação de Fibrose cística em 2012 propôs recomendações que corroboraram com a *Endocrine Society* (TANGPRICHA *et al.*, 2012) (tabela 2).

Tabela 2: Níveis séricos de 25(OH) D de acordo com a literatura científica

	DEFICIÊNCIA	INSUFICIÊNCIA	SUFICIÊNCIA
IOM (2010)	-	-	> 20 ng/dL* (> 50 ng/mL)
Endocrine Society* (2011)	< 20 ng/mL (< 50 nmol/L)	Entre 21 e 29 ng/mL (52,5–72,5 nmol/L)	> 30 ng/mL (> 75 nmol/L)
Fundação de Fibrose Cística (2012)	< 20 ng/mL (< 50 nmol/L)	Entre 21 e 29 ng/mL (52,5–72,5 nmol/L)	> 30 ng/mL (> 75 nmol/L)

* Para crianças e adultos.

Os baixos níveis de vitamina D em grupos de risco, como em indivíduos com FC são motivo de preocupação devido ao seu potencial para a perda óssea crônica, deformidade torácica e fraturas vertebrais. Além disso, a vitamina D tem efeitos imunomoduladores na inflamação e função pulmonar.

A 1,25(OH)2D interage com o VDR intracelular nos osteoblastos, aumentando a expressão genômica de vários genes. Sabe-se que a produção local de 1,25(OH)2D seguida por sua ligação a VDR é responsável pela regulação de aproximadamente 2700 genes que estão envolvidos em muitas vias metabólicas (HOSSEIN-NEZHAD; SPIRA; HOLICK, 2013). Evidências indicam que a variabilidade genética no gene VDR pode ter um grande impacto na atividade e função da vitamina D (SCHUCH *et al.*, 2013; BAO, *et al.* 2017).

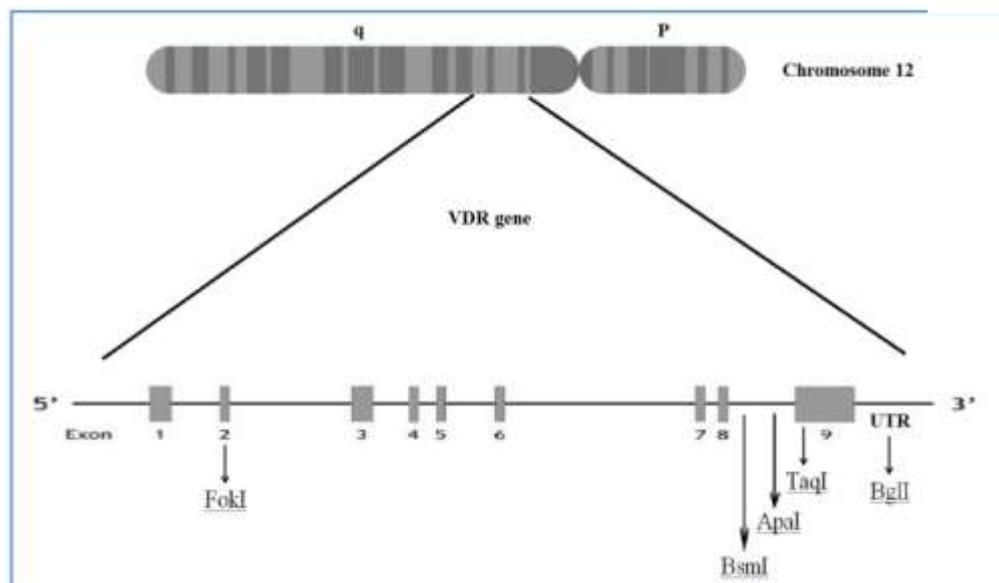
2.3 POLIMORFISMO DO GENE VDR

Variações genéticas no gene VDR podem ser denominadas de *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) (VALDINIELS *et al.*, 2006). O SNPs é o polimorfismo mais frequente encontrado no genoma humano consiste de mutações em uma posição gênica. Essas mutações são muito observadas na população, e estudos relatam sua associação com determinadas condições clínicas (JORDE *et al.*, 2010). O receptor da vitamina D (VDR) é uma proteína nuclear, composta por 437 aminoácidos, codificada pelo gene VDR localizado no cromossomo 12. O VDR é composto por 11 exons e se estende por 75 kb (SANTOS *et al.*, 2018). Os polimorfismos mais observados no gene VDR podem afetar a regulação da proteína VDR, mas os efeitos biológicos e clínicos não apresentam consenso entre diferentes estudos e populações (UITTERLINDEN *et al.*, 2004; VALDIDIVIELSO. *et al.*,2006)

Os SNPs podem ocorrer em 2 regiões diferentes do gene: na região não codificadora do gene – íntrons; ou nas regiões regulatórias do gene – éxons, que afetam o padrão de expressão de mRNA, sua estabilidade e a sua tradução em proteína (BURTON; TOBIN; HOPPER, 2005). Vários polimorfismos foram relatados para o gene VDR, como ApaI (VDR 7975232 C> T), BsmI (VDR 1544410 A> G), FokI (VDR 2228570 C> T) e TaqI (VDR 731236 T> C) (figura 6).

O polimorfismo FokI, está localizado no exon 2 do gene *VDR* e a presença deste polimorfismo resulta em uma proteína VDR encurtada devido a uma alteração no códon inicial. Os polimorfismos ApaI e BsmI estão localizados no íntron 8 na extremidade 3' do gene VDR. Esses polimorfismos não alteram a sequência de aminoácidos da proteína VDR. No entanto, BsmI e ApaI podem afetar a expressão gênica por meio da alteração da estabilidade do mRNA, a interrupção dos sítios de splice para a transcrição do mRNA ou uma mudança nos elementos reguladores intrônicos. O polimorfismo TaqI está localizado no exon 9 na extremidade 3' do gene *VDR* resulta em uma mudança sinônima devido a uma substituição de nucleotídeo (WANG *et al.*, 2017; TRIANTOS *et al.*, 2018).

Figura 6. Posição dos polimorfismos do gene VDR.



Fonte: SADEGHI *et al.*, 2021.

O polimorfo BsmI (rs1544410) está localizado no intron 8, posição 46526083-46526102 e resulta da substituição adenina-guanina (A-G), situa-se na região 3' do gene do VDR, não relacionado à codificação da proteína e sua estrutura, mas envolvido possivelmente na estabilidade do RNAm (YIN *et al.*, 2012; FATMA, ABDUL, 2019). O sítio de restrição

BsmI está faltando no alelo B e está presente no alelo b (SPEER *et al.*, 2001). Luo (2012) afirma em seu estudo que indivíduos que apresentam o alelo B tem taxas de expressão do RNAm mais baixas em comparação com os indivíduos sem este alelo. Poucos estudos têm investigado em pacientes com FC a associação de polimorfismos do VDR e densidade mineral óssea (CASTELLANI *et al.*, 2006; JAKOVSKA *et al.*, 2014; ASSIS *et al.*, 2018).

Estudos em crianças e adolescentes mostram também uma possível associação entre as concentrações séricas de 25-hidroxivitamina D e polimorfismo do gene VDR. O estudo de Santos *et al.* (2012) estudou meninas brasileiras de 7 a 18 anos e observaram que as variantes dos poli morfismos BsmI (GG), ApaI (GG) e TaqI (TT) do gene VDR estavam associadas a baixos níveis de 25-hidroxivitamina D. Valtuena *et al.* (2013) não encontraram associação entre o polimorfismo genético do VDR (rs1544410) e as concentrações séricas de 25-hidroxivitamina D em adolescentes. Corroborando com esses dados Assis *et al.* (2018) não encontraram associação entre o polimorfismo FokI e níveis séricos de vitamina D.

Em se tratando de estudos para indivíduos portadores de FC, a pesquisa realizada por Castellani *et al.* (2006) não encontrou associação entre o polimorfismo FokI e a densidade mineral óssea em 82 indivíduos com FC. Jakovska *et al.* (2014) avaliaram 77 pacientes com FC de 5 a 36 anos atendidos na clínica pediátrica, na Macedônia e encontraram um paciente com FC homozigoto para TaqI e BsmI, um para TaqI e um para FokI. Esses pacientes têm deficiência de vitamina D e osteopenia. Assis *et al.* (2018). Desta forma, a influência do polimorfismo do gene VDR nos níveis séricos ainda são controversas e necessitam de mais estudos.

Se tratando da influência do polimorfismo no gene VDR e parâmetros de marcadores inflamatórios e estresse oxidativo, não foi encontrado estudos com pacientes com FC até o momento. Kazemian *et al.* (2020) avaliaram o efeito da suplementação de 4.000 UI de vitamina D3 em 214 pacientes com câncer de mama e a influência de polimorfismos do gene VDR sobre os marcadores de estresse oxidativo. Observou-se após o período de intervenção que o genótipo Ff do FokI foi acompanhado por aumento nos níveis plasmáticos de MDA, porém após a correção para testes múltiplos, essa associação não foi mantida. Sugerindo que as variações genéticas no VDR não modificam poderosamente os efeitos da ingestão de vitamina D3 e nos biomarcadores associados.

Estudo de Cavalcanti *et al.* (2015) encontraram após a suplementação de megadose única de vitamina D 3 que as idosas com genótipo BB/Bb apresentaram-se mais responsivas a suplementação para 25(OH)D, PTH, PCR-us e AGP-A quando comparadas ao genótipo bb. Já Mohseni *et al.* (2019) não encontraram associação dos polimorfismos BsmI, FokI, ApaI e Taq

com marcadores de inflamação (TNF- α , TGF- β 1), mas encontraram que os níveis séricos de TAC dos participantes com os genótipos TT / Tt, Ff foram mais responsivos à suplementação

As evidências disponíveis são extremamente limitadas sobre do polimorfismo do gene VDR nos níveis séricos de 25 (OH) D e biomarcadores clínicos no público com FC. Nesse sentido, mais estudos são necessários o papel da vitamina D na inflamação, marcadores de estresse oxidativo e interações genéticas.

2.4 HIPOVITAMINOSE D E SUPLEMENTAÇÃO NA FIBROSE CÍSTICA

Os pacientes com FC estão incluídos no grupo de risco para insuficiência/deficiência de vitamina D (HOLLICK, 2011). Achados indicam que a deficiência de vitamina D ocorre frequentemente nessa população (CHESDACHAI; TANGPRIC, 2015). Norton *et al.* (2015) encontram valores inadequados em 49 % de insuficiência de vitamina D de 96 pacientes com FC. Estudo realizado por Kondratyeva *et al* (2020) avaliaram os níveis de vitamina D em 115 indivíduos de 0 a 18 anos em Moscou entre 2016 e 2018 e encontraram no ano de 2018 uma hipovitaminose D em 48,7 % de 25-hidroxivitamina D na população estudada.

No Brasil no período de 2014 a 2020, foram encontrados 4 estudos publicados avaliaram estudaram a relação entre vitamina D e FC, sendo 3 deles realizados na região Sul e Sudeste e 1 na região Nordeste do país (tabela 3).

Tabela 3: Estudos de vitamina D e Fibrose Cística no Brasil.

ESTUDO	REGIÃO	PARTICIPANTES	RESULTADOS
MARCONDES <i>et al.</i> 2014.	Porto 3S	Estudo transversal com 59 indivíduos com FC	Hipovitaminose D em 61 % O índice de massa corporal Hospitalização no último mês mantiveram-se significativamente associados a concentrações séricas de vitamina D.
ASSIS <i>et al.</i> , 2018	João Pessoa, PB	18 indivíduos com FC entre 0 a 25 anos	33 % de deficiência de vitamina D 25-hidroxivitamina D e os de hemoglobina, hematócrito e leucócitos nos indivíduos analisados. Além disso, encontrou-se associação do polimorfismo FokI (FF/Ff) com a contagem total de leucócitos.
ONGARATTO <i>et al.</i> , 2018	Sul do Brasil	37 crianças e adolescentes	A hipovitaminose D(54 %) esteve associada a maiores taxas de exacerbações pulmonares nesta amostra de crianças e adolescentes com FC.
OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2019	São Paulo, SP	45 crianças até 4 anos com FC	43,58 % de insuficiência/deficiência de vitamina D. Não houve associação entre a gravidade da doença pulmonar e os níveis de vitamina D no grupo com FC.

Fonte: dados próprios

Os estudos de Marcondes *et al.* (2014) e Ongaratto *et al.* (2018) foram realizados na região sul do País. O primeiro estudo teve caráter transversal com 59 indivíduos com FC com idade média de 23 anos, apresentando 61 % da população com hipovitaminose D. Os dados do estudo foram retirados de registros nos prontuários. Foi encontrada uma correlação negativa entre o IMC e níveis de vitamina D. Já o segundo estudo realizado na mesma região foi realizado com 37 crianças e adolescentes também com dados avaliados de forma retrospectiva através de prontuários em um hospital de referência. Encontraram 54 % da população com hipovitaminose D e associação de baixos níveis de vitamina D com maior número de exacerbações pulmonares.

O estudo de Oliveira *et al.*, 2019 foi realizado na região de São Paulo com 45 crianças de 0 a 4 anos de idade. O estudo foi longitudinal e aconteceu no período de 2015 a 2017. Não houve associação entre a gravidade da doença pulmonar e os níveis de vitamina D no grupo com FC. Mas, a vitamina D mostrou que a falta de suplementação foi a variável associada à insuficiência dessa vitamina.

O único estudo realizado no Nordeste foi o de Assis *et al* (2018) realizado em hospital referência na Paraíba realizado com 18 indivíduos entre 0 a 25 anos. Os autores encontraram uma prevalência de hipovitaminose D em 33,3 %, além disso, os indivíduos com insuficiência de vitamina D tiveram menores valores nos níveis hematológicos (hemoglobina e hematócrito).

A prevalência de níveis de vitamina D inferiores aos níveis adequados tende a ser maior em pacientes com FC do que na população em geral. Múltiplos fatores pertinentes à função e metabolismo da vitamina D podem estar alterados nestes indivíduos, contribuindo para a redução da sua biodisponibilidade. Além da fisiopatologia da FC ocasionar maior risco de hipovitaminose D, outros fatores já foram associados nessa população a níveis de 25 hidroxivitamina D insuficientes (WILLIAM *et al*, 2010; DALEY *et al.*, 2019) (figura 7).

D desempenha papel importante na fisiopatologia da FC, estando associado a função esquelética (GREY *et al.*, 2008), função e exacerbação pulmonar (SEXAUER *et al*, 2015) e possível papel imunológico e na inflamação (MCELVANEY *et al.* 2019; OLSZOWIEC-CHLEBNA *et al.*, 2019). A terapia com vitamina D pode melhorar a produção de peptídeos antimicrobianos e diminuir as citocinas pró-inflamatórias que podem resultar em melhores resultados clínicos (TANGPRICHA *et al.*, 2017).

Figura 7: Fatores associados a hipovitaminose D em pacientes com FC



Fonte : Adaptado de DALEY *et al.*, 2019.

Em indivíduos portadores de FC a inflamação contribui para a progressão da doença, desencadeando efeitos sistêmicos, como o aumento no gasto energético de repouso, a alteração na captação e no aproveitamento de nutrientes, o aumento no estímulo dos processos catabólicos e a perda de massa muscular (SOETERS *et al.*, 2009).

Diante do exposto presume-se que a suplementação de vitamina D, pode ser benéfica nesses pacientes, uma vez que pode ter um papel no estado de inflamação através de diversos efeitos sobre as células inflamatórias (CODOÑER-FRANCH *et al.*, 2012). A diretriz brasileira de diagnóstico e tratamento da FC enfatiza que os pacientes com FC têm alto risco de desenvolver deficiência de vitaminas lipossolúveis por conta da insuficiência pancreática exócrina e indicam doses diárias demonstradas na tabela 4.

Tabela 4: Doses para suplementação diária individual de vitaminas lipossolúveis em pacientes com Fibrose Cística

IDADE	VITAMINA A, UI (mcg)	Vitamina E, mg	Vitamina K, mg	Vitamina D, UI
0 – 12 meses	1.500 (510)	40 – 50	0,3 – 0,5	400 – 500
1 – 3 anos	5.000 (1.700)	80 – 150	0,3 – 0,5	800 – 1000
4 – 8 anos	5.000 – 10.000 (1.700 – 3.400)	100 – 200	0,3 – 0,5	800 – 1000
> 8 anos	10.000 (3.400)	200 – 400	0,3 – 1,0	800 – 2000
Adultos	10.000 (3.400)	200 – 400	2,5 – 5,0 ^a	800 – 2000

^a mg/semana.

Fonte: Adaptado de ATHANAZIO *et al.*, 2017.

Porém, mesmo diante dessas recomendações é possível observar no Brasil alta prevalência de hipovitaminose D (TUN *et al.*, 2017; ONGARATTO *et al.*, 2018). Os estudos que incluem a suplementação de vitamina D variaram muito em qualidade, quantidade de vitamina D administrada, duração do tratamento e resultados mensurados (FERGUSON *et al.*, 2014). Uma revisão sistemática realizada por Ferguson; Chang (2014), avaliou 6 estudos com um total de 239 indivíduos com FC. Conclui-se que os pacientes os quais, receberam suplementação de vitamina D tiveram os níveis de 25(OH)D significativamente maiores. No entanto, não há evidência de benefício clínico ou dano, devido ao número limitado de estudos publicados e tamanho amostral pequeno.

No presente trabalho foram pesquisados estudos dos últimos 10 anos que avaliaram a suplementação de vitamina D nos indivíduos com FC. Como resultado foram encontrados 56 artigos, sendo 14 que realizaram protocolo de suplementação. Não foram incluídos estudos de revisão que fugissem ao tema ou que suplementassem somente multivitamínicos (Tabela 5).

O Grossmann *et al.* (2012) realizaram um estudo duplo-cego, randomizado, controlado por placebo, com 30 pacientes adultos, portadores de FC, hospitalizados por exacerbação pulmonar, e após doze semanas de intervenção com megadose de 250.000 UI de vitamina D pôde efetivamente reduzir as concentrações de TNF- α e IL-6. Porém os estudos com marcadores inflamatórios nesta população são escassos e não há uma padronização de doses e tempo de intervenção (TANGPRICHA *et al.*, 2012).

Tabela 5: Estudos que avaliaram a suplementação com vitamina D em pacientes com Fibrose Cística nos últimos 10 anos.

ESTUDO	OBJETIVO	TRATAMENTO	PÚBLICO	RESULTADOS
1 GROSSMAN <i>et al.</i> , 2012 ^a .	Concentração sérica de vitamina D e resultados clínicos.	Alta dose única de colecalciferol (D ₃) - 250.000 UI. Comprimido.	30 indivíduos com FC.	Aumento das concentrações séricas de 25(OH)D no grupo vitamina D, as concentrações séricas de 25 (OH) D aumentaram em 1 semana e 12 semanas, ou seja, 27,5 \pm 13 e 6,2 \pm 11 ng / ml, respectivamente (P <0,001 e 0,06) e foi associado a uma tendência de melhores resultados clínicos (menos internações e antibioticoterapia).
2 GROSSMAN <i>et al.</i> , 2012 ^b .	Suplementação e marcadores inflamatórios.	Alta dose única de D ₃ - 250.000 UI. Comprimido.	30 indivíduos com FC.	As concentrações séricas de 25 (OH) D aumentaram de uma média de 30,6 \pm 3,2 ng / mL para 58,1 \pm 3,5 ng / mL (p <0,001) Reduções em duas citocinas inflamatórias, IL-6 e TNF- α .
3 NGUYEN <i>et al.</i> , 2015.	Avaliar aumento da vitamina D e redução da resposta alérgica.	4000 UI diária por 24 semanas. Cápsula.	Sete pacientes com idade igual ou superior a 12 anos com aspergilose broncopulmonar	Aumentos nos níveis séricos de vitamina D de 35,86 \pm 3,02 e após 24 semanas 44,86 e aumento já com 8 semanas. Suplementação diária de vitamina

				alérgica.	D foi associada a respostas reduzidas de IL-13 induzidas por <i>Aspergillus</i> .
4	SIMONEAU <i>et al.</i> , 2016.	Comparar o efeito da suplementação de Ergocalciferol (D ₂) versus D ₃ .	50.000 UI de D ₂ duas vezes por semana durante 8 semanas versus 50.000 UI de D ₃ semanalmente. Cápsula.	47 indivíduos entre 6 e 21 anos de idade.	Vitamina D ₂ tão eficaz quando vitamina D ₃ no protocolo proposto. O aumento médio geral em 25 (OH) D foi 11,1 (11,9) ng / mL e 31/47 (66%) atingiu uma concentração de 25 (OH) D ≥ 30 ng / mL
5	ALVAREZ <i>et al.</i> , 2017.	Impacto da vitamina D no metabolismo sistêmico da FC.	(250.000 UI de vitamina D ₃ em bolus) versus placebo.	24 indivíduos.	Sugere um efeito anti-catabólico de altas doses de vitamina D ₃ . Aumento no grupo suplementado de 30,2 ± 3,8 to 60,6 ± 3,8 ng/mL)
6	CORIATI <i>et al.</i> , 2017.	Protocolo de suplementação de vitamina D.	Vit D ₃ foi de 1600 UI/dia ou 10.000 UI/semana durante o verão (01/05 a 31/10) e 3200 UI/dia ou 20.000 UI/semana durante o inverno (01/11 a 30/04), além de 1200 UI/dia em multivitamínicos. Comprimido.	Retrospectivo de 5 anos 200 > 18 anos de idade.	Suplementação é eficiente e precisa ser testado em outras coortes de adultos com FC. Aumento significativo nos níveis séricos de 25 (OH) D desde o início (25,9 ± 10,3 ng / mL) até o acompanhamento (37,0 ± 11,4 ng / mL) (P ≤ 0,001
7	HERMES, <i>et al.</i> , 2017.	Avaliar a eficiência de vitamina D ₃ em pó e em óleo.	100000 UI de D ₃ em um veículo a base de óleo e a base de pó.	15 adultos com FC.	A vitamina D ₃ é absorvido com mais eficiência em pó nessa amostra. O soro de 12 horas D ₃ concentração foi significativamente maior no grupo em pó em comparação com o grupo de óleo (144,2 ± 29,1 ng / ml vs 79,9 ± 33,1 ng / ml, P = 0,002
8	PINCIKOVA <i>et al.</i> , 2017.	Eficácia da vitamina D ₂ e D ₃ no aumento das concentrações séricas de 25OHD e seu efeito na saúde respiratória.	Dose inicial de 35.000 UI (se <16 anos) ou 50.000 UI (se ≥16 anos) D ₂ ou D ₃ por semana durante 3 meses.	13 indivíduos com FC, sendo cinco D ₃ , quatro D ₂ e quatro controles.	A suplementação com a vitamina D ₂ ou D ₃ apresentaram níveis diminuídos de IL-8 no plasma ao final da suplementação. O grupo agrupado de pacientes que receberam D ₂ ou D ₃ aumentou suas concentrações totais de 25OHD e 25OHD livre no final da intervenção
9	TUN <i>et al.</i> , 2018.	Eficácia da suplementação de altas dose de D ₃ em indivíduos com FC.	Dose de 10.000 UI de segunda a sexta-feira, para um total de 50.000 UI D ₃ semanalmente.	59 indivíduos entre 17 e 64 anos de idade com FC e 10 suplementados	Aumento significativo nos níveis séricos de 25-OHD. 21,6 ± 5,9 ng / ml (54,1 ± 14,8 nmol / L) na linha de base para 31,7 ± 9,1 ng / ml (79,3 ± 22,8 nmol / L)) ≥ 2 meses após a intervenção.
10	KANHERE <i>et al.</i> , 2018.	Altas doses no microbioma intestinal e das vias aéreas em adultos.	50.000 UI de vitamina D ₃ orais ou placebo semanalmente por 12 semanas.	23 indivíduos > 18 anos de idade com insuficiência de vitamina D.	Tem potencial para impactar a composição da microbiota.
11	DUBOIS <i>et al.</i> , 2019.	Protocolo de suplementação e função pulmonar e IMC.	Vit D ₃ foi de 1600 UI/dia ou 10.000 UI/semana durante o verão e 3200 UI/dia ou 20.000 UI/semana durante o inverno.	Retrospectiva de 5 anos 200 > 18 anos de idade.	Não foi observada ligação direta entre o aumento da vitamina D sérica e a função pulmonar ou IMC. Aumento nos níveis de vitamina D de 22,5 ± 3,3 kg/m ² , 71,0 ± 20,4% para 64,7 ± 25,6 nmol/L, respectively
12	JANZEN <i>et al.</i> , 2019.	Eficácia da suplementação de D ₃ em altas doses no aumento dos níveis séricos de vitamina 25OHD em adultos.	Dose única de D ₃ 300.000 ou 500.000 UI com base nos níveis basais de 25-OHD.	32 pacientes > 18 anos de idade insuficientes em vitamina D.	Foi eficaz nos aumentos dos níveis séricos de vitamina D. Os níveis basais de 25-OHD aumentaram significativamente ao longo do tempo na população por protocolo em 3 e 9 meses.
13	OLSZOWIEC-CHLEBNA <i>et al.</i> , 2019.	Comparar a capacidade do calcitriol (1,25OHD) e do D ₃ em modular a resposta inflamatória.	Os participantes receberam 0,5 mcg de 1,25OHD ou 1000 UI de D ₃ por dia durante três meses.	23 pacientes entre 6 e 19 anos de idade.	Ambos os análogos da vitamina D revelaram efeito anti-inflamatório e reduziram nível de IL-17A e IL-23 nas vias aéreas na FC.

Estudo mais recente realizou uma revisão retrospectiva de todos os 59 pacientes adultos com FC entre 17 e 64 anos que faziam uso regular de vitamina D3 de 800 a 2000 UI. Os pesquisadores identificaram 59 % de hipovitaminose D. 10 pacientes receberam megadose de vitamina D3 10000 UI por via oral de segunda a sexta-feira (ou o equivalente semanal de 50.000 UI) por 12 semanas, além da suplementação vitamínica de rotina que fornecia de 800 a 2000 UI de vitamina D3 diariamente, demonstrando uma correção da deficiência com megadose de vitamina D nesses indivíduos (TUN *et al.*, 2018).

Os estudos de suplementação encontram resultados positivos em relação ao aumento dos níveis de vitamina D (GROSSMAN *et al.*, 2012A; CORIATI *et al.*, 2017; TUN *et al.*, 2018), efeito anti-inflamatório reduzindo citocinas inflamatórias (GROSSMAN *et al.*, 2012B; NGUYEN *et al.*, 2015; PINCIKOVA *et al.*, 2017; OLSZOWIEC-CHLEBNA *et al.*, 2019), melhora na composição da microbiota (KANHERE *et al.*, 2018) e efeito anticatabólico (ALVAREZ *et al.*, 2017).

Alguns estudos de suplementação procuraram avaliar qual melhor forma de suplementar. O estudo de Simoneau *et al.* (2016) avaliou a eficácia entre vitamina D2 e D3, encontrando efetividade nas duas formas, embora a vitamina D2 foi suplementada em dose dobrada para ter a mesma eficiência. Dois estudos avaliaram a forma de suplementação, o estudo de Hermes *et al.* (2017), avaliaram suplementação no veículo em óleo de soja ou pó, demonstrando que o pó teve melhor absorção e aumento de vitamina D nos níveis sanguíneos. Porém o estudo foi realizado com 15 indivíduos, o que limita esse achado.

Coriati *et al.* (2017) foi o único estudo que teve como objetivo propor um protocolo de suplementação específica para indivíduos com FC, porém só foram realizados com indivíduos adultos.

Diante de achados e estudos limitados, a Fundação de Fibrose Cística Norte Americana (CFF) desenvolveu diretrizes em 2012 (TANGPRICHA, 2012) com recomendações de um consenso para maioria das recomendações para o rastreio, o diagnóstico e o gerenciamento da deficiência de vitamina D em FC. Sendo também recomendada pela Diretriz de Nutrição e FC (YEN; LEONARD, 2015)

A CFF recomenda que todos os indivíduos com FC mantenham um objetivo sérico de 25(OH)D de pelo menos 30 ng/mL (≥ 75 nmol/L). Para isso, os indivíduos com valores séricos inferiores devem ser suplementados. O consenso recomenda o uso do Colecalciferol (vitamina D3) como fonte indicada para suplementação.

2.4.1 Tratamento e gestão da deficiência de vitamina D

Segundo as diretrizes da CFF (TANGPRICHA, *et al.*, 2012), quanto a suplementação de colecalciferol:

- Para lactentes <12 meses de idade, recomenda-se uma dose inicial diária de 400-500 UI de vitamina D3 com aumento para 800-1000 UI por dia, se as concentrações séricas de 25(OH)D estiverem entre 20 e 30 ng/mL (50 e 75 nmol/L) ou até um máximo de 2000 UI por dia, se os níveis séricos de 25(OH)D forem inferiores a 20 ng/mL (50 nmol/L) ou persistirem a um intervalo de 20-30 ng/mL (50-75 nmol/L).
- Os bebês com 12 meses de idade com uma concentração sérica de 25(OH)D <10 ng/mL (<25 nmol/L) devem ser avaliados para raquitismo e gerido de imediato em consulta com um especialista.
- Para crianças entre 1 e 10 anos de idade, recomenda-se uma dose inicial diária de 800-1.000 UI de vitamina D 3 com um aumento de 1.600-3.000 UU por dia se as concentrações séricas de 25(OH)D estiverem entre 20 e 30 ng/mL (50-75 nmol/L) ou até um máximo de 4.000 UI por dia se os níveis séricos de 25(OH)D forem inferiores a 20 ng/mL (50 nmol/L) ou persistem numa gama de 20-30 ng/mL (50-75 nmol/L).

e 10 anos de idade, recomenda-se uma dose inicial diária de 800-2.000 UI de vitamina D3 com um aumento de 1.600-6.000 UI por dia se as concentrações séricas de 25(OH)D estiverem entre 20 e 30 ng/mL (50-75 nmol/L) ou até um máximo de 10.000 UI por dia se os níveis séricos de 25(OH)D forem inferiores a 20 ng/mL (50 nmol/L) ou persistem numa gama de 20-30 ng/mL (50-75 nmol/L).

O período de suplementação indicado não é demonstrado, mas sugere-se que as concentrações séricas de 25(OH)D estejam em estado estável após a instituição do tratamento são alcançados em aproximadamente 12 semanas (TANGPRICHA, *et al.*, 2012). Nesse sentido, sugerem-se estudos utilizando as dosagens indicadas e o papel do polimorfismo genéticos para avaliar a influência na resposta da suplementação nos níveis de vitamina D e clínicos.

3 METODOLOGIA

3.1 TIPO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo com delineamento híbrido, consistindo, inicialmente, de corte transversal, seguido de uma intervenção farmacológica do tipo antes/depois realizado com pacientes com FC maiores de 5 anos de idade, adolescentes e adultos, de ambos os sexos, provenientes de ambulatórios dos hospitais Hospital Universitário Lauro Wanderley (HULW), em João Pessoa-PB e Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP), em Recife-PE, ambos polos referência no atendimento de pacientes com FC.

3.2 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HULW sob o número do CAE: 87354018.1.0000.5183 (ANEXO A) e pelo CEP do IMIP sob o número do CAE: 12994619.6.1001.5201 (ANEXO B).

Os pais ou responsáveis pelas crianças e adolescentes e os adultos envolvidos no estudo foram previamente esclarecidos quanto aos propósitos e procedimentos aos quais seriam submetidos e, em seguida, foram solicitados a assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A e B), bem como as crianças e adolescentes com idades entre 8 e 18 anos foram convidadas a assinar o Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE) (APÊNDICE C), atendendo a resolução 466, de 12 de dezembro de 2012 do Conselho Nacional de Saúde (BRASIL, 2012).

3.3 CÁLCULO AMOSTRAL

No Brasil, até o momento do fechamento do Registro Brasileiro de Fibrose Cística 2016, um montante de 4.654 pacientes havia sido cadastrado. Então, foi feita uma distribuição dos pacientes por estado brasileiro onde se situa seu Centro de Atendimento, sendo 19 pacientes cadastrados nos centros de Fibrose Cística na Paraíba e 76 pacientes cadastrados no centro de Pernambuco (GBEFC, 2018).

Para estimar um tamanho probabilístico de amostra foi utilizado o método alocação proporcional ao tamanho do estrato (VALLIANT; DEVER; KREUTER, 2013), e assumindo que os estratos possuem diferenças em relação ao tamanho, temos que:

$n \rightarrow$ tamanho amostral calculado;

$N \rightarrow$ número total de elementos na população;

$N_h \rightarrow$ número total de elementos do estrato;

$d \rightarrow$ margem de erro ($d = 0,045 \rightarrow 4,5\%$);

$z \rightarrow$ valor tabelado da distância normal associado ao nível de confiança escolhido;

$ph \rightarrow$ percentual de referência do estrato h .

Os percentuais, assim como os N estaduais (ex.: população de 19 pacientes com FC na Paraíba e 76 em Pernambuco, totalizando 95 pacientes) foram escolhidos levando em consideração a população de pacientes com FC no Brasil no ano de 2016 e a distribuição por regiões listadas na, até então, última edição do documento (GBEFC, 2018).

Após a identificação do n , cada estrato tem o tamanho de amostra dado por:

$$n = \frac{\sum_{h=1}^H \left(\frac{N_h}{N} \right) \sigma_h^2}{\frac{d^2}{z^2} + \frac{1}{N} \sum_{h=1}^H \left(\frac{N_h}{N} \right) \sigma_h^2}$$

$$n_h = n \times \left(\frac{N_h}{N} \right)$$

, onde

$n_h =$ tamanho amostral por estado brasileiro.

O tamanho da amostra mínima necessária para ser uma representação significativa da população para os estados selecionados para esta pesquisa foi de 6 pacientes na Paraíba e 32 pacientes em Pernambuco, fazendo um total de 38 pacientes com FC de todas as idades nos dois estados.

3.4 DESENHO DO ESTUDO

No primeiro momento do estudo foi realizada a prevalência de insuficiência/deficiência da vitamina D e fatores associados, caracterizando a população estudada com relação a fatores sociodemográficos, parâmetros bioquímicos, inflamatório e oxidativo e do polimorfismo BsmI (rs 1544410) do gene VDR. Após essa etapa, todos os diagnosticados com insuficiência/deficiência de vitamina D foram suplementados por 8 semanas e depois reavaliados em todos os parâmetros bioquímicos, inflamatório e oxidativo e demais variáveis, associados ao polimorfismo BsmI do gene VDR.

3.4.1 Critérios de inclusão

- Diagnóstico de Fibrose Cística por teste de suor positivo e/ou presença de uma ou mais mutação no gene CFTR;
- Acompanhamento regular no ambulatório do HULW e do IMIP;
- Aceitar participar da pesquisa expressando essa vontade assinando o TCLE e/ou TALE;
- Ser criança maior de cinco anos de idade, adolescente e adultos;
- Estar clinicamente estável, sendo essa informação considerada quando o paciente não apresentar internação ou exacerbação pulmonar por pelo menos 30 dias anteriores ao dia de avaliação.

3.4.2 Critérios de exclusão

- Pacientes com indicação ou submetidos ao transplante pulmonar
- Não realizar a coleta de sangue para análises bioquímicas.
- Pacientes com disfunção renal ou hepática.
- Não aceitar participar da pesquisa, não assinando o TCLE e/ou TALE
- Ser criança menor de cinco anos de idade.

3.5 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Os participantes foram acompanhados nos centros de origem e o protocolo da pesquisa foi o mesmo para ambos os centros, sendo realizado na mesma estação para evitar um possível viés de sazonalidade.

No primeiro momento foi realizado o estudo para avaliar a prevalência de deficiência/insuficiência de vitamina D e o polimorfismo BsmI (rs1544410) do gene VDR. Nessa etapa inicial os pacientes foram orientados a manter o seu consumo alimentar habitual e suplementação e medicação habitual do paciente FC. Foi realizada uma triagem dos pacientes, onde foram feitas avaliação clínica e nutricional, através de entrevista, com aplicação de formulário com informações médicas e pessoais, exposição solar e foto tipo de pele avaliação antropométrica e avaliação do consumo alimentar.

Os exames laboratoriais aconteciam no mesmo dia do primeiro momento ou eram agendadas as datas para a realização da coleta de sanguínea, no seu retorno a consulta mensal, para dosagens séricas de 25(OH)D, Hormônio Paratireóide (PTH), cálcio e análise genética de identificação do polimorfismo no gene VDR (BsmI (rs1544410)). Os marcadores inflamatórios avaliados: Proteína C Reativa (PCR), alfa-1-glicoproteína ácida (A1GPA) e os marcadores de estresse oxidativo: Malondialdeído (MDA) e capacidade antioxidante total (CAOT). Foram realizados ainda exames para a avaliar a função hepática (alanina transaminase (ALT), aspartato transaminase (AST)), a função renal (ureia, creatinina, ácido úrico), glicemia de jejum e hemograma.

No segundo momento os pacientes com insuficiência/deficiência de vitamina D foram todos suplementados com megadoses de vitamina D3 (colecalfiferol), diariamente, durante oito semanas. As doses foram oferecidas de acordo com a idade do paciente: 4000 UI/ diário para pacientes de 5 a 10 anos ou 10.000 UI/dia para os maiores de 10 anos de idade, adolescentes e adultos, conforme as recomendações da *Cystic Fibrosis Foundation* (TANGPRICHA *et al.*, 2012).

Após o período de suplementação, até um mês, de acordo com as consultas de retorno, foram realizadas avaliações antropométrica e de consumo alimentar, além de coleta sanguínea para avaliação das dosagens séricas de 25 hidroxivitamina D [25(OH)D], dos marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo e os exames bioquímicos (figura 8).

Figura 8: Fluxograma da pesquisa.



Fonte: Dados do próprio autor, 2020.

3.6 PRIMEIRO MOMENTO DO ESTUDO

3.6.1 Coleta de dados

Após a assinatura do TCLE e TALE a coleta de dados foi realizada com o auxílio de um questionário previamente elaborado (Apêndice A, B e C) especificamente para este estudo o qual contém questionamentos acerca de dados pessoais, registro do fototipo da pele e exposição solar, história clínica, dados para avaliação nutricional e inquérito dietético. Assim como a coleta da amostra sanguínea para os exames laboratoriais.

3.6.2 Fototipo da pele e exposição ao sol

O fototipo da pele foi classificado de I a VI, segundo proposto por Fitzpatrick (1988) onde o paciente foi questionado sobre a descrição da sua pele, se queima com facilidade, pouco, raramente ou nunca, e ainda sobre sua sensibilidade ao sol, variando do pouco sensível ao muito sensível. Com estas informações, o fototipo da pele foi classificado variando da cor branca (I) a cor negra (VI) (Tabela 6).

A exposição solar dos pacientes foi avaliada pelo número de minutos de exposição solar por dia. Além disso, a prática de atividade física exposta ao sol e o uso de protetor solar também foram questionados (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Tabela 6: Descrição do fototipo da pele

Tipo I: Pele muito clara, sempre queima, nunca bronzeia;
Tipo II: Pele clara, sempre queima e algumas vezes bronzeia;
Tipo III: Pele menos clara, algumas vezes queima e sempre bronzeia;
Tipo IV: Pele morena clara, raramente queima e sempre bronzeia;
Tipo V: Pele morena escura, nunca queima e sempre bronzeia;
Tipo VI: Pele negra, nunca queima e sempre bronzeia.

Fonte: Fitzpatrick (1988)

3.6.3 História clínica

Os participantes foram interrogados quanto aos antecedentes patológicos, uso de medicamentos e suplementos vitamínicos e uso de antibióticos. Foram registradas todas as medicações utilizadas pelos pacientes participantes da pesquisa (APÊNDICE D).

3.6.4 Avaliação antropométrica

Para a avaliação do peso, os pacientes foram pesados descalços e com roupas bem leves, na presença da mãe ou responsável, através de uma balança antropométrica digital da marca Líder, modelo LD1050, com capacidade de 200 kg e precisão de 50g. A balança foi ligada antes do paciente ser posicionado sobre o equipamento, e este, no centro do equipamento, ereta, de costas para a balança, descalça, com os pés juntos e os braços estendidos ao longo do corpo (BRASIL, 2011).

A estatura dos pacientes foi avaliada com uso de estadiômetro da marca Sanny®, modelo Caprice ES2060, com capacidade para 115-210 cm e precisão de 1mm. Os pacientes foram posicionados de forma ereta, em apnéia respiratória, olhar frontal e a haste do estadiômetro foi posicionada sobre a cabeça. Durante a medição estavam descalços, sem adornos na cabeça e com os braços ao lado do corpo. Idealmente, tinham que encostar os calcanhares, as panturrilhas, os glúteos, as escápulas e a parte posterior da cabeça no estadiômetro (MS, 2010).

A classificação do estado nutricional foi realizada utilizando-se o indicadores Peso/idade, IMC/idade e Altura/idade, avaliada de acordo com as curvas da OMS-2006/2007 para os pacientes de 5 a 18 anos (SISVAN, 2011) demonstrado no quadro 2 e 3 . Para classificação dos pacientes adultos (maiores de 18 anos e menores de 60 anos), foram utilizados os valores propostos pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 1998) no quadro 1.

Quadro 1: Classificação do estado nutricional segundo adequação da CB.

DESNUTRIÇÃO			EUTROFIA	SOBREPESO	OBESIDADE
GRAVE	MODERADA	LEVE			
< 70%	70-80	80-90	90-100	110-120	>120%

Fonte: FRISANCHO, 1990.

Quadro 2: Classificação dos índices antropométricos para crianças de 5 a 10 anos

Valores de Referência ESCORE Z	Indicadores Antropométricos		
	Peso-para-idade	IMC-para-idade	Estatura-para-idade
< Escore-z -3	Muito baixo peso para a idade	Magreza acentuada	Muito baixa estatura para a idade
\geq Escore-z -3 e < Escore-z -2	Baixo peso para a idade	Magreza	Baixa estatura para a idade
\geq Escore-z -2 e < Escore-z -1	Peso adequado para a idade	Eutrofia	Estatura adequada para a idade ²
\geq Escore-z -1 e \leq Escore-z +1		Sobrepeso	
> Escore-z +1 e \leq Escore-z +2			
> Escore-z +2 e Escore-z \leq +3	Peso elevado para a idade ¹	Obesidade	
> Escore-z +3		Obesidade grave	

Fonte: Adaptado de: (OMS, 2006) apud SISVAN, 2011.

1. Uma criança com a classificação de peso elevado para a idade pode ter problemas de crescimento, mas o melhor índice para essa avaliação é o IMC-para-idade. 2. Uma criança classificada com estatura para idade acima do percentil 99,9 (Escore-z +3) é muito alta, mas raramente corresponde a um problema. Contudo, alguns casos correspondem a desordens endócrinas e tumores. Em caso de suspeitas dessas situações, a criança deve ser referenciada para um atendimento especializado.

Quadro 3: Classificação dos índices antropométricos para adolescentes seria de 10 – 18 anos..

Valores De Referência ESCORE Z	Indicadores Antropométricos	
	IMC-para-idade	Estatura-para-idade
< Escore-z -3	Magreza acentuada	Muito baixa estatura para a idade
\geq Escore-z -3 e < Escore-z -2	Magreza	Baixa estatura para a idade
\geq Escore-z -2 e < Escore-z -1	Eutrofia	Estatura adequada para a idade
\geq Escore-z -1 e \leq Escore-z +1	Sobrepeso	
> Escore-z +1 e \leq Escore-z +2		
> Escore-z +2 e Escore-z \leq +3	Obesidade	
> Escore-z +3	Obesidade grave	

Fonte: Adaptado de: (WHO, 2007) apud SISVAN, 2011.

Quadro 4: Classificação do Índice de Massa Corporal adultos.

IMC (kg/m ²)	CLASSIFICAÇÃO
<18,5	Baixo peso
18,5-24,9	Eutrofia
25-29,9	Sobrepeso
\geq 30	Obesidade

Fonte: WHO, 1998.

3.6.5 Ingestão dietética

A ingestão de vitamina D foi através através da aplicação do recordatório alimentar de 24 horas em dois momento, no primeiro contato com todos os pacientes e reaplicado em 40 % presencialmente em um segundo encontro. A ingestão de vitamina D foi calculada utilizando-se o software *software Diet Win*. Após a padronização das medidas caseiras e das fichas técnicas de preparo, os alimentos ou preparações que não estavam presentes na base de dados do software foram inseridos por meio de tabelas de composição química de alimentos ou rótulos de alimentos industrializados.

Foi utilizado o método de nutrientes residuais para controlar o efeito do consumo de energia intrapessoal na avaliação dos micronutrientes (MSM). A avaliação da adequação no consumo de vitamina D foi feita utilizando-se a Estimated Average Requirement (EAR) como valor de referência (IOM, 2010).

Além disso, foi aplicado um questionário de frequência alimentar de alimentos fonte de vitamina D (ovo, peixes, queijo, manteiga, leite desnatado enriquecido com vitamina D e leite integral). O consumo foi classificado em: nunca, 1x/mês, 1x/15 dias, 1-3x/semana, >4x/semana e diariamente (NEVES *et al.*, 2012).

3.7 ANÁLISE BIOQUÍMICA E GENÉTICA

Foram coletados aproximadamente 20 ml de sangue dos pacientes em jejum de 8 a 12 horas, informado com antecedência, por equipe treinada em cada polo. O polo foi responsável pela coleta e realização dos exames básicos, sendo em João Pessoa realizado no laboratório de Análises clínicas do HULW e em Recife as amostras foram coletadas e analisadas em Laboratório particular no centro de Recife-PE. As amostras para outras análises de processo inflamatório e genética foram realizadas na UFPB no Laboratório de Biologia molecular e o Laboratório de Estudos do Treinamento Físico Aplicado ao Desempenho e a Saúde – LETFADS em frascos protegidos da luz e transportados em recipiente fechado com gelo. O sangue foi fracionado em tubo sem anticoagulante (volume de 5 mL) para obtenção do soro e, em seguida, destinado para as dosagens dos exames básicos: (25(OH)D, PTH, cálcio, glicemia e hemograma, AST, ALT, creatinina, ácido úrico, ureia, PCR e A1GPA. Parte da coleta sanguínea foi destinada ao tubo com EDTA (volume de 4 mL) para posterior análise MDA e CAOT.

Para a realização da genotipagem do gene VDR [BsmI (rs1544410)] uma parte da amostra sanguínea coletada foi encaminhada ao Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular Aplicada, localizado no Departamento de Biologia Molecular da UFPB, em João Pessoa. Na impossibilidade de realizar a extração do DNA ao mesmo dia, as amostras foram estocadas sob -20°C por período máximo de 1 mês.

3.7.1 Vitamina D (25(OH)D)

As concentrações séricas de 25(OH)D foram mensuradas por imunoenensaio quimioluminescente (UniCel DxI 800 – Beckman Coulter). A classificação dos níveis de vitamina D foi realizada com base nos valores de referência usados pela Endocrine Society, 2011 que considera: deficiente nível sérico de 25(OH)D abaixo de 20 ng/mL, insuficiente entre 21-29 ng/mL e suficiente entre 30-100 ng/mL (HOLICK *et al.*, 2011). Foram considerados com hipovitaminose D os indivíduos que apresentaram 25(OH)D < 30 ng/dL (TANGPRICHA *et al.*, 2012).

3.7.2 Paratormônio, cálcio sérico e fósforo

As concentrações séricas de PTH foram mensuradas por imunoenensaio quimioluminescente (UniCel DxI 800 – Beckman Coulter) e tiveram os valores de normalidade estabelecidos entre 15-65 pg/ml. O cálcio sérico e fósforo foram realizados por técnica colorimétrica automatizada por meio dos kits comerciais conforme orientações do fabricante (dados de referência utilizados no anexo C).

3.7.3 Avaliação de atividade de enzimas hepáticas e renais, glicemia e hemograma

Glicemia de jejum e as atividades ALT e AST foram quantificadas em modo cinético referente ao Instituto for Reference Materials and Measurements, em soro, por meio dos Kits comerciais seguindo as instruções do fabricante. As concentrações foram determinadas no analisador automático Labmax 240 premuim (Lagoa Santa – MG, Brasil).O hemograma foi medido pelo metodos automatizado com revisão de lâmina, utilizando os equipamentos DxH 800 (Beckman Coulter) e XN 1000 (Sysmex).

As concentrações de creatinina foram quantificadas em soro, por meio do kit comercial Creatinina K, conforme instruções do fabricante (Labtest, Minas Gerais, Brasil) em comprimento de onda de 510 nm. Em relação às concentrações de uréia, as mesmas foram

quantificadas em soro por meio do kit comercial Uréia UV Liquiform, conforme orientação do fabricante (Labtest, Minas Gerais, Brasil), a absorbância foi obtida no comprimento de onda de 340 nm. As concentrações de ácido úrico foram quantificadas em soro pelo método enzimático-Trinder, por meio do kit comercial Ácido Úrico Liquiform (Labtest, Minas Gerais, Brasil), conforme orientações do fabricante. A absorbância foi obtida no comprimento de onda de 520 nm. dados de referência utilizados no anexo D

3.7.4 Avaliação do estresse oxidativo

O estresse oxidativo foi avaliado por meio da determinação de malondialdeído, produto final de peroxidação lipídica e um marcador de atividade antioxidante, a capacidade antioxidante total (CAOT). A análise de ambos os metabólitos foi realizada do LETFADS.

O MDA foi quantificada por meio da reação do ácido tiobarbitúrico (TBARS) com os produtos de decomposição dos hidroperóxidos, conforme método descrito por Ohkawa, Ohishi e Yagi (1979). Para isto, 250 µl de amostra do plasma foi adicionado ao cloreto de potássio (KCl) onde foi incubado em banho-maria a 37° C por 60 minutos. Em seguida, a mistura foi precipitada com ácido perclórico AA 35% e centrifugado a 1400 rpm por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para novos microtubos e adicionado 400 µl de ácido tiobarbitúrico a 0,6% e incubado a 100° C por 60 minutos. Após o resfriamento, o material foi lido em espectrofotômetro ultravioleta (Biospectro, modelo SP-220/Brasil), a um comprimento de onda de 532 nm, em temperatura ambiente.

A determinação da capacidade antioxidante do plasma foi realizada por meio do método do DPPH. O procedimento foi baseado no método descrito por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) na qual uma alíquota de 1,25 mg de DPPH que foi diluída em 100 mL de etanol, mantida sob refrigeração e protegida da luz (com papel alumínio ou vidro âmbar). Em tubos apropriados para centrifuga serão adicionados 3,9 mL da solução de DPPH e em seguida acrescentará 100 µL do plasma. Os tubos foram agitados no vórtex e deixados em repouso por 30 minutos. Em seguida foram centrifugados a 10.000 rpm à temperatura de 20°C por 15 minutos e o sobrenadante utilizado para a realização da leitura em espectrofotômetro a 515 nm. Os resultados foram expressos como atividade antioxidante (%), onde:

$$AOA = 100 - \frac{[DPPH \cdot R]_t}{[DPPH \cdot R]_B} \cdot 100$$

Sendo $[DPPH \cdot R]_t$ e $[DPPH \cdot R]_B$ a concentração de DPPH• remanescente após 30 minutos, avaliadas na amostra (t) e no branco (B) preparado com água destilada.

3.7.5 Avaliação de marcadores inflamatórios

As análises da Proteína C Reativa ultrasensível plasmática (PCR-us) e Alfa-1-glicoproteína ácida (A1GPA) plasmática, foram realizadas em amostras de soro, através de kits comerciais da marca Labtest (Minas Gerais, Brasil), seguindo as recomendações do fabricante e em analisador automático Labmax 240 premium (Lagoa Santa-MG, Brasil) conforme instruções do fabricante. Todas as análises foram realizadas por pesquisador treinado previamente.

Proteína C Reativa ultrasensível plasmática (PCR-us): A concentração de PCR-us foi quantificada por imunoturbidimetria em amostras de soro. Para calibração foi utilizado o calibrador da série Calibra da Labtest (Calibra Plus PCR-ultra – Ref-345). A absorbância foi obtida no analisador automático, no comprimento de onda 540nm.

Alfa-1-Glicoproteína ácida (A1GPA) plasmática: A concentração de A1GPA foi quantificada por imunoturbidimetria, por meio do kit comercial (Labtest, Minas Gerais, Brasil) conforme instruções do fabricante. Para calibração foi utilizado o calibrador da série Calibra da Labtest (Calibra Plus Proteína – Ref-346). A absorbância foi obtida no analisador automático, no comprimento de onda 340nm.

3.7.6. Análise genética

Para obtenção de leucócitos foi feita a coleta de 4 ml de sangue total obtidos através de punção venosa em tubos estéreis contendo 7,2 mg de K3EDTA. As amostras coletadas foram levadas em caixa de isopor com gelo para o Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular Aplicada do Departamento de Biologia Molecular da UFPB. Na impossibilidade de realizar a extração do DNA ao mesmo dia, as amostras eram estocadas sob -20°C por período máximo de 1 mês. **col**

As amostras foram diluídas em uma primeira solução de lise, contendo 10 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM EDTA, 0,3 M sacarose, Triton-X-100 1% a fim de lisar as hemácias deixando, no entanto, os leucócitos íntegros. Em seguida segue a centrifugação à 3.200 rpm para descarte do sobrenadante. Esse processo é repetido por 3 vezes no intuito de obter um precipitado de leucócitos livre de resquícios de hemoglobina. O precipitado foi então ressuspendido em solução de lise contendo 10 mM Tris-HCl pH 8, 0,5% dodecil sulfato de sódio (SDS), 5 mM EDTA, 0,2 µg de proteinase K (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e incubado a 55°C em banho-maria. Após 7 horas de incubação foi adicionado 500 µl de uma solução aquosa de 1 mM EDTA e 7,5 M acetato de amônio. A mistura foi centrifugada por 10

min a 14.000g a 4°C e 700 µl do sobrenadante foi transferido para novo tubo onde foi realizada precipitação do DNA com 540 µl de isopropanol. A seguir o precipitado de DNA é lavado com 70% etanol, centrifugado (12.000 g por 5min), seco e ressuspenso em tampão Tris 10 mM,-EDTA 1mM, pH=8,0. (Adaptado de MILLER, S. A; DYKES, D. D; POLESKY, H. F., 1988).

3.7.7 Análise do polimorfismo VDR (BsmI (rs1544410))

Os genótipos foram determinados por PCR-RFLP (O polimorfismo de comprimento de fragmento de limitação). Para isso , foram utilizados os iniciadores: 5'-CAACCAAGACTACAAGTACCGCGTCAGTGA-3' (sense) e 5'-AACCAGCGGGAA GTCAAGGG-3' (antisense) (PANI *et al.*, 2000) e a amplificação ocorreu nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C durante 10 minutos, 30 ciclos de desnaturação (1 minuto à 94°C), anelamento (1 minuto à 58°C) e extensão (3 minutos à 72°C) com uma etapa extra de extensão final de 10 minutos. O produto de 825 pb foi digerido com a endonuclease de restrição BsmI (invitrogen) que reconhece e cliva o alelo polimórfico b gerando dois fragmentos (650 pb e outro de 175 pb) enquanto o alelo ancestral B permanece com 825 pb. Os genótipos foram analisados através de eletroforese em gel de poliacrilamida 15 % e coloração com nitrato de prata 0,5% (figura 9).

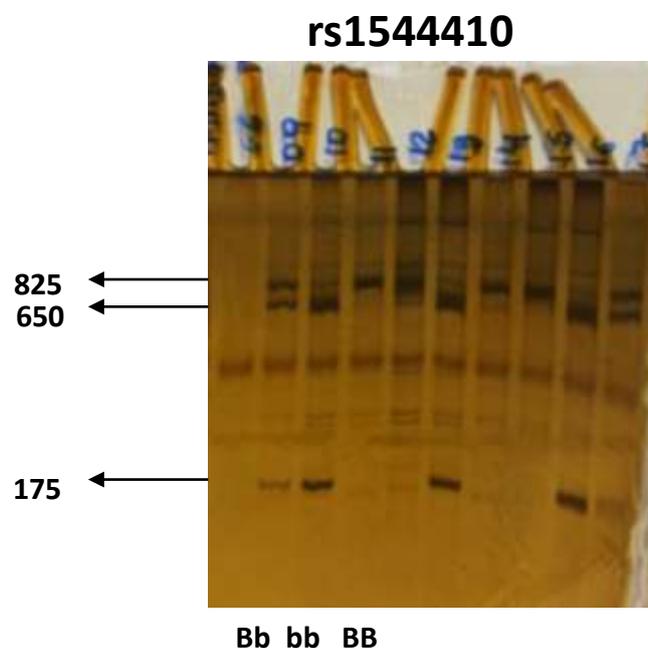


Figura 9: Variantes do polimorfismo BsmI nos indivíduos com FC.

Fonte: dados do próprio autor, 2020.

3.8 SEGUNDO MOMENTO DA PESQUISA

3.8.1 Suplementação de megadose de vitamina D

Após a investigação da prevalência da insuficiência/ deficiência de vitamina D, todos os indivíduos com concentrações séricas < 30 ng/ml receberam megadose de vitamina D 3.

- 5 – 10 anos : dose de 4000 UI /dia por 8 semanas
- > 10 anos, adolescentes e adultos: dose de 10 000 UI /dia por 8 semanas

3.8.2 Avaliação antropométrica e consumo alimentar

Após o período de 8 semanas e até 4 semanas após o término da suplementação, foi realizada aplicação do recordatório 24 horas e consumo alimentar fontes de vitamina D durante.

3.8.3 Avaliação dos parâmetros bioquímicos

Ao final das 8 semanas e até 4 semanas após a suplementação foi realizado novamente a coleta sanguínea com intuito de avaliar as concentrações séricas de 25-hidroxivitamina D, paratormônio, cálcio, glicemia, hemograma e os parâmetros de processo inflamatório (PCR e AIGPA) e de estresse oxidativo (MDA e CAOT), além de função renal e hepática afim de descartar qualquer alteração.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística para a obtenção de todos os resultados estatísticos foi feita no IBM® SPSS® Statistics software, Version 25 para Windows (IBM Corp., Armonk, NY, USA) e Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). . As variáveis contínuas foram expressas em média \pm desvio padrão (dp) e as variáveis categóricas em frequência absoluta e relativa.

No artigo 1 (APENDICE A) A análise descritiva de todas as variáveis do estudo foi realizada, os dados foram analisados no software Statistical Package for the Social Sciences for Windows, versão 22.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). Todos os dados foram verificados quanto à distribuição normal usando o teste de Kolmogorov Smirnov. Para avaliar a existência de

possíveis diferenças entre as médias dos pacientes de acordo com status de vitamina D foi utilizado o teste T de Student ou o teste de Mann-Whitney.

Análises de regressão linear múltipla foram realizadas para identificar as variáveis associadas com os níveis séricos de 25 (OH) D para elaboração do modelo de regressão linear múltipla no qual também foram inseridas variáveis que, apesar de não apresentarem associações, têm associação já relatadas na literatura. A existência de colinearidade entre as variáveis explicativas foi avaliada. Em todo o estudo foram considerados significativos os testes cujo p-valor foi menor que 0,05.

Para o segundo artigo (Apendice B) , foi aplicado o teste T pareado para avaliar possíveis diferenças entre os momentos pré e pós-intervenção. Quando necessário os testes T independente e pareado foram substituídos pelos seus equivalentes não paramétricos *Mann-Whitney e Wilcoxon*, respectivamente.

Para as variáveis contínuas comparadas entre os momentos iniciais e finais e os grupos, foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA) com medidas relativas ao fator intragrupo e a intervenção como fator entre grupos, sendo que, para a análise *post-hoc*, foi utilizado o teste de Tukey A significância estatística foi determinada como $p < 0,05$.

RESULTADOS

Os resultados desta tese são apresentados na forma de dois artigos originais apresentados no APÊNDICE A e B. Os títulos dos artigos são apresentados a seguir.

ARTIGO 1 (APÊNDICE A): Níveis De Vitamina D e sua Associação com Marcadores de Estresse Oxidativo e Processo Inflamatório em pacientes com Fibrose Cística

O estudo teve caráter transversal realizado com 48 pacientes. A Insuficiência/deficiência de vitamina D foi encontrada em 64,6 % dos pacientes de ambos os sexos. Quando avaliados os grupos de acordo com o estado de vitamina D não foi encontrada diferença entre os parâmetros bioquímicos, de consumo alimentar e antropométricos. Os níveis de MDA apresentaram uma associação negativa com os séricos níveis de 25 (OH) D quando associado no modelo com os marcadores de processo inflamatório PCR ($p=0,14$) e A1GPA ($p=0,40$). Quando avaliado sem a presença dos marcadores inflamatórios essa associação não permaneceu ($p=0,84$). Melhores níveis de vitamina D podem ser uma alternativa para reduzir os danos causados pelo excesso de estresse oxidativo e processo inflamatório em pacientes com FC.

ARTIGO 2 (APÊNDICE B): Influência do polimorfismo BsmI do Gene VDR nos níveis de Vitamina D, Perfil inflamatório e de Estresse oxidativo em pacientes com Fibrose Cística Suplementados Com Megadose De Vitamina D3

No artigo 2 após realização de A avaliação inter e intra grupo avaliada por teste t pareado, teste de anova ou seus correspondentes não paramétricos, encontraram indivíduos em sua maioria do sexo masculino e não relataram efeitos adversos ao uso da suplementação. Após o período de suplementação. 64 % obtiveram níveis de 25 (OH)D > 30 ng/mL. Os pacientes com os genótipos BB e Bb apresentaram aumento dos níveis séricos de 25 (OH)D. O grupo com genótipo BB demonstrou redução do A1GPA. E os indivíduos com genótipo bb apresentaram níveis elevados de MDA comparado ao momento pré intervenção. Concluímos que as variações do polimorfismo BsmI do gene VDR apresentam diferentes respostas nos níveis de vitamina D e marcadores de inflamação e estresse oxidativo.

REFERÊNCIAS

- ABOUZID, M; KARAZNIEWICZ-LADA, M. GLOWKA, F. Determinants of Vitamin D - Related Disorders; Focus on Vitamin D Receptor. **Current Drug Metabolism**. v. 19, n. 2, p-1042-1052, 2018.
- ALMIRALL, J. *et al.* Association of low serum 25-hydroxyvitamin D levels and high arterial blood pressure in the elderly. **Nephrol Dial Transplant**. v. 25, n. 2, p. 503-509, 2010.
- ALVAREZ, J.A. *et al.* Plasma metabolites in adults with cystic fibrosis during a pulmonary exacerbation: A randomized pilot study of high doses of vitamin D 3 administration. **Metabolism**, v. 74, n. 1, p. 41-42, 2017.
- ASSIS, M *et al.* Associação do perfil hematológico com os valores séricos de 25-hidroxitamina D e polimorfismo FokI em indivíduos com fibrose cística. **Rev. Nutr.** 2018, vol.31, n.2, pp.211-220.
- ATHANAZIO, R. A. *et al.* Diretrizes brasileiras de diagnóstico e tratamento da fibrose cística. **J Bras Pneumol**, v. 43, n. 3, p. 219-245, 2017.
- BAO, L. *et al.* Association between vitamin D receptor *BsmI* polymorphism and bone mineral density in pediatric patients. **Medicine**, v. 96, n.17, p. 1-4, 2017.
- BIERLAAGH, M. C. *et al.* A new era for people with cystic fibrosis. **Eur J Pediatr.**, v. 180, n. 9, p. 2731-2739, 2021.
- BRAND-WILLIAMS, W; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Scienc Tech Lebensmittel-Wissenschaft & Tech**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.
- BRASIL. Ministério da Saúde (Brasil). Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Orientações para coleta e análise de dados antropométricos em serviços de saúde: Norma Técnica do Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional – SISVAN**. Brasília: Ministério da Saúde; 2011.
- BRASIL. **Resolução nº 466 de 12 de dezembro de 2012**. Regulamenta pesquisas envolvendo seres humanos. Conselho Nacional de Saúde, Brasília, DF, 12 dezembro de 2012.
- BRUSCIA, E. M. *et al.* Macrophages directly contribute to the exaggerated inflammatory response in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. **Am J Respir Cell Mol Biol**. v. 40, p. 295–304, 2009.
- CABRAL, M. A. *et al.* Prevalence of vitamin D deficiency during the summer and its relationship with sun exposure and skin phototype in elderly men living in the tropics. **Clin Interv Aging**. v. 8, n. 1, p. 1347-1351, 2013.

- CASTELLANI, C. *et al.* The genetic background of osteoporosis in cystic fibrosis: Association analysis with polymorphic markers in four candidate genes. **J. Cyst. Fibros.**, v. 5, n. 1, p. 229-235, 2006.
- CASTRO, L. C. O sistema endocrinológico vitamina D. **Arq Bras Endocrinol Metab** v. 55, n. 8, p. 566-575, 2011.
- CAVALCANTE. I, G, M; *et al.* Effect of vitamin D3 supplementation and influence of BsmI polymorphism of the VDR gene of the inflammatory profile and oxidative stress in elderly women with vitamin D insufficiency: Vitamin D3 megadose reduces inflammatory markers. **Experimental Gerontology**, v. 66, n. 1, p. 10-16, 2015.
- CHAN, J.; SIEGL, K.; FRASER, G. E. Determinants of serum 25 hydroxyvitamin D levels in a nationwide cohort of blacks and non-hispanic whites. **Canc Caus Control**, v. 21, n. 4, p. 501-511, 2010.
- CHAVES, C. R. M. M.; CUNHA, A. L. P. Avaliação e recomendações nutricionais para crianças e adolescentes com fibrose cística. **Rev Paul Pediatr**. v. 30, n. 1, p. 131-138, 2012.
- CHESDACHAI, S, TANGPRICHA, V. Treatment of Vitamin D Deficiency in Cystic Fibrosis. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 164, n. 1, p. 36-39, 2016.
- COAKLEY, R. D. *et al.* Abnormal surface liquid pH regulation by cultured cystic fibrosis bronchial epithelium. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 100, n.26, p. 16083-16088, 2003.
- CORIATI, *et al.* Vitamin D₃ supplementation among adult patients with cystic fibrosis. **Clin Nutr**. v. 36, n. 6, p. 1580-1585, 2017.
- COZZOLINO, S.M.F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. 4. ed. São Paulo: Manole; 2012.
- DALEY, T. HUGHAN, K. RAYAS M. KELLY, A. Vitamin D deficiency and its treatment in cystic fibrosis. **J Cystic Fibros**. v.18,n.1,p. 66- s73, 2019
- DEQUEKER, E. *et al.* Classification of cystic fibrosis and related disorders. **J Cystic Fibrosis**, v. 1, n. 1 p. 5-8, 2002.
- DUBOIS, L. *et al.* Extra-skeletal impact of vitamin D supplementation protocol in an adult population with cystic fibrosis. **Clin Nutr**. v. 38, n. 4, p. 1666-1671, 2019.
- ELAMIN, M. B. *et al.* Vitamin D and cardiovascular outcomes: a systematic review and meta-analisis. **J clin Endocrinol Metab**. v, 96, n. 7, p. 1931-1942, 2011.
- FARREL. P. M. *et al.* Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. **J Pediatr**, v. 153, n. 2, p. S4-S14, 2008.
- FARREL, P.M; White TB, Pen CL, Hempstead SE, Accurso F, Derichs N. Diagnosis of cystic fibrosis: consensus guidelines from the cystic fibrosis foundation. **J Pediatr.**, v. 18, n. 1, p. 4-14, 2017.

- FATMA, H; ABDUL SN Association of the Bsm I gene polymorphism of the vitamin D receptor with type 2 diabetes mellitus in the Pakistani population. **Afr Health Sci**, v. 19, n. 2, p. 2164-2171, 2019.
- FELDMAN, D.; PIKE, J. W.; GLORIEUX, F. H. Vitamin D. **Academic Press**, p. 1892, 2005.
- FERGUSON, J. H; CHANG, A. B. Vitamin D supplementation for cystic fibrosis. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 14, n. 5, 2014.
- FIRMIDA, M. C.; MARQUES, B. L.; COSTA, C. H. Fisiopatologia e manifestações clínicas da fibrose cística. **Revista HUPE**, v. 10, n. 4, p. 46-58, 2011.
- FITZPATRICK, T. B. The Validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. **Arch of Dermatol**, v. 124, n. 6, p. 869-871, 1988.
- FRISANCHO, A. R. **Anthropometric standards for the assessment of growth and nutritional status**, 1990.
- FU, L. W.; VENDER, R. Systemic role for vitamin D in the treatment of psoriasis and metabolic syndrome. **Dermat Resear and Pract.** v. 1, n. 1, p. 1-4, 2011.
- GARCIA, V. C.; MARTINI, L. A. Vitamin D and Cardiovascular Disease. **Nutrients**. v. 2, n.4, p. 426-437, 2010.
- GREEN, *et al.* Transient effectiveness of vitamin D2 therapy in pediatric cystic fibrosis patients. **J. Cyst. Fibros.** v. 9, p. 143-149, 2010.
- GREY, V. *et al.* Prevalence of low bone mass and deficiencies of vitamins D and K in pediatric patients with cystic fibrosis from 3 Canadian centers. **Pediatrics**. v. 122, n. 5, p. 1014-1020, 2008.
- GROSSMANN, R. E. *et al.* Impact of vitamin D supplementation on markers of inflammation in adults with cystic fibrosis hospitalized for a pulmonary exacerbation. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 66, p. 1072-1074, 2012A.
- GROSSMAN, R. E. *et al.* Pilot study of vitamin D supplementation in adults with cystic fibrosis pulmonary exacerbation: A randomized, controlled trial. **Dermato-endocrinolog.** v. 4, n. 2, p. 191-197, 2012.
- HAACK, A.; ARAGÃO, G. G.; NOVAES, M. R. C. G. Pathophysiology of cystic fibrosis and drugs used in associated digestive tract diseases. **World J. Gastroenterol.** v. 19, p. 8552-8561, 2013.
- HERSCOVITCH, K.; DAULETBAEV, N.; LANDS, L. C. Vitamin D as an anti-microbial and anti-inflammatory therapy for Cystic Fibrosis. **Paediatr Respir Rev.** v. 15, p. 154-162, 2014.
- HERMES, W. A. *et al.* Prospective, randomized, double-blind, parallel group, comparative efficacy study comparing a vitamin D powder vehicle compound with an oil vehicle

compound in adults with cystic fibrosis. **J Parenter Enteral Nutr**, v. 41, n. 6, p. 952-958, 2017.

HO, S. Y.; LAM, T. H.; JANUS, E. D. Waist to stature ratio is more strongly associated. with cardiovascular risk factors than other simple anthropometric indices. **Ann. Epidemiol.** v. 13, n. 10, p. 683-691, 2003.

HOLICK, M. F. Vitamina D: uma perspectiva milenar. **J. Cell Biochem.** v. 88, n. 2, p. 296-307, 2003.

HOLICK, M. F. *et al.* Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** v. 96, n. 7, p.1911-1930, 2011.

HOLICK, M. F. Vitamin D deficiency. **N. Enge. J. Med.** v. 357, n. 3, p. 266-81, 2007.

HOLICK, M. F. Vitamin D: Its role in cancer prevention and treatment. **Progr. Biophys. and Molec. Biol.**, v. 92, n. 1, p. 49-59, 2006.

HOLICK, M. F. Vitamina D: A D-Lightful Solution for Health, **J. Investig. Med.**, v. 59, n. 6, p. 872-880, 2011a.

HOLICK, M. F. Vitamina D: extraskeletal health. **Rheum Dis Clin North.** v. 38, n. 1, p. 141-160, 2012.

HOLICK, M. F. Vitamin D: evolutionary, physiological and health perspectives. **Curr. Drug Targets.** v. 12, n. 1, p. 4-18, 2011.

HOSSEIN-NEZHAD A, SPIRA A, HOLICK MF. Influence of vitamin D status and vitamin D3 supplementation on genome wide expression of white blood cells: a randomized double-blind clinical trial. **PLoS One.** v. 3, n. 3, p. 1-13, 2013.

IOM. INTITUTE OF MEDICINE. **Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D**, p. 2, 2010.

ISSA. C, T, M, I. *et al.* Relationship between cardiometabolic profile, vitamin D status and BsmI polymorphism of the VDR gene in non-institutionalized elderly subjects: Cardiometabolic profile, vitamin D status and BsmI polymorphism of the VDR gene in non-institutionalized elderly subjects. **Experimental Gerontology**, v. 81, n. 6, p. 56-64, 2016.

JAKOVSKA, T. *et al.* Prevalence Of Low Bone Mass And Vitamin D Deficiency In Pediatric And Adult Patients With Cystic Fibrosis In Republic Of Macedonia. **Sec. Med. Sci**, v. 1, n. 1, p. 151-158, 2014.

JANZEN, K. M. *et al.* High-dose Cholecalciferol Supplementation in Adults with Cystic Fibrosis. **Pharmacotherapy**, v. 39, n. 9, p. 874-880, 2019.

JORDE, L. B.; CAREY, J. C.; BAMSHAD, M. Variação Genética: sua Origem e Detecção. **In Genética Médica.** Seattle, Washington: Ed Elsevier, v. 4, n. 1, p. 26-55, 2010.

- JOLLIFFE, D. A. *et al.* Single nucleotide polymorphisms in the vitamin D pathway associating with circulating concentrations of vitamin D metabolites and non-skeletal health outcomes: Review of genetic association studies. **J Steroid Biochem Mol Biol.** v. 15, p. 30153-30159, 2015.
- KANHERE, M. *et al.* Bolus Weekly Vitamin D3 Supplementation Impacts Gut and Airway Microbiota in Adults With Cystic Fibrosis: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Clinical Trial. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 103, n. 2, p. 564-574, 2018.
- KAZEMIAN, E. *et al.* Effect of vitamin D receptor polymorphisms on plasma oxidative stress and apoptotic biomarkers among breast cancer survivors supplemented vitamin D3. **Eur J Cancer Prev.** v. 29, n.5, p. 433-444, 2020.
- KONDRATYEVA, E.I. *et al.* Dynamics of Indicators of Vitamin D Status in Children With Cystic Fibrosis of the Moscow Region for 2016-2018. **Vopr Pitan.,** v. 89, n. 2, p. 90-99, 2020.
- KOIVULA, F. N. M. *et al.* Islet-intrinsic effects of CFTR mutation. **Diabetologia,** v. 59, n. 7, p. 1350-1355, 2016.
- LUO, X. Y. Vitamin D receptor gene BsmI polymorphism B allele, but not BB genotype, is associated with systemic lupus erythematosus in a Han Chinese population. **Lupus.** v. 21, n. 1, p. 53-9, 2012.
- MARCONDES, N. A. *et al.* Hypovitaminosis D in patients with cystic fibrosis: a cross-section study in South Brazil. **Journal Clinic Respir.** v. 8, n. 4, p. 455-459, 2014.
- MAEDA, S. S. *et al.* Increases in summer serum 25- hydroxyvitamin D (25OHD) concentrations in elderly subjects in São Paulo, Brazil vary with age, gender and ethnicity. **BMC Endocr. Disord.,** v. 10, n. 12, p. 1-8, 2010.
- MAEDA, S. S. *et al.* Recomendações da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM) para o diagnóstico e tratamento da hipovitaminose D. **Arq Bras Endocrinol Metab.,** v. 58, n. 5, p. 411-433, 2014.
- MAEDA, S. S. *et al.* Factors affecting vitamin D status in different populations in the city of São Paulo, Brazil: the São Paulo vitamin D Evaluation Study (SPADES). **BMC. Endocr. Disord.,** v. 13, n. 1, p. 1-8, 2013.
- MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUMP, S. **Krause:** Alimentos, Nutrição e Dietoterapia. 12^a edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.
- MAI, X. M. *et al.* Cross-Sectional and Prospective Cohort Study of Serum 25-Hydroxyvitamin D Level and Obesity in Adults. **Am. J. Epidemiol.,** v. 175, n. 10, p. 1029-36, 2012.
- MALLAH, E. M. *et al.* Plasma concentrations of 25-hydroxyvitamin D among Jordanians: Effect of biological and habitual factors on vitamin D status. **BMC Clinical Pathology.** v. 11, n. 8, p. 1-6, 2011.

- MARUNAKA, Y. A The Mechanistic Links between Insulin and Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Cl⁻ Channel. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 18, n. 8, p. 1767-1778, 2017.
- MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Res** .v.16, n.3, p.1215, 1988.
- MONTAZERI-NAJAFABADY, *et al.* Association of the genetic polymorphism of the BsmI vitamin D receptor with the BMD Z score in Iranian children and adolescents (9 to 18 years). **Int J Endocrinol Metab**. v. 17, n. 2, 2019.
- MCELVANEY, O. J. *et al.* Targeting airway inflammation in cystic fibrosis. **Expert Rev Respir Med.**, v. 13, n. 11, p. 1041-1055, 2019.
- MCNALLY, P. *et al.* Vitamin D receptor agonists inhibit pro-inflammatory cytokine production from the respiratory epithelium in cystic fibrosis. **Journal of Cystic Fibrosis.**, v. 10, n. 6, p. 428-434, 2011.
- MS - MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Coordenação Geral de Alimentação e nutrição. SISVAN** (Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional), 2010.
- NEVES, J. P. R. *et al.* Concentrações de 25-hidroxivitamina D e níveis pressóricos em idosos hipertensos. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 56, n. 7, p. 415-422, 2012.
- NORTON, L. *et al.* Prevalence of Inadequate Vitamin D Status and Associated Factors in Children With Cystic Fibrosis. **Nutr Clin Pract**, v. 30, n. 1, p. 111-116, 2015.
- NGUYEN, N. L. *et al.* Vitamin D supplementation decreases *Aspergillus fumigatus* specific Th2 responses in CF patients with aspergillus sensitization: a phase one open-label study. **Asthma Res Pract**, v. 1, n. 3, 2015.
- OHKAWA, H; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analyt Biochem**, v. 95, n. 2, p. 351-358, 1979.
- OLIVEIRA, R. M. *et al.* Association of vitamin D insufficiency with adiposity and metabolic disorders in Brazilian adolescents. **Public Health Nutr**, v. 17, n. 4, p. 1-8, 2013.
- OLIVEIRA, M. S. *et al.* Lung disease and vitamin D levels in cystic fibrosis infants and preschoolers. **Pediatr Pulmonol**. v. 54, n. 5, p. 563-574, 2019.
- ONGARATTO, R *et al.* Association between hypovitaminosis D and frequency of pulmonary exacerbations in children and adolescents with cystic fibrosis. **Einstein**, v. 12, n. 1, p. 1-6, 2018.
- OLSZOWIEC-CHLEBNA, M. *et al.* Vitamin D inhibits pro-inflammatory cytokines in the airways of cystic fibrosis patients infected by *Pseudomonas aeruginosa*- pilot study. **Ital J Pediatr**, v. 45, n. 41. p. 2-8, 2019.

- PANI, M. A. *et al.* Vitamin D receptor allele combinations influence genetic susceptibility to type 1 diabetes in Germans. **Diabetes**. v. 49, n. 3, p. 504-7, 2000.
- RASKIN, S. *et al.* Incidence of cystic fibrosis in five different states of Brazil as determined by screening of p.F508del, mutation at the CFTR gene in newborns and patients. **J Cyst Fibros**, v. 7, n. 1, 2008.
- REIS, F. J.; DAMACENO, N. Cystic fibrosis. **J Pediatr**. v. 74, n. 1, p. 76-94, 1998.
- SADEGHI, M. *et al.* The Most Common Vitamin D Receptor Polymorphisms (*Apal, FokI, TaqI, BsmI*, and *BglI*) in Children with Dental Caries: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Children (Basel)**. v.8, n.4, p.1-15, 2021.
- SANTOS, B. R. *et al.* Vitamin D deficiency in girls from South Brazil: a cross-sectional study on prevalence and association with vitamin D receptor gene variants. **BMC Pediatrics**, v. 12, n. 62, p. 1-7, 2012.
- SHEPHERD, D. *et al.* Single high-dose oral vitamin D3 (stoss) therapy - a solution to vitamin D deficiency in children with cystic fibrosis? **J Cyst Fibros**, v. 12, p. 177-182, 2013.
- SEXAUER, W. P. *et al.* Vitamin D deficiency is associated with pulmonary dysfunction in cystic fibrosis. **J Cyst Fibros**.v. 14, n. 4, p 497506, 2015.
- SILVA FILHO; CASTAÑOS, C.; RUÍZ, H. H. Cystic fibrosis in Latin America - Improving the awareness. **J Cyst Fibros**. v.15, n. 6, p. 791-793, 2016.
- SPEER, G. *et al.* Vitamin D and estrogen receptor gene polymorphisms in type 2 diabetes mellitus and in android type obesity. **Eur J Endocrinol**. v. 144, n. 4, p. 385-9, 2001.
- SIMONEAU, T. *et al.* A randomized controlled trial of vitamin D replacement strategies in pediatric CF patients. **J Cyst Fibros**, v. 15, n. 2, p. 234-241, 2016.
- SOETERS, P. B.; SCHOLS, A. M. W. J. Advances in understanding and assessing malnutrition. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care.**, v. 12, p. 487-494, 2009.
- SBP.Sociedade Brasileira de Pediatria. **Avaliação nutricional da criança e do adolescente – Manual de Orientação / Sociedade Brasileira de Pediatria. Departamento de Nutrologia. São Paulo: Sociedade Brasileira de Pediatria. Departamento de Nutrologia; 2018.**
- SCHUCH, N. J. *et al.* Relationship between Vitamin D Receptor gene polymorphisms and the components of metabolic syndrome. **Journal Nutrition**, v. 12, n. 96, p. 1-7, 2013.
- SHAB-BIDAR, S.; NEYESTANI, T. R.; DJAZAYERY, A. Efficacy of vitamin D3-fortified-yogurt drink on anthropometric, metabolic, inflammatory and oxidative stress biomarkers according to vitamin D receptor gene polymorphisms in diabetic patients: a study protocol for a randomized controlled clinical trial. **BMC Endocrine Disorders.**, v. 11, n. 12, p. 1-10, 2011.
- TANGPRICHA, V. *et al.* An update on the screening, diagnosis, management, and treatment of vitamin D deficiency in individuals with cystic fibrosis: evidence-based recommendations

from the cystic fibrosis foundation. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 97, n. 4, p. 1082-1093, 2012.

TANGPRICHA *et al.* Vitamin D for the Immune System in Cystic Fibrosis (DISC): a double-blind, multicenter, randomized, placebo-controlled clinical trial. **Am J Clin Nutr.** p. 1-10, 2019.

TRIANOTOS, C. *et al.* Prognostic significance of vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms in liver cirrhosis. **Sci Rep**, v. 8 n. 14065, 2018.

TUN, R. K. C. *et al.* Effect of high dose vitamin D3 therapy on serum vitamin D3 levels in vitamin D insufficient adults with cystic fibrosis. **Clin Nutr ESPEN.**, v. 23, n. 1, p. 84-88, 2018.

UITTERLINDEN, A. G. *et al.* Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. **Gene.** v. 338, n. 2, p. 143-156, 2004.

UITTERLINDEN, A. G. *et al.* Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. **Gene.** v. 338, n. 2, p. 143-156, 2004.

VALDINIELS, J. M.; FERNANDEZ, E. Vitamin D receptor polymorphisms and diseases. **Clin Chim Acta.** v. 1, n. 2, p. 1-12, 2006.

WANG, W. *et al.* Vitamin D receptor gene FokI but not, ApaI, BsmI polymorphism is associated with Hashimoto's thyroiditis: a meta-analysis. **Sci Rep**, v. 7, n. 41540, 2017.

WACKER, M.; HOLICK, M. F. Vitamin D - Effects on Skeletal and Extraskelatal Health and the Need for Supplementation. **Nutrients**, v. 5, n. 1, p. 111-148, 2013.

WANI, W. A. *et al.* Vitamin D status correlates with the markers of cystic fibrosis-related pulmonary disease. **Pediatr Neonatol**, v. 60, n. 2, p. 210-215, 2019.

WILLIAM, B. HALL, A. S.; ROBERT, M. A. Vitamin D Deficiency in Cystic Fibrosis. **J. Steroid Biochem Mol Biol**, v. 1, n. 1, p. 1-9, 2010.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Obesity: preventing and managing the global epidemic.** Geneva: WHO, 1998.

WHO. World Health Organization. **The molecular genetic epidemiology of cystic fibrosis**, 2004. Disponível em:
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/68702/1/WHO_HGN_CF_WG_04.02.pdf. Acesso em janeiro de 2018.

WHO. World Health Organization. Development of a WHO growth reference for school-aged children and adolescents. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 85, 660-667, 2007.

WOESTENENK, J. W. *et al.* Dietary intake in children and adolescents with cystic fibrosis. **Clinical Nutrition**, v. 33, p. 528-532, 2014.

YEN, E. H; LEONARD, A. R. **Nutrition In Cystic Fibrosis**. A Guide for Clinicians. ed. 1. Switzerland: Springer International Publishing, 2015.

YIN, X. *et al.* Serum 25(OH)D is inversely associated with metabolic syndrome risk profile among urban middle-aged Chinese population. **Nutr J**. v. 9, p. 11-68, 2012.

YOSHIMURA, K. *et al.* Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in cells of non-epithelial origin. **Nucleic Acids Research**, v. 19, p. 5417–5423, 1991.

APÊNDICES

APÊNDICE A – ARTIGO 1

Pediatric Pulmonology . QUALIS: A1. Fator de Impacto: 3,039

NÍVEIS DE VITAMINA D E SUA ASSOCIAÇÃO COM MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO E PROCESSO INFLAMATÓRIO EM PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA

RESUMO

Introdução: A Fibrose Cística é uma doença que ocasiona inflamação, estresse oxidativo e alterações metabólicas que levam a deficiência de nutrientes, como a vitamina D. Por outro lado, é sugerido que a vitamina D tem ação anti-inflamatórias e antioxidante. **Objetivo:** Avaliar a prevalência da hipovitaminose D e a associação entre os níveis séricos de 25 hidroxivitamina D com marcadores de estresse oxidativo e inflamação em pacientes com fibrose cística. **Método:** Estudo transversal realizado com 48 pacientes com Fibrose Cística em crianças, adolescentes e adultos na região Nordeste/Brasil. Realizou-se coleta sanguínea para análise 25- hidroxivitamina D, cálcio, paratormônio, processo inflamatório (proteína C reativa -PCR e alfa-1-glicoproteína ácida-A1-A1GPA) e estresse oxidativo (malondialdeído-MDA e capacidade antioxidante total- CAOT). A Análise estatística foi realizada através do “*Statistical Package for the Social Sciences*”, adotando-se significância de $p < 0,05$. **Resultados:** A Insuficiência/deficiência de D foi encontrada em 64,6 % dos pacientes. Após análise de regressão linear múltipla, o MDA apresentou associação inversa aos valores sanguíneos de 25- Hidroxivitamina D ($p < 0,05$) condicionada a presença dos marcadores de processo inflamatório. Quando avaliado somente o estresse oxidativo, essa relação essa associação desaparece. **Conclusão:** Em conclusão, verificou-se uma alta prevalência de hipovitaminose D, com os níveis de 25 (OHD) associados ao maior estresse oxidativo quando em conjunto com os marcadores inflamatórios. Melhores níveis de vitamina D podem ser uma alternativa para reduzir os danos causados pelo excesso de estresse oxidativo e processo inflamatório em pacientes com FC.

Palavras-chave: vitamina D, fibrose cística, estresse oxidativo.

INTRODUÇÃO

A Fibrose Cística (FC) é uma doença de caráter autossômica recessiva caracterizada por hiperinflamação pulmonar seguida por destruição das paredes das vias aéreas e fibrose, resultando em um declínio gradual da função pulmonar, estresse oxidativo elevado e equilíbrio antioxidante/oxidante prejudicado, além de outras alterações sistêmicas^{1,2}. É causada por mutações na proteína reguladora transmembranar da Fibrose Cística (CFTR), levando à função ausente ou diminuída da proteína CFTR na superfície celular². A disfunção nessa proteína afeta os sistemas respiratórios, gastrointestinal, hepatobiliar e imunológico^{2,3,18}.

O processo inflamatório na FC se comporta de forma crônica, promovendo desequilíbrio entre os mediadores pró e anti-inflamatórios^{3,4}. Acredita-se que a resposta inflamatória e o excesso do estresse oxidativo possuam um papel decisivo na progressão do dano pulmonar e gravidade da FC^{5,6}. Alguns estudos já demonstraram a relação entre a FC e o estresse oxidativo e o papel dos antioxidantes^{2,6}. Porém, o papel da vitamina D ainda não foi investigado em pacientes com FC.

A maioria dos pacientes com FC possuem risco para deficiência da vitamina D devido à má absorção de nutrientes, ocasionada pela insuficiência pancreática, metabolismo prejudicado e falta de exposição ao sol^{6,7}. A prevalência de deficiência / insuficiência de vitamina D na população com FC varia de 23% a até 95%^{3,8,26}. vitamina D é uma vitamina lipossolúvel que possui um papel conhecido no desenvolvimento e manutenção do cálcio e saúde óssea⁷. Além do seu papel ósseo conhecido, a vitamina D pode apresentar propriedades anti-inflamatória, função imunológica e sistema imune com papel antioxidante e pulmonar^{9,10,11,12}.

Tendo em vista o papel imunodulador da vitamina D, torna-se relevante avaliar a *status* da vitamina D nesses pacientes e a possível associação dos níveis séricos e o com os marcadores de estresse oxidativo e processo inflamatório. Sendo assim, O objetivo do estudo

foi avaliar a prevalência da insuficiência/ deficiência de Vitamina D e verificar sua associação com os marcadores do estado inflamatório e de estresse oxidativo em pacientes com Fibrose Cística.

MÉTODOS

2.1 Tipo de estudo e casuística

Estudo transversal com amostra composta por pacientes diagnosticados conforme os critérios da *Cystic Fibrosis Foundation* ¹³. Dois importantes centros de referência no tratamento e acompanhamento de pacientes com FC fizeram parte desta pesquisa: o Hospital Universitário Lauro Wanderley (HULW), localizado em João Pessoa-PB, o maior dentre os dois centros localizados no estado da Paraíba, e o Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP), localizado em Recife-PE, o único centro do tipo localizado no estado de Pernambuco.

Um valor de amostra probabilística foi obtido pelo método alocação proporcional ao tamanho do estrato ¹⁴, identificando dois estratos, com populações finitas diferentes, para o cálculo: João Pessoa-PB e Recife-PE. Os percentuais, assim como o tamanho populacional dos estratos foram escolhidos levando em consideração a população de pacientes com FC no Brasil no ano de 2016 e a distribuição por regiões listadas na, até o momento inicial do estudo, última edição do documento ¹⁵. A margem de erro escolhida foi 4,5%. No sentido de corrigir eventuais perdas, foi feito um acréscimo de 10%, resultando no cálculo amostral de no mínimo de 38 pacientes para uma representação significativa dessa população.

Foram convidados pacientes maiores de 5 anos de idade com diagnóstico de FC que estavam em acompanhamento ambulatorial nos dois hospitais. Pacientes com indicação ou submetidos a transplante pulmonar, em exacerbação pulmonar e/ou com disfunção renal ou

hepática não foram incluídos. Após critérios de inclusão e exclusão foram coletados dados de 48 pacientes.

Os dados foram coletados entre agosto de 2018 e dezembro de 2019, após a assinatura dos pais ou responsáveis pelas crianças e adolescentes e os adultos do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). E o Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE), atendendo a resolução 466, de 12 de dezembro de 2012 do Conselho Nacional de Saúde (BRASIL, 2012) ¹⁶. O estudo foi previamente aprovado pelo comitê de ética das duas instituições com número do CAE: 87354018.1.0000.5183 e número do CAE: 12994619.6.1001.5201, respectivamente.

2.2 Avaliação dos fatores clínicos, sociais e nutricionais

Os pacientes foram entrevistados por meio de questionário previamente estruturado, para avaliação clínica e nutricional, através de entrevista, com aplicação de formulário previamente elaborado.

O fototipo da pele foi classificado de I a VI, segundo proposto por Fitzpatrick (1988)¹⁷ no qual o paciente foi questionado sobre a descrição da sua pele, se queima com facilidade, pouco, raramente ou nunca, e ainda sobre sua sensibilidade ao sol, variando do pouco sensível ao muito sensível. Com estas informações, o fototipo da pele foi classificado variando da cor branca (I) a cor negra (VI).

Os participantes foram pesados em balança antropométrica digital, estando o paciente posicionado de pé, de forma ereta no centro do equipamento, de costas para a balança, com pés juntos, descalço, vestindo roupas leves, e os braços estendidos ao longo do corpo. Para "

aferição da estatura dos pacientes foram posicionados em posição ortostática, em apneia respiratória, descalços, sem adornos na cabeça. A leitura da medida foi feita ao se encostar o cursor no ponto mais alto da cabeça ao final de uma inspiração. Idealmente, tinham de encostar os calcanhares, as panturrilhas, os glúteos, as escápulas e a parte posterior da

cabeça no estadiômetro. Quando não foi possível encostar esses cinco pontos, deveriam posicionar no mínimo três deles ¹⁸. A classificação do estado nutricional foi realizada utilizando-se os indicadores Peso/idade, IMC/idade e altura idade, avaliado de acordo com as curvas da OMS-2006/2007 para os pacientes de 5 a 18 anos ¹⁸. Para classificação dos pacientes adultos (maiores de 18 anos e menores de 60 anos), foram utilizados os valores propostos pela *World Health Organization* ¹⁹.

A ingestão de vitamina D foi avaliada, por meio da aplicação de um recordatório de 24 horas com todos os participantes e um segundo recordatório com 40 % da população estudada conforme descrito por Verly-Jr et al ²⁰, respeitando um período mínimo de 30 e máximo de 45 dias entre a aplicação de um recordatório e outro. A ingestão de vitamina D foi calculada utilizando-se o software *Virtual Nutri plus*. Foi utilizado o método de nutrientes residuais (*MSM*) para controlar o efeito do consumo de energia intrapessoal na avaliação dos micronutrientes.

2.2 Coleta e avaliação bioquímica

Foram coletados aproximadamente 20 ml de sangue dos pacientes em jejum de 8 a 12 horas, informado com antecedência, por equipe treinada em cada polo. Os níveis séricos de 25- hidroxivitamina D (25(OH)D), hormônio Paratireóide (PTH) e cálcio foram realizados por imunoensaio quimioluminescente (Liaison XL Diasorin). A classificação dos níveis de vitamina D foi realizada com base nos valores de referência usados pela Fundação de Fibrose Cística (2012)¹³. Considerando níveis suficientes acima de 30,0 ng / mL e insuficiência de níveis de 25 (OH) D abaixo de 30,0 ng / mL e deficiência abaixo de 20,0 ng/mL.

Os marcadores inflamatórios (Proteína C Reativa ultrasensível (PCR-us) alfa-1-glicoproteína ácida (A1GPA) foram analisados pelo método imunoquímica de

turbidimotria. Para análise de estresse oxidativo foi por meio da avaliação de um marcador oxidante, o Malondialdeído (MDA), analisada pelo método da reação do ácido tiobarbitúrico (TBARS) ²¹ e a capacidade antioxidante total (CAOT), analisada pelo método do DPPH²². Foram realizados ainda exames para avaliar a função hepática (alanina transaminase (ALT), aspartato transaminase (AST)), a função renal (ureia, creatinina, ácido úrico), afim de avaliar pacientes em critérios de inclusão.

2.4 Análise Estatística

A análise descritiva de todas as variáveis do estudo foi realizada, os dados foram analisados no software Statistical Package for the Social Sciences for Windows, versão 22.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). Todos os dados foram verificados quanto à distribuição normal usando o teste de Kolmogorov Smirnov. Para avaliar a existência de possíveis diferenças entre as médias dos pacientes de acordo com status de vitamina D foi utilizado o teste T de Student ou o teste de Mann-Whitney.

Análises de regressão linear simples foram realizadas para identificar as variáveis associadas com os níveis séricos de 25 (OH) D. Para elaboração do modelo de regressão linear múltipla no qual também foram inseridas variáveis que, apesar de não apresentarem associações, têm associação já relatadas na literatura ^{8,9}. A existência de colinearidade entre as variáveis explicativas foi avaliada. Em todo o estudo foram considerados significativos os testes cujo p-valor foi menor que 0,05.

RESULTADOS:

Este estudo avaliou 48 pacientes que preenchiam todos os critérios de inclusão, sendo 26 do sexo masculino (54,2%). Dentre os indivíduos, 56,4 % foram adolescentes, seguidos de 27,1 % de crianças entre 5 e 10 anos e 16,7 % de adultos entre 20 e 45 anos. A média de idade

do grupo estudado foi $14,85 \pm 7,04$ anos e 62,5 % relataram < 30 minutos de exposição solar por dia. A maioria da população da pesquisa se declarou pardo 54% (n= 26) ou branca 31 % (n= 15) (tabela 1). Quanto ao uso de suplementação com vitaminas, apenas 35, 4 % (n=17) relataram utilizar suplementação de alguma vitamina de acordo com a prescrição médica e 3 participantes faziam uso de vitamina D diária (800 a 2000 Ui/dia). Em relação ao estado nutricional mais de 40% dos pacientes foram considerados com estado nutricional de baixo peso.

A Insuficiência/deficiência de Vitamina D foi observada em 64,6% (n=31) dos pacientes e não houve diferença estatisticamente significativa entre os sexos e faixa etária. Quanto ao consumo alimentar de vitamina D, os participantes consumiram a média de $4,80 \pm 2,15$, não havendo diferença entre os grupos com suficiência e hipovitaminose D (p= 0,81). Os níveis de vitamina D foram agrupados em duas classes: suficiente ($25(\text{OH})\text{D} \geq 30\text{ng/mL}$) e insuficiente/deficiente ($25(\text{OH})\text{D} < 30\text{ng/mL}$). Os níveis séricos médios de $25(\text{OH})\text{D}$ foram de $33,84 \pm 3,10$ ng/mL no grupo suficiente, e de $22,41 \pm 5,0$ ng/mL no grupo com insuficiência/deficiência de vitamina D. Não foram encontradas diferenças significativas entre os parâmetros antropométricos, foto tipo de pele, tempo de exposição, níveis de cálcio sérico e consumo, marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo com estado nutricional de Vitamina D (insuficiente/deficiente) e suficientes (tabela 2).

Ao fazer análise de regressão múltipla para estimar a associação das variáveis com os níveis séricos de 25 (OHD) considerou-se as variáveis com associações relatadas na literatura. As variáveis foram ajustadas por sexo e idade. A variável IMC mostrou multicolinearidade e foi retirada do modelo e as variáveis A1GPA e PCR foram analisadas em modelos diferentes por também apresentar multicolinearidade ($>0,800$). Os valores de exposição solar não foram incluídos no modelo devido à presença de outliers. Os níveis de MDA apresentaram uma associação negativa com os séricos níveis de 25 (OH) D quando associado no modelo com os

marcadores de processo inflamatório PCR ($p = 0,14$) e A1GPA ($p = 0,40$). Quando avaliado sem a presença dos marcadores inflamatórios essa associação não permaneceu ($p = 0,84$).

DISCUSSÃO

Os indivíduos com FC têm dificuldade em manter o *status* de vitamina D devido à má absorção induzida pela insuficiência pancreática, baixa exposição solar e ingestão insuficiente de alimentos contendo vitamina D²³. O presente estudo encontrou uma alta prevalência de insuficiência/deficiência de vitamina D. O estudo de Oliveira et al. 2019¹¹ investigou 45 pacientes com FC região de São Paulo quanto a associação dos níveis de vitamina D e observaram um percentual de 43,56% hipovitaminose D em crianças e pré-escolares. Dados semelhantes foram encontrados por Ongaratto et al²⁴ realizado na região do Rio grande do Sul, que avaliaram 37 crianças e adolescentes com Fibrose Cística, encontrando uma prevalência de 54%. Tun et al²⁵ encontraram 59% ($n=35$) de adultos com FC com níveis abaixo do ideal de 25 hidroxivitamina D. Então, baseada nestes dados prévios, podemos classificar como ALTA a prevalência do presente estudo.

Além da absorção intestinal diminuída, ingestão nutricional pobre e baixa adesão, outros fatores que contribuem para a deficiência de vitamina D na FC incluem diminuição da atividade ao ar livre e exposição à luz solar²³. O nordeste do Brasil apresenta em grande parte do ano exposição mais acentuada que as regiões já estudadas, o que poderia favorecer de forma positiva a manutenção das concentrações séricas de vitamina D, porém este estudo mostrou que o fato de residir em região ensolarada não foi suficiente para ter níveis adequados de vitamina D. embora a exposição solar seja uma variável influenciadora na vit D, os resultados ainda divergem nos estudos em outras populações em locais ensolarados^{26,27}. Na população com FC, Bhimavarapu et al²⁸ mostraram uma associação do *status* de vitamina D com exposição solar nos últimos 3 anos indo de contraponto aos nossos resultados. Desta

forma sugerem-se estudos para padronização do tempo de avaliação da exposição solar e associação com características como fisiopatologia, estação do ano e foto tipo de pele.

A inflamação é um importante contribuinte para a progressão da doença da FC, e as terapias anti-inflamatórias podem melhorar os resultados clínicos^{4,10}. A infecção crônica resultante e inflamação das vias aéreas podem levar a destruição progressiva do pulmão aumentando a gravidade da doença²⁸. No presente estudo foi possível observar que embora já conhecida a relação do caráter inflamatório da FC e a associação da inflamação da hipovitaminose, neste estudo, pacientes com FC não apresentaram diferença entre o grupo com suficiência e insuficiência de vitamina D, mas teve influência nos marcadores de estresse oxidativo MDA na análise multivariada. Estudo em células epiteliais respiratórias de FC demonstrou que a forma ativa da vitamina D a 1,25 di-hidroxitamina D reduziu significativamente inflamatórios (IL-6 e IL-8) estimuladas por antígenos²⁹. Grossmann et al¹² conduziram um ensaio clínico duplo cego controlado com 30 adultos com FC exacerbação pulmonar com megadose única de vitamina D3 por 12 semanas. Após 12 semanas no grupo suplementado houve uma tendência a redução de IL-6 e TNF- α , mas não em outras interleucinas avaliadas.

A infecção Crônica e inflamação comum nos pacientes com FC geram o aumento das espécies reativas de oxigênio e desta forma o aumento do estresse oxidativo^{2,30,31} tendo papel na progressão do dano pulmonar nesses indivíduos⁶. Os nossos dados indicam o papel da inflamação no estresse oxidativo, uma vez que a associação do MDA foi significativa nos modelos multivariados, quando associados aos marcadores de processo inflamatório avaliado neste estudo. Estudos maiores e com maior número de marcadores inflamatório e estresse oxidativo são necessários para testar essa hipótese e o papel anti-inflamatório e antioxidante da vitamina D.

Apenas um (1) estudo foi encontrado avaliando o MDA como marcador de peroxidação lipídica em portadores de FC. Lezo² e colaboradores investigaram o estresse oxidativo em 70 pacientes com FC de 1 a 18 anos. O estudo avaliou se a suplementação de vitaminas antioxidantes (A, C e E) pode ser adaptada às necessidades individuais e ao estado oxidativo. Os marcadores de estresse oxidativo, lipídicos 4-hidroxinonenal (HNE-L) e MDA, tiveram uma relação inversa com as vitaminas antioxidantes, em particular a vitamina C. Não foram encontrados estudos avaliando o papel da vitamina D e estresse oxidativo nessa população.

Esse é um estudo pioneiro em encontrar uma associação entre os níveis de vitamina D e marcadores de estresse oxidativo e inflamatório em pacientes com FC. No entanto, essa afirmação precisa ser validada por meio de pesquisas adicionais. A principal limitação de nosso estudo é o número limitado de marcadores de estresse oxidativo e inflamatórios analisados. Além disso, a associação encontrada foi fraca, aumentando a necessidade de mais estudos. Outra limitação foi o estudo ter sido de caráter transversal, podendo inferir causalidade entre o desfecho (deficiência de vitamina D).

Nosso estudo traz implicações interessantes para comunidade científica e para prática clínica ao demonstrar elevada prevalência de hipovitaminose D em pacientes com FC, condição tratável que deve ser melhor monitorada e cujo tratamento deve privilegiar a manutenção dos níveis séricos de vitamina D dentro dos níveis de normalidade. Os resultados sugerem a realização de novos estudos, a fim de verificar se o tratamento da hipovitaminose D é capaz de reduzir o clássico estresse oxidativo que normalmente acomete pacientes com FC.

CONCLUSÃO

Concluimos que pacientes com FC apresentam em sua maioria níveis insuficientes de vitamina D e que a hipovitaminose D esteve associada à maior estresse oxidativo quando

associado a marcadores inflamatórios. Sugerimos uma maior atenção dos níveis da vitamina D e mais estudos clínicos para possível papel da correção do *status* da vitamina D na melhora do estresse oxidativo comum nesses pacientes.

REFERÊNCIAS

1. Sexauer WP, Hadeh A, Ohman-Strickland PA, et al. Vitamin D deficiency is associated with pulmonary dysfunction in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2015;14(4):497-506.
2. Lezo A, Biasi F, Massarenti P, et al.. Oxidative stress in stable cystic fibrosis patients: do we need higher antioxidant plasma levels? *J Cyst Fibros*. 2013 Jan;12(1):35-41.
3. Altman K, McDonald CM, Michel SH, Maguiness K. Nutrition in cystic fibrosis: From the past to the present and into the future. *Pediatric Pulmonology*. 2019; 54 :56-73.
4. Roesch EA, Nichols DP, Chmiel JF. Inflammation in cystic fibrosis: Na update. *Pediatr Pulmonol*. 2018;53(S3):S30-S50.
5. De Rose V. Mechanisms and markers of airway inflammation in cystic fibrosis. *Eur Respir J*. 2002;19(2):333-340.
- 6- Pincikova T, Paquin-Proulx D, Sandberg JK, Flodström-Tullberg M, Hjelte L. Vitamin D treatment modulates immune activation in cystic fibrosis. *Clin Exp Immunol*. 2017 Sep;189(3):359-371. doi: 10.1111/cei.12984. Epub 2017 May 24. PMID: 28470739; PMCID: PMC5543500.
7. Solomon, M.; Bozic, M.; Mascarenhas, M. R. Nutritional Issues In Cystic Fibrosis. *Clin. Chest Med*. 2016; 37 (1): 97-107.
8. Montazeri-Najafabady N, Dabbaghmanesh MH, Mohammadian Amiri R, Akbarzadeh M. Association of Vitamin D Receptor BsmI Gene Polymorphism with BMD Z-Score in Iranian Children and Adolescents (9 - 18 Years Old). *Int J Endocrinol Metab*. 2019;17(2):e82677

9. Daley T, Hughan K, Rayas M, Kelly A, Tangpricha V. Vitamin D deficiency and its treatment in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2019;18 Suppl 2:S66-S73.
10. Oliveira MS, Matsunaga NY, Rodrigues MLE, et al. Lung disease and vitamin D levels in cystic fibrosis infants and preschoolers. *Pediatr Pulmonol*. 2019;54(5):563-574.
11. Oliveira MS, Matsunaga NY, Rodrigues MLE, et al. Lung disease and vitamin D levels in cystic fibrosis infants and preschoolers. *Pediatr Pulmonol*. 2019;54(5):563-574.
12. Grossmann RE, Zughaier SM, Liu S, Lyles RH, Tangpricha V. Impact of vitamin D supplementation on markers of inflammation in adults with cystic fibrosis hospitalized for a pulmonary exacerbation. *Eur J Clin Nutr*. 2012;66(9):1072-1074. doi:10.1038/ejcn.2012.82
13. Tangpricha V, Kelly A, Stephenson A, et al. An update on the screening, diagnosis, management, and treatment of vitamin D deficiency in individuals with cystic fibrosis: evidence-based recommendations from the Cystic Fibrosis Foundation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(4):1082-1093.
14. Valliant R, Dever JA, Kreuter F. Practical tools for designing and weighting survey samples. Springer New York; 2013. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6449-5>.
15. Filho LVRF, Reis FJC, Maróstica PJC, et al. 2016. Registro Brasileiro de Fibrose Cística (REBRAFC).
16. BRASIL. **Resolução nº 466 de 12 de dezembro de 2012**. Regulamenta pesquisas envolvendo seres humanos. Conselho Nacional de Saúde, Brasília, DF, 12 dezembro de 2012.
17. Fitzpatrick TB. The Validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Arch of Dermatol*. 1988; 124 (6): 869-871.
18. BRASIL. Ministério da Saúde (Brasil). Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Orientações para coleta e análise de dados antropométricos em serviços de saúde: Norma Técnica do Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional - SISVAN.2011. Brasília: Ministério da Saúde.

19. WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity: preventing and managing the global epidemic. 1998. Geneva: WHO.
20. Verly-JR E, Castro MA, Fisberg RM, et al. Precision of usual food Intake Estimates According to the Percentage of Individuals with a second dietary Measurement. *J Acad Nutr Diet* 2012; 112:1015-1020.
21. Ohkawa H; Ohishi N.; Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analyt Biochem.* 1979; 95 (2): 1979.
22. Brand-Williams W; Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Scienc Tech Lebensmittel-Wissenschaft & Tech.* 1995; 28 (1): 25-30.
23. Daley T, Hughan K, Rayas M, Kelly A, Tangpricha V. Vitamin D deficiency and its treatment in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2019; 18:66-S73.
24. Ongaratto R, Rosa KM, Eloi JC, et al. Associação entre hipovitaminose D e frequência de exacerbações pulmonares em crianças e adolescentes com fibrose cística. *Einstein (São Paulo)* .2018; 16 (1): 1-6.
25. Tun, RLC, Porhownik N, Taback S, et al. Effect of high dose vitamin D3 therapy on serum vitamin D3 levels in vitamin D insufficient adults with cystic fibrosis. *Clin Nutr ESPEN.* 2017; 23 (1): 84-88 .
26. Neves JPR, Silva AS, Morais LCSL, et al. Concentrações de 25-hidroxivitamina D e níveis pressóricos em idosos hipertensos. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2012; 56 (7): 415-422.
27. Cabral MA, Borges CN, Maia JM, Aires CA, Bandeira F. Prevalence of vitamin D deficiency during the summer and its relationship with sun exposure and skin phototype in elderly men living in the tropics. *Clin Interv Aging.* 2013; 8(1):1347-1351.
28. Bhimavarapu A, Deng Q, Bean M, Lee N, Ziegler TR, Alvarez J, Tangpricha V. Factors Contributing to Vitamin D Status at Hospital Admission for Pulmonary Exacerbation in

Adults With Cystic Fibrosis. *Am J Med Sci*. 2021 Jan;361(1):75-82. doi:

10.1016/j.amjms.2020.08.020. Epub 2020 Aug 20. PMID: 32988598; PMCID: PMC7855427.

29. McNally P, Coughlan C, Bergsson G, Doyle M, Taggart C, Adorini L, Uskokovic MR, El-Nazir B, Murphy P, Grealley P, Greene CM, McElvaney NG. Vitamin D receptor agonists

inhibit pro-inflammatory cytokine production from the respiratory epithelium in cystic

fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2011 Dec;10(6):428-34. doi: 10.1016/j.jcf.2011.06.013. Epub 2011 Jul

23. PMID: 21784717.

30 Wood LG, Fitzgerald DA, Gibson PG, et al. Oxidative stress in cystic fibrosis: dietary and metabolic factors. *J Am Coll Nutr*. 2001; 20 ([Suppl.]): 157-165.

31 Tangpricha V, Lukemire J, Chen Y, et al. Vitamin D for the Immune System in Cystic Fibrosis (DISC): a double-blind, multicenter, randomized, placebo-controlled clinical trial. *Am J Clin Nutr*. 2019;109(3):544-553.

Tabela 1: Características gerais e *status* de vitamina D em pacientes com Fibrose Císticas no Nordeste do Brasil.

CARACTERÍSTICAS	TOTAL
	N (%)
Número de pacientes	48
SEXO	
Feminino	22 (45,8)
Masculino	26 (54,2)
COR	
Parda	26 (54,2)
Negro	7 (14,6)
Branco	15 (31,3)
Outros	0 (0)
GRAU DE INSTRUÇÃO DOS RESPONSÁVEIS	
Analfabeto	1 (2,1)
Ensino fundamental	19 (40,4)
Ensino médio	18 (38,3)
≥ Graduação	9 (19,2)
FOTO TIPO DE PELE	
Tipo 1	5 (10,4)
Tipo 2	9 (18,8)
Tipo 3	17 (35,4)
Tipo 4	8 (16,7)
Tipo 5	5 (10,4)
Tipo 6	4 (8,3)
STATUS DA 25 OH D*	
EXPOSIÇÃO SOLAR	
< 30 minutos/ dia	30 (62,5)
> 30 minutos/dia	18 (37,5)
STATUS DE 25 (OH) D	
Vitamina D Insuficiente/Deficiente, <30ng/mL	31 (64,6)
Vitamina D Suficiente, ≥30ng/ML	17 (35,4)

Dados apresentados em número (n) e percentual (%). * Parâmetros adotados a partir de Fundação de Fibrose Cística ¹⁸

Tabela 2: Associação entre o *Status* de 25 (OH) D e parâmetros metabólicos em pacientes com Fibrose Cística atendidos no Nordeste do Brasil.

Concentrações séricas da 25-hidroxivitamina D				
	Total das variáveis n=48	Insuficientes /Deficientes ** n= 31	Suficientes ** n= 17	p*
Idade (anos)	14,85 ± 7,04	14,53 ± 7,89	15,03 ± 6,61	0,82
IMC/idade (Kg/m ²)	17,04 ± 4,02	16,19 ± 4,27	17,51 ± 3,62	0,285
Tempo de exposição solar (minutos/dia)	45,2 ± 57,32	48,10 ± 64,33	39,41 ± 42,89	0,54
Vitamina D consumo (mcg)	4,80 ± 2,15	4,400 ± 8,43	5,03 ± 8,74	0,81
Cálcio consumo em mg	1096,80 ± 736,87	10077 ± 638,99	1107,21 ± 7995,00	0,89
Cálcio sérico (mg /dL)	9,52 ± 0,51	9,50 ± 0,65	9,53 ± 0,42	0,85
PTH (mg/dL)	46,17 ± 25,75	44,84 ± 30,46	46,89 ± 23,41	0,80
PCR (mg/dL)	11,25 ± 17,69	11,31 ± 16,40	11,20 ± 18,62	0,98
A1GPA (mg/dL)	115,5 ± 47,47	115,97 ± 50,66	114,21 ± 46,48	0,93
MDA (µmol/L)	3,71 ± 0,92	3,425 ± 0,60	3,870 ± 1,03	0,72
CAOT (%)	18,7 ± 8,47	18,46 ± 8,97	19,25 ± 8,32	0,77

Dados apresentados em média ± Desvio Padrão. * p significativo com $p < 0,05$. ** Parâmetros dotados a partir de Fundação de Fibrose Cística¹⁸. IMC=índice de massa corpora; PCR = Proteína C reativa. A1GPA= alfa 1 glicoproteína ácida; CAOT= capacidade antioxidante total; MDA= malondialdeído. Teste T ou seu corresponde não paramétrico Mann-whitney.

Tabela 3: Modelo de regressão linear múltipla para predição de níveis séricos de 25 (OH)D.

Variáveis	Coefficiente	P	r ²
Modelo 1			
Cálcio sérico	2,395	0,28	
MDA	-3,318	0,14*	
CAOT	-0,150	0,23	0,179
PCR	3,651	0,57	
Modelo 2			
Cálcio sérico	1,465	0,66	
MDA	-3,019	0,04*	
CAOT	-0,109	0,40	0,128
A1GPA	0,034	0,25	
Modelo 3			
Cálcio sérico	0,841	0,69	
MDA	-2,053	0,84	0,098
CAOT	-0,134	0,30	

Modelos de regressão linear múltipla. As variáveis idade e sexo altura e sexo foram inseridas como variáveis de confusão para ajustar os modelos de regressão linear.

*valor significativo, P-valor <0.05. Variável dependente: Vitamina D (25 (OH) D). CAOT= capacidade antioxidante total; MDA= malondialdeído. PCR= Proteína C reativa. A1GPA= alfa 1 glicoproteína ácida.

APÊNDICE B – ARTIGO 2-

Jornal de Pediatria. Qualis - A 3 - fator de impacto- 2,029,

**INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO BSMI DO GENE VDR NOS NÍVEIS DE
VITAMINA D, PERFIL INFLAMATÓRIO E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM
PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA SUPLEMENTADOS COM MEGADOSE DE
VITAMINA D3**

RESUMO

Objetivo: Avaliar a influência do polimorfismo BsmI do gene VDR nos níveis de vitamina D, perfil inflamatório e de estresse oxidativo em pacientes com Fibrose Cística suplementados com megadose de vitamina D3.

Métodos: Realizamos um estudo pré e pós não randomizado de braço único com 17 pacientes de 5 a 20 anos com FC diagnosticados com insuficiência/ deficiência de vitamina D (25 (OH)D < 30 ng/mL). Os indivíduos foram genótipados para o polimorfismo BsmI do gene VDR e todos receberam suplementação de vitamina D3 de 4.000 UI diário para crianças entre 5 e 10 anos e 10.000 UI para maiores de 10 anos por 8 semanas. Foram realizadas entrevistas com dados pessoais, exposição solar, antropométricos e amostras sanguíneas de 25(OH)D, paratormônio, cálcio sérico, PCR-us, A1GPA, CAOT, MDA e função renal e hepática. A avaliação inter e intra grupo foi avaliada por teste t pareado teste de anova ou seus correspondentes não paramétricos.

Resultados: Os indivíduos foram em sua maioria do sexo masculino e não relataram efeitos adversos ao uso da suplementação, 64 % obtiveram níveis de 25 (OH)D > 30 ng/mL. Os pacientes com os genótipos BB e Bb apresentaram aumento dos níveis séricos de 25 (OH)D. O grupo com genótipo BB demonstrou redução do A1GPA. E os indivíduos com genótipo bb apresentaram níveis elevados de MDA comparado ao momento pré intervenção.

Conclusão: Conclui-se que as variações do polimorfismo BsmI do gene VDR apresentam diferentes respostas nos níveis de vitamina D e marcadores de inflamação e estresse oxidativo.

Palavras chave: vitamina D, Polimorfismo de Nucleotídeo Único, fibrose cística

INTRODUÇÃO

A Fibrose Cística (FC) é a doença hereditária causada por um defeito no gene regulador da Condutância Transmembrana da Fibrose Cística (CFTR). Quando o CFTR está ausente ou não funciona adequadamente, ocorre acúmulo de muco viscoso no trato pulmonar e gastrointestinal. Além do muco denso, a disfunção de CFTR no epitélio brônquico também leva ao aumento da resposta inflamatória e de estresse oxidativo, diminuição da resposta imune e equilíbrio antioxidante prejudicado [1].

A produção de muco viscoso atinge os ductos pancreáticos e biliares, ocasionando obstrução crônica desses dutos, levando à pancreatite crônica e insuficiência exócrina. A perda da função exócrina levará à má absorção de gordura e à deficiência de vitaminas solúveis em gordura, incluindo vitamina D [2].

A vitamina D é uma vitamina lipossolúvel que é metabolizada em um hormônio secosteróide produzido endogenamente na pele, essencial para mineralização óssea e homeostase do cálcio [3]. Evidências atuais mostraram funções extra esqueléticas da vitamina D [4;5;6]. Alguns estudos sugeriram papel vital da vitamina D na FC com efeito na saúde respiratória [6], infecções pulmonares [7], controle da inflamação e na manutenção do equilíbrio no sistema imunológico [8].

O estudo Grossman et al [9] demonstraram uma associação entre altas doses de vitamina D suplementação para pacientes com FC com exacerbações pulmonares (PEs) e diminuição de fatores pró-inflamatórios, como fator de necrose tumoral- α e interleucina (IL) 6. Porém os estudos com marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo nesta população são escassos e não há uma padronização de doses e tempo de intervenção e a influência de polimorfismos no receptor da vitamina D (VDR) sobre o efeito no aumento dos níveis séricos de 25 (OH) D e clínicos [10].

A vitamina D biologicamente ativa (calcitriol) precisa do receptor intracelular VDR para atuar como regulador na transcrição de genes. Evidências recentes mostraram que polimorfismos no gene VDR pode influenciar a resposta da suplementação de vitamina D e efeitos clínicos em outras populações [11;12]. Mohseni et al [11] não encontraram associação dos polimorfismos BsmI, FokI, ApaI e Taq com marcadores de inflamação (TNF- α , TGF- β 1),

porém, encontraram que os níveis séricos de CAOT dos participantes com os genótipos TT / Tt, Ff foram mais responsivos à suplementação. Portanto, a relação entre a influência do polimorfismo do gene VDR ainda é controversa e necessita ser estudada em outras populações, incluindo na FC.

O presente estudo avaliou a influência do polimorfismo BsmI do gene VDR nos níveis de vitamina D, processo inflamatório e estresse oxidativo em pacientes com Fibrose Cística suplementados com megadose de vitamina D3.

MÉTODOS

Amostra

O estudo foi conduzido com 17 pacientes por pacientes de 05 a 20 anos de idade com diagnóstico de FC com insuficiência/ deficiência de Vitamina D, de acordo com os critérios adotados pela Fundação de Fibrose Cística [10] acompanhados em dois ambulatórios de tratamento e acompanhamento, o ambulatório do Hospital Universitário Lauro Wanderley (HULW), localizado em João Pessoa- PB, e o Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP), localizado em Recife- PE.

Foram considerados como critérios de inclusão: indivíduos sem uso de suplementação com megadose de vitamina D, que não tivesse indicação de insuficiência renal ou hepática e que não estivessem na fila para transplante. Foram excluídas do estudo os participantes que não concluíram o período de suplementação, não realizaram os exames bioquímicos após o período de suplementação.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do HULW e do IMIP, sendo aprovado em ambos os centros sob o protocolo do CAE: 87354018.1.0000.5183 e número do CAE: 12994619.6.1001.5201, respectivamente. Todos os participantes da pesquisa assinaram do termo de consentimento livre e esclarecido e do termo de assentimento livre e esclarecido. O estudo foi submetido e aprovado no Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos (REBEC) com número: RBR-104yt7rh.

Desenho do Estudo e protocolo de suplementação

Este foi um ensaio clínico de 8 semanas conduzido para avaliar o efeito variação dos genótipos do polimorfismo BsmI do gene VDR nos níveis de 25 (OH)D, processo inflamatório e estresse oxidativo. No momento inicial foram recrutados 48 pacientes, onde foi realizada a aplicação de um questionário para a coleta de informações sobre fototipo de pele e exposição solar, dados antropométricos, consumo alimentar e coleta sanguínea basal para análise dos níveis séricos de 25 hidroxivitamina D (25(OH)D), hormônio paratireóide (PTH), proteína C reativa ultrasensível (PCR-us), alfa 1 glicoproteína ácida (A1GPA), capacidade antioxidante total (CAOT), malondialdeído (MDA), alanina transaminase (ALT), aspartato transaminase (AST), ureia, creatinina, e cálcio e poliformorfismo BsmI do gene VDR.

Após o diagnóstico de insuficiência/deficiência de 25(OH)D, 31 pacientes que foram identificados, após os critérios de exclusão e perdas concluímos o estudo com 17 pacientes. Eles foram alocados em 3 grupos de acordo com genótipo do polimorfismo BsmI do gene VDR, sendo todos os grupos suplementados com megadoses de vitamina D3 (colecalfiferol) em veículo oleoso, diariamente, durante oito semanas. Foram sugeridas aos participantes que fizessem uso da suplementação junto da refeição e após uso de enzima pancreática para que os que já faziam uso. As doses foram oferecidas de acordo com a idade do paciente: 4000 UI/diário para pacientes de 5 a 10 anos ou 10.000 UI/dia para os maiores de 10 anos de idade, adolescentes e adultos, conforme as recomendações da *Cystic Fibrosis Foundation* [10]. Após 8 semanas de intervenção, todos os participantes foram solicitados a retornar para serem reavaliados quanto às variáveis antropométricas, de consumo de bioquímica. O fluxograma do desenho do estudo está apresentado na figura 1.

Fototipo de pele e exposição solar:

O fototipo de pele foi estratificado de acordo com a classificação de Fitzpatrick [13], que estima a tolerância da pele à luz ultravioleta com base em entrevista pessoal, sendo classificado de I a VI variando da cor branca (I) a cor negra (VI). A exposição à luz solar foi definida pelo tempo médio de exposição solar e classificadas como 0<15 minutos. 15- 30 minutos e > 30 minutos.

Avaliação antropométrica e de consumo alimentar

Os participantes foram pesados em balança antropométrica digital, estando o paciente posicionado de pé, de forma ereta no centro do equipamento, de costas para a balança, com pés juntos, descalço, vestindo roupas leves, e os braços estendidos ao longo do corpo. Para a aferição da altura os pacientes foram posicionados em posição ortostática, em apneia respiratória, descalços, sem adornos na cabeça. A classificação do estado nutricional foi realizada utilizando-se os indicadores Peso/idade, IMC/idade e altura idade, avaliado de acordo com as curvas da OMS-2006/2007 para os pacientes de 5 a 18 anos. Para classificação dos pacientes adultos (maiores de 18 anos e menores de 60 anos), foram utilizados os valores propostos pela *World Health Organization* [14]

A ingestão do consumo de vitamina D foi avaliado, por meio da aplicação de um recordatório de 24 horas com todos os participantes antes do início da suplementação e após o término das 8 semanas. A ingestão de vitamina D foi calculada utilizando-se o software *Virtual Nutri plus*. Foi utilizado o método de nutrientes residuais (*MSM*) para controlar o efeito do consumo de energia intrapessoal na avaliação dos micronutrientes.

Análise bioquímica:

Foram coletados aproximadamente 20 ml de sangue dos pacientes em jejum de 8 a 12 horas, informado com antecedência, por equipe treinada em cada polo. Os níveis séricos de 25- hidroxivitamina D (25(OH)D), hormônio Paratireóide (PTH) e cálcio foram realizados por imunoenensaio quimioluminescente (Liaison XL Diasorin).

A classificação dos níveis de vitamina D foi realizada com base nos valores de referência usados pela Fundação de Fibrose Cística [12]. Considerando níveis suficientes acima de 30,0 ng / mL e insuficiência de níveis de 25 (OH) D abaixo de 30,0 ng / mL e deficiência abaixo de 20,0 ng/mL.

Os marcadores inflamatórios (Proteína C Reativa ultrasensível (PCR-us) alfa-1-glicoproteína ácida (A1GPA) foram analisados pelo método imunquímica de turbidimotria. Para análise de estresse oxidativo foi por meio da avaliação de um marcador oxidante, o Malondialdeído (MDA), analisada pelo método da reação do ácido tiobarbitúrico (TBARS) e a capacidade antioxidante total (CAOT), analisada pelo método do DPPH [15;16].

Foram realizados ainda exames para avaliar a função hepática (alanina transaminase (ALT), aspartato transaminase (AST)), a função renal (ureia, creatinina, ácido úrico), afim de avaliar pacientes em critérios de inclusão.

Determinação do genótipo BsmI do gene VDR por PCR/RFLP:

Para extração do DNA as amostras foram diluídas em uma primeira solução de lise, seguida de centrifugação para descarte de sobrenadante. Esse processo foi repetido por 3 vezes no intuito de obter um precipitado de leucócitos livre de resquícios de hemoglobina. Logo após as amostras passaram por processo de lise e posterior precipitação do DNA.

Os genótipos foram determinados por PCR-RFLP, utilizando-se os iniciadores: 5'-CAACCAAGACTACAAGTACCGCGTCAGTGA-3' (sense) e 5'-AACCAGCGGGAA GTCAAGGG-3' (antisense) [17] para amplificação. O produto de 825 pb foi digerido com BsmI que reconhece e cliva o alelo polimórfico b gerando dois fragmentos (650 pb e outro de 175 pb), enquanto o alelo ancestral B permanece com 825 pb. Os genótipos foram analisados através de eletroforese em gel de poliacrilamida 10% e coloração com nitrato de prata 0,5%.

Análise estatística:

Os dados estão apresentados como média e desvio padrão da média. As análises de normalidade e homogeneidade de variância foram realizadas por meio dos testes de Kolmogorov Smirnov. Os dados foram relatados como média (intervalo de confiança de 95%) e mediana (máximo - mínimo), uma vez que algumas variáveis não tiveram distribuição normal. O teste T pareado foi utilizado para avaliar possíveis diferenças entre os momentos pré e pós-intervenção. Quando necessário os testes T independente e pareado foram substituídos pelos seus equivalentes não paramétricos Mann-Whitney e Wilcoxon, respectivamente.

Para as variáveis contínuas comparadas entre os momentos iniciais e finais e os grupos, foi utilizada ANOVA One Way para dados paramétricos e Kruskal -Wails Post teste n paramétrico Dunns ou Tukey. A significância estatística foi determinada como $p < 0,05$. A análise estatística foi realizada por meio do software computacional Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

RESULTADOS

A características basais dos pacientes antes da suplementação são mostradas na tabela 1. Os participantes foram em sua maioria do sexo masculino, mas não houve diferença nos níveis de vitamina D e os outros marcadores estudados quanto ao sexo. No geral os participantes do estudo apresentaram baixa exposição solar e foto tipo de pele classificados como pele muito clara e clara. Quanto ao estado nutricional, mais de 40 % apresentaram classificação de baixo peso. A Ingestão alimentar de vitamina D teve média de $2,72 \pm 2,51$ antes no início da suplementação não apresentou alteração durante o período de intervenção ($p= 0,78$) e não foi relatada a ingestão de alimentos enriquecidos com a vitamina D.

A comparação das mudanças nas variáveis antes e depois da suplementação estão apresentadas na figura 2. Os níveis basais de 25 (OH)D variam de 12,7 a 29,70 ng/mL (média, $21,07 \pm 5,26$) e atingiram uma média de $38,29 \pm 16,34$ ng/mL com variação de 15,50 a 80,0 ng/mL. 64 % dos pacientes atingiram níveis de 25 (OH) D maior que 30 ng/mL após o período de suplementação. Foram encontradas variações interindividuais nas variáveis de estresse oxidativo demonstrados na figura 2.

Os valores basais foram semelhantes entre nos grupos antes e após a intervenção os participantes não apresentaram diferenças estatisticamente significantes para ALT, AST, ureia, creatinina e ácido úrico (dados não demonstrados). Além disso, não houve relatos de sintomas de eventos adversos pelo uso da vitamina D, conforme avaliado pelo questionário dos pacientes antes, durante e após as 8 semanas de suplementação, nenhum sinal clínico de hipercalcemia, alteração significativa de cálcio sérico médio ou nas concentrações de PTH.

Quanto ao polimorfismo BsmI do gene VDR, o genótipo bb foi menos frequente (29,4 %). Após a suplementação, os grupos com genótipos BB e Bb apresentaram um incremento nos níveis séricos de 25(OH)D significativamente superior ($p < 0,05$) na avaliação intra grupo, o que não foi observado no grupo com genótipo bb ($p = 0,05$). Não foram observadas diferença entre os grupos em relação aos níveis séricos de vitamina D.

Quanto a avaliação intra grupos para os marcadores de estresse oxidativo e processo inflamatório, o grupo BB apresentou-se mais responsivo ao reduzir significativamente os níveis de A1GPA ($p < 0,05$) após a intervenção. Já o grupo com genótipo bb apresentaram

valores aumentados de MDA após o período de suplementação. As demais variáveis não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os genótipos (Tabela 3).

DISCUSSÃO

Os dados obtidos neste estudo demonstraram que os diferentes genótipos do polimorfismo BsmI do gene VDR pode ter influência nos níveis séricos de 25 (OH)D e marcadores de processo inflamatório e estresse oxidativo em pacientes suplementados com megadose de vitamina D3. Os pacientes FC com BB e Bb apresentaram-se mais responsivas a suplementação para os níveis séricos de 25(OH)D. O grupo com genótipo BB foi mais responsivos após a suplementação de vitamina D com diminuição dos níveis de A1GPA. O grupo bb não apresentou diferença estatisticamente significativa nos valores de 25(OH) D após o período de suplementação e foi observado aumento de MDA comparado ao estado pré suplementação.

A deficiência de vitamina D é comum em indivíduos com FC devido à absorção prejudicada de vitaminas lipossolúveis por conta da insuficiência pancreática exócrina, nesse sentido a Diretriz Brasileira de Fibrose Cística [18] sugere a suplementação de rotina de 800 a 2000 UI para crianças, adolescentes e adultos. No entanto, mesmo com a suplementação de regimes multivitamínicos lipossolúveis padrão, muitos indivíduos permanecem deficientes em vitamina D [19], sendo proposto suplementação altas doses de Colecalciferol (D3) [20].

A Fundação de Fibrose Cística no seu último documento de atualização recomendou que todos os indivíduos com FC com mais de 12 meses com níveis de 25 (OH) D inferior a 30 ng/ml (< 75 nmol/litro) sejam suplementados com dose máxima diária de 4000 UI/dia para crianças até 10 anos e até 10.000 UI/dia para maiores de 10 anos [10] e sugere o estudo e a influência dos polimorfismos genéticos no *status* da vitamina D [21]. O presente estudo encontrou diferenças nas médias de 25(OH)D comparando antes e após a suplementação.

O estudo atual demonstrou que a variação genética do polimorfismo BsmI do gene VDR é um fator que pode influenciar a responsividade aos níveis de vitamina D, marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo após a suplementação com vitamina D. Outros pesquisadores tem encontrado essa relação em outras populações [12; 22]. Até o momento o presente estudo é pioneiro em avaliar a influência do polimorfismo BsmI do gene VDR nos níveis de 25 (OH) e marcadores de estresse oxidativo e processo inflamatório, em pacientes com. FC.

Calvacanti, et al. [12] suplementaram megadose única de 200.000 UI e encontraram uma respostas diferentes de acordo com os genótipos do polimorfismo BsmI do gene VDR. As idosas suplementadas com genótipo BB/Bb apresentaram um incremento nos níveis séricos de 25(OH)D significativamente superior, não sendo observado no grupo bb, além disso o grupo BB/Bb foi mais responsivo nos efeitos clínicos, reduzindo PCR e A1GPA. Em relação a responsividade dos níveis de 25 (OH)D após a suplementação, estes dados corroboram como nosso estudo onde os pacientes com genotípicos BB e Bb tiveram acréscimo nos níveis de 25 (OH)D após o período de intervenção, e o grupo BB foi mais responsivo a suplementação reduzindo os níveis do marcador inflamatório A1GPA. Em contrapartida o grupo do genótipo bb apresentaram níveis elevados de MDA após a suplementação e não houve influência nos valores de PCR em nosso estudo.

Existem muitos fatores que podem contribuir para um estado aumento de estresse oxidativo e proteção antioxidante prejudicada na FC, uma vez que a doença comina com aumento de produção de radicais livres (ROS) e intensa inflamação recorrente nas vias aéreas [23]. Além disso, as evidências indicam que biomarcadores circulantes da capacidade antioxidante são reduzidos e o estresse oxidativo em pacientes com FC clinicamente estáveis [24;25]. Os resultados encontrados demonstraram que não foi observado uma influência do polimorfismo na resposta antes e depois da suplementação no CAOT e somente o grupo bb houve aumento de MDA comparado ao período pré suplementação.

A fim de avaliar a influência dos polimorfismos do gene VDR e marcadores de estresse oxidativo, Monsehi, et al. [26] suplementaram mulheres com câncer de mama com 50.000 UI de vitamina D3 semanais durante 8 semanas e encontraram um níveis significativamente maiores de 25 (OH)D nos indivíduos com os genótipos ff / Ff, TT / Tt e Bb pós-intervenção nos polimorfismo FokI , Taq I e Bsmi respectivamente. Em contraste com esse resultado, Al-Ghafari et al. [27] observaram que os polimorfismos BsmI e Fok I do gene VDR não afetaram os níveis séricos de 25 (OH) D. Recentemente Kazemian, et al. [28] após a suplementação de megadose de vitamina D mostraram que os genótipos bb de BsmI no gene VDR teve o maior incremento nos níveis de 25 (OH) D, observou-se ainda que apesar da alteração no plasma de MDA, CAOT, SOD, não houve associação associações com polimorfismo do VDR. Nesse sentido diante dos resultados divergentes em estudos em populações diferentes, mais estudos são necessários para avaliar a influência do polimorfismo e papel da vitamina D como papel antiinflamatório e antioxidante.

De forma pioneira, os nossos dados indicam que alterações nos níveis de vitamina D, marcadores de inflamação e estresse oxidativo em pacientes com FC suplementados com megadose de vitamina D3 podem ser influenciados pela variação polimorfismo do gene VDR. No entanto, algumas limitações do estudo como a falta do grupo controle sugerem a realização de estudos duplo cego para avaliar o efeito da suplementação e estudos com outros polimorfismos do gene VDR para melhor compreensão da influência desses polimorfismos nos resultados clínicos em pacientes com FC.

CONCLUSÃO

Os resultados encontrados sugerem que as variações do polimorfismo BsmI do gene VDR apresentaram diferentes respostas nos níveis de vitamina D e marcadores de inflamação e estresse oxidativo em pacientes com FC suplementados com megadose de vitamina D3 sem que houvesse toxicidade pelo uso de uma megadose de vitamina D.

REFERÊNCIAS

- [1] Bielaagh MC, Muilwijk D, Beekman JM, Van CK. A new era for people with cystic fibrosis. *Eur J Pediatr.* 2021; 180 (9): 2731-2739.
- [2] Mark FJ, Orsolva A, David N, Zsolt S, Szabolcs K et al. Review Vitamin D supplementation in patients with cystic fibrosis: A systematic review and meta-analysis. *J Of Cystic Fibrosis.* 2020; 16: 36.
- [3] Chesdachai S, Tangpricha V. Tratamento da deficiência de vitamina D na fibrose cística . *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2016; 164: 36-39.
- [4] Wimalawansa SJ. Non-musculoskeletal benefits of vitamin D. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2018; 175 : 60–81.
- [5] Gil A, Plaza-Diaz J, Mesa M, D: Vitamin D: Classic and Novel Actions. *Ann Nutr Metab* 2018; 72:87-95.
- [6] Ongaratto R, Rosa KMD, Eloi JC, Epifanio M, Marostica P, Pinto LA. Associação entre hipovitaminose D e frequência de exacerbações pulmonares em crianças e adolescentes com fibrose cística. *Einstein (São Paulo).* 2018; 16 (1) : 1-6.

- [7] McCauley LA, Thomas W, Laguna TA, Regelman WE, Moran A, Polgrenn LE. Vitamin D deficiency is associated with pulmonary exacerbations in children with cystic fibrosis. *Ann Am Thorac Soc.* 2014; 11: 198-200.
- [8] Simoneau T, Sawicki GS, Milliren CE, Feldman HA, Gordon CM. A randomized clinical trial of vitamin D replacement strategies in pediatric CF patients. *J Cyst Fibros.* 2016; 15: 234-241.
- [9] Grossmann RE, Zughaier SM, Liu S, Lyles RH, Tangpricha V. Impact of vitamin D supplementation on markers of inflammation in adults with cystic fibrosis hospitalized for a pulmonary exacerbation. *Eur J Clin Nutr.* 2012;66(9):1072-1074.
- [10] Tangpricha V, Kelly A, Stephenson A, Maguiness K, Enders J, Robinson KA. Et al. Cystic Fibrosis Foundation Vitamin D Evidence-Based Review Committee. An update on the screening, diagnosis, management, and treatment of vitamin D deficiency in individuals with cystic fibrosis: evidence-based recommendations from the Cystic Fibrosis Foundation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(4):1082-93.
- [11] Montazeri-Najafabady N, Dabbaghmanesh MH, Mohammadian Amiri R, Akbarzadeh M. Association of Vitamin D Receptor BsmI Gene Polymorphism with BMD Z-Score in Iranian Children and Adolescents (9 - 18 Years Old). *Int J Endocrinol Metab.* 2019; 23;17(2):e82677.
- [12] Cavalcante IG, Silva AS, Costa MJ, Persuhn DC, Issa CT, de Luna Freire TL, et al. Effect of vitamin D3 supplementation and influence of BsmI polymorphism of the VDR gene of the inflammatory profile and oxidative stress in elderly women with vitamin D insufficiency: Vitamin D3 megadose reduces inflammatory markers. *Exp Gerontol.* 2015 ; Jun; 66:10-6.
- [13] Fitzpatrick TB. The Validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Arch of Dermatol.*1988; 124 (6): 869-871.
- [14] WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Geneva: WHO, 1998.
- [15] Ohkawa H; Ohishi N; Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analyt Biochem.* 1979; 95 (2) : 351- 358 .
- [16] Brand-williams W; Cuvelier ME.; Berset, c. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Scienc Tech Lebensmittel-Wissenschaft & Tech.*1995; 28 (1): 25-30.

- [17] Pani MA, Knapp M, Donner H, Braun J, Baur MP, Usadel KH, Badenhoop K. Vitamin D receptor allele combinations influence genetic susceptibility to type 1 diabetes in Germans. *Diabetes*. 2000 ;49(3):504-7.
- [18] Athanazio RA, Silva Filho LVRF, Vergara AA, Ribeiro AF, Riedi CA, Procianoy EDFA, et al. Brazilian guidelines for the diagnosis and treatment of cystic fibrosis. *J Bras Pneumol*. 2017 May-Jun;43(3):219-245.
- [19] Daley T, Hughan K, Rayas M, Kelly A, Tangpricha V. Vitamin D deficiency and its treatment in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2019; 18:66-S73.
- [20] Chesdachai S, Tangpricha V. Treatment of vitamin D deficiency in cystic fibrosis. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2016; 164:36-39.
- [21] Juhász MF, Varannai O, Németh D, Szakács Z, Kiss S, Izsák VD, Martonosi ÁR, Hegyi P, Párniczky A. Vitamin D supplementation in patients with cystic fibrosis: A systematic review and meta-analysis. *J Cyst Fibros*. 2020;18:S1569-1993.
- [22] Abu-Fraiha Y, Elyashar-Earon H, Shoseyov D, Cohen-Cymberknoh M, Armoni S, Kerem E, et al. Increasing Vitamin D Serum Levels Is Associated With Reduced Pulmonary Exacerbations in Patients With Cystic Fibrosis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2019 Jan;68(1):110-115.
- [23] [Serrano JC](#), [De Lorenzo D](#), [Cassanye A](#), [Martín-Gari M](#), [Espinel A](#), [Delgado MA](#), et al. Vitamin D receptor BsmI polymorphism modulates soy intake and 25-hydroxyvitamin D supplementation benefits in cardiovascular disease risk factors profile. [Genes Nutr](#) 2013;8:561-9.
- [24] Sadowska-Woda I, Rachel M, Pazdan J, Bieszczad-Bedrejczuk E, Pawliszak K. Nutritional supplement attenuates selected oxidative stress markers in pediatric patients with cystic fibrosis. *Nutr Res*. 2011 Jul;31(7):509-18.
- [25] Causer AJ, Shute JK, Cummings MH, et al. Circulating biomarkers of antioxidant status and oxidative stress in people with cystic fibrosis: A systematic review and meta-analysis. *Redox Biol*. 2020;32:101436.
- [26] Mohseni H, Hosseini SA, Amani R, Ekrami A, Ahmadzadeh A, Latifi SM. Circulating 25-Hydroxy Vitamin D Relative to Vitamin D Receptor Polymorphism after Vitamin D3

Supplementation in Breast Cancer Women: A Randomized, Double-Blind Controlled Clinical Trial. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2017 Jul 27;18(7):1953-1959.

[27] Al-Ghafari AB, Balamash KS, Al Doghaither HA. Relationship between Serum Vitamin D and Calcium Levels and Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms in Colorectal Cancer. *Biomed Res Int.* 2019 Aug 26;2019:8571541.

[28] Kazemian E, Akbari ME, Moradi N, et al. Vitamin D Receptor Genetic Variation and Cancer Biomarkers among Breast Cancer Patients Supplemented with Vitamin D3: A Single-Arm Non-Randomized Before and After Trial. *Nutrients.* 2019;11(6):1264.

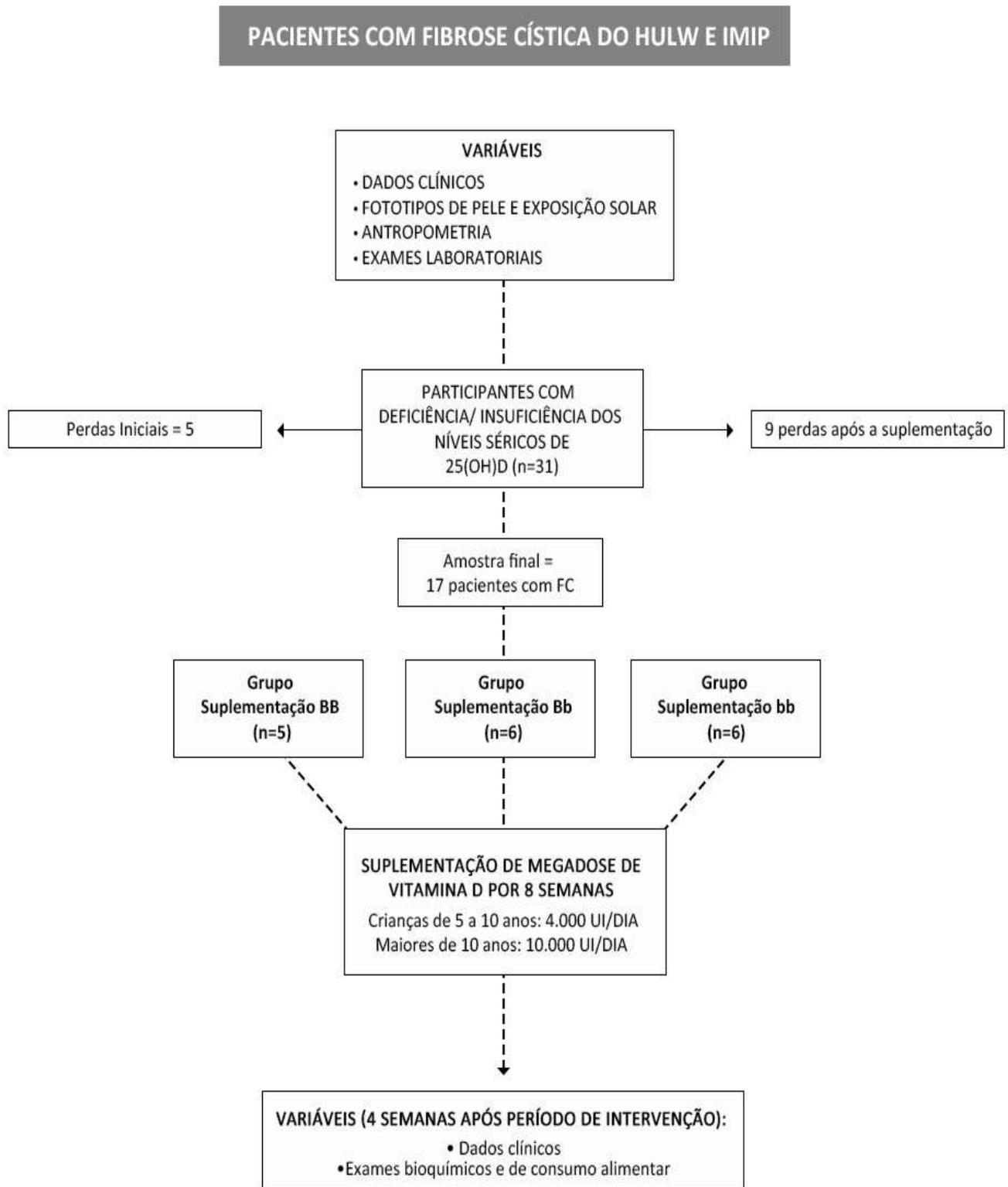
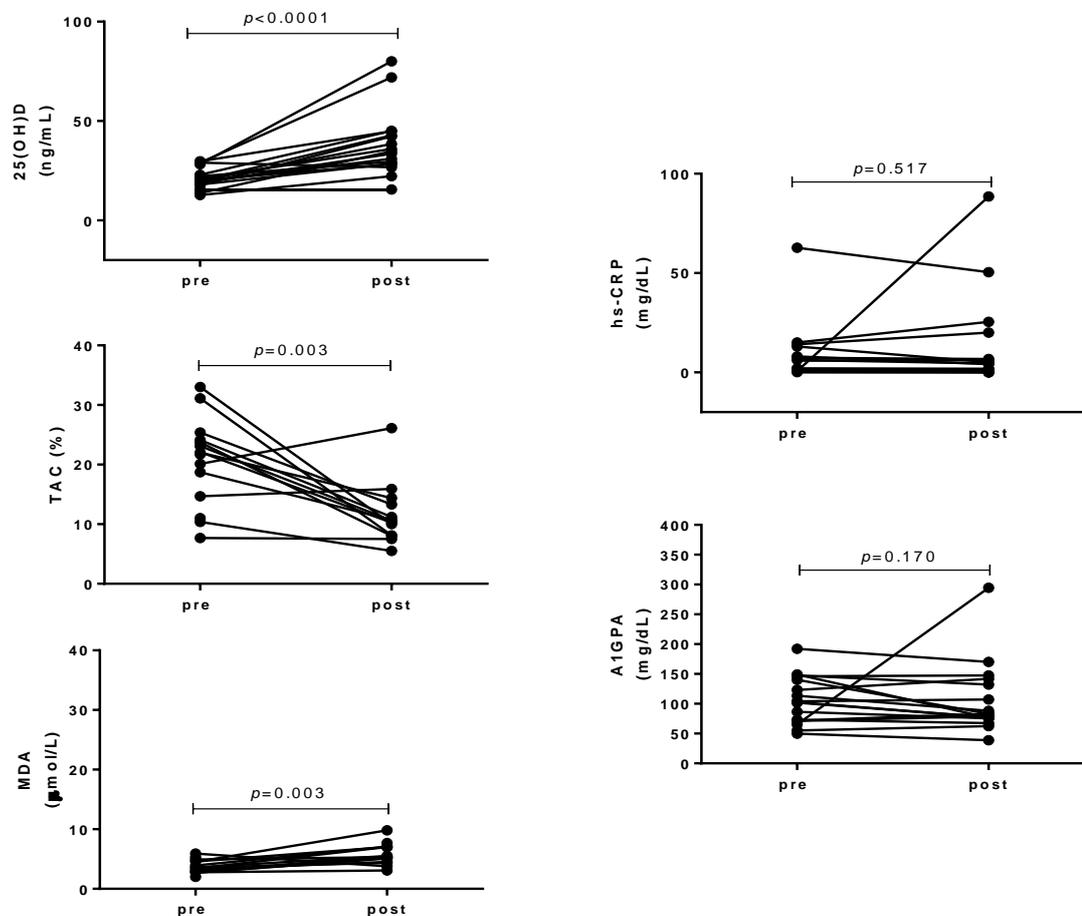
Figura 1: Fluxograma do estudo

Tabela 1 – Características gerais dos pacientes com Fibrose Cística atendidos pelos Hospitais de referência no Nordeste do Brasil, com deficiência e/ou deficiência de vitamina D

Variáveis	Valores
	N (%) ou M ± DP
(N= 17)	
Sexo	
Masculino	12 (70,6)
Feminino	5 (29,4)
Idade (anos)	14,53 ± 3,55
Uso de repositor enzimático	
Sim	15 (88,2)
Não	2 (11,8)
Sintoma após uso da suplementação	
Não	17 (100)
Exposição solar	
0 a 15 minutos /dia	8 (47,1)
Entre 15 e 30 minutos	2 (11,8)
>de 30 minutos /dia	7 (41,2)
Fototipo de pele	
I, II e III	11 (67,7)
IV, V e VI	6 (33,3)
IMC (Kg/m²)	
Baixo peso	7 (41,2)
Eutrofia	10 (58,8)
VITAMINA D Consumo (mcg)	
	2,72 ± 2,51
25 (OH)D (ng/mL)*	
	20 (12,70-29,70)
Polimorfismo BsmI	
Genótipo BB	5 (29,4 %)
Genótipo Bb	6 (35,3 %)
Genótipo bb	6 (35,3%)

Dados descritos como média ou percentil. Os dados são apresentados em média ± desvio padrão. Os dados não paramétricos são apresentados em mediana, mínimo e máximo. IMC – Índice de massa corpórea. * dado não paramétrico apresentado em media (mínimo- máximo).

Figura 2: Representação das mudanças nos níveis de 25 (OH)D, marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo antes e depois da suplementação de megadose de vitamina D3 por 8 semanas, em pacientes com Fibrose Cística atendidos nos hospitais de referência no Nordeste do Brasil



Dados descritos como média \pm desvio padrão da média. PCR-us- proteína C reativa; A1GPA- Alfa 1 glicoproteína ácida CAOT- capacidade antioxidante total; MDA- Malondialdeído.

Teste t pareado ou Wilcoxon. *P significativo < 0,05. "

Tabela 3: Influência do polimorfismo BsmI do gene VDR sobre os níveis de vitamina D, processo inflamatório e estresse oxidativo em pacientes com Fibrose Cística suplementados com megadose de vitamina D3 por 8 semanas.

Variáveis	BB N=5	Bb N=6	bb N=6	f/k	P-valor
25-Hidroxitamina D					
Pré	24,18 (±4,85)	19,88 (± 5,10)	19,57 (±5,47)	1,29	0,30
Pós	45,50 (± 15,87) ^a	32,70 (± 5,97) ^a	37,88 (±22,98)	0,82	0,46
Cálcio total					
Pré	9,20 (±0,26)	9,90 (±0,25) [#]	9,23 (±0,35) [*]	10,07	<0,05
Pós	9,10 (±0,21)	12,20 (±5,73)	9,14 (±0,39)	1,49	0,26
PTH					
Pré	56,25 (± 21,69)	42,55 (± 18,43)	40,72 (± 10,38)	1,16	0,34
Pós	49,45 (± 19,31)	44,31 (± 19,69)	41 (± 22,00)	0,20	0,81
CAOT					
Pré	20,82 (±8,04)	17,67 (±6,59)	21,84(±8,33)	0,46	0,63
Pós	10,82(±3,71)	13,77(±7,31)	14,19(±10,02)	0,24	0,78
MDA					
Pré	3,60 (±1,18)	4,08 (±1,26)	3,36 (±0,69)	0,61	0,55
Pós	6,15 (± 1,56)	4,96 (±1,37)	6,53 (± 2,18) ^a	1,18	0,34
PCR †					
Pré	5,92 (0,18-8,0)	4,47 (0,10-14,16)	1,51 (0,21-62,78)	0,57	0,57
Pós	4,100 (0,07-6,220)	2,85 (0,16-20,0)	13,45(0,02-88.50)	2,17	0,15
AGPA					
Pré	102,8(49,70-140,0)	125,1(55,30-149,1)	79,25(65,50-192,2)	0,12	0,87
Pós	77,50 (38,70-88,10) ^a	91,90(62,40-147,4)	112,4(75,60-294,6)	2,07	0,16
TGO					
Pré	25,20 (±3,83)	26,33 (±5,68)	23,83 (±6,61)	0,29	0,74
Pós	22,00 (±2,91)	29,55 (±9,76)	24,50 (±7,96)	1,40	0,27
TGP †					
Pré	26 (13-31)	24,50 (10-41)	20,50 (15-84)	0,16	0,93
Pós	15 (12-23)	25 (15-58)	16 (13-53) ^a	2,82	0,25
Ureia					
Pré	23,20 (± 4,65)	21,33 (± 4,41)	22,17 (±6,36)	0,17	0,84
Pós	22,89 (7,12±)	21,73 (± 4,72)	19,17 (±5,11)	0,61	0,55
Creatinina†					
Pré	0,80 (0,50-0,80)	0,54 (0,30-1,00)	0,55 (0,49-0,80)	0,73	0,49
Pós	0,70 (0,40-0,90)	0,57 (0,40-0,90)	0,70 (0,50-0,80)	0,27	0,76

† non-parametric data ;

a $p < 0.05$ pre vs. Post

* < 0.05 BB vs. Bb

$p < 0,05$ Bb vs bb

Para comparação intra grupo foi Teste T pareado para dados paramétricos. Para comparação entre grupo foi utilizada ANOVA one way para dados paramétricos e kruskal -wallis Post teste n paramétrico Dunns ou Tukey.

APÊNDICE C- OUTROS RESULTADOS

Tabela 1: Percentual da frequência genotípica e alélica do polimorfismo e sua associação com *status* de vitamina D (25(OH)D) de pacientes com Fibrose Cística atendidos no Nordeste do Brasil.

Distribuição dos genótipos n (%)		Prevalência n (%)	
BsmI (rs 1544410 A>G)			
BB		15 (31,3)	
Bb		18 (37,5)	
Bb		15 (31,3)	
Alelo B		24 (50%)	
Alelo b		24 (50%)	
Genótipos ^γ	Concentrações séricas da 25-hidroxivitamina D suficientes*	Concentrações séricas de 25-hidroxivitamina D insuficientes /deficientes *	p **
	N= 17	N= 31	
BB	6 (35,29)	9 (29,03)	0,90
Bb	6 (35,29)	12 (38,71)	
Bb	5 (29,42)	10 (32,26)	

Dados apresentados em número (n) e percentual (%). ^γ dados apresentados com teste qui quadrado. **Valor significativo $p < 0,05$. * Parâmetros adotados a partir de Fundação de Fibrose Cística (2012) e MAEDA *et al.* (2014).

Tabela 2: Associação entre fatores associados e os parâmetros metabólicos e distribuição genotípica do polimorfismo BsmI (rs1544410) do gene VDR, em pacientes com Fibrose Cística atendidos no Nordeste do Brasil.

	Alelo BB/Bb	Alelo bb	P*
	N= 33	N=15	
Idade (anos)	15,09± 7,94	14,29± 4,15	0,72
IMC/idade (Kg/m ²)	17,11± 4,02	16,88± 4,16	0,85
Tempo de exposição solar (minutos/dia)	48,70 ± 63,17	36,93 ± 42,99	0,77
Vitamina D consumo	27, 4,400 ± 8,43	24,22± 7,71	0,30
Cálcio consumo em mg	1114,00 ± 759,0	1055,01 ± 705,02	0,79
Cálcio (mg / dL)	9,62 ±0,52	9,27 ± 0,40	0,25
Vitamina D (mg/dL)	27,38 ± 6,67	24,22 ± 33,84	0,161
PTH (mg/dL)	46,21 ± 27,78	46,08 ±18,62	0,98
PCR (mg/dL)	8,16 ± 13,68	18,73 ±	0,13
A1GPA (mg/dL)	112,46 ± 42,04	121,48 ± 59,99	0,614
MDA (μmol/L)	3,70 ±0,98	3,57 ±0,75	0,482
CAOT (%)	19,51 ± 8,54	17,63 ± 8,45	0,502

Dados apresentados em média ± Desvio Padrão. * p significativo com $p < 0,05$. IMC=índice de massa corpora; PCR = Proteína C reativa. A1GPA= alfa 1 glicoproteína ácida; CAOT= capacidade antioxidante total; MDA= malondialdeído. Teste T ou seu corresponde não paramétrico Mann-whitney .

Tabela 3: Consumo Alimentar Habitual De Alimentos Fontes pacientes com Fibrose Císticas no Nordeste do Brasil.

ALIMENTO	FREQUÊNCIA N (%)
Número de Pacientes com FC	48 (100%)
Ovo	
- Nunca	4 (8,5 %)
- 1 a 3 vezes na semana	25 (53,2%)
≥ 4 vezes na semana	18 (38,3%)
Peixes como (Atum, Cavala e Salmão)	
-Nunca	46 (95,8 %)
- 1 a 3 vezes na semana	2 (4,2 %)
≥ 4 vezes na semana	0 (0%)
Sardinha	
-Nunca	37 (77,1 %)
- 1 a 3 vezes na semana	11 (22,9 %)
≥ 4 vezes na semana	0 (0%)
Leite	
- Nunca	7 (14,9 %)
- 1 a 3 vezes na semana	8 (17 %)
≥ 4 vezes na semana	32 (68,1%)
Queijo	
-Nunca	7 (14,6 %)
- 1 a 3 vezes na semana	21 (43,8 %)
≥ 4 vezes na semana	20 (41,6%)
Manteiga	
-Nunca	11 (22,9 %)
- 1 a 3 vezes na semana	9 (18,8 %)
≥ 4 vezes na semana	28 (58,3 %)

Resultados apresentados em frequência (N) e percentual (%).

Tabela 3: Consumo alimentar habitual de alimentos fonte de acordo com status de vitamina D em pacientes com Fibrose Císticas no Nordeste do Brasil.

ALIMENTO	Vitamina D Suficientes N (%)	Vitamina D deficientes N (%)	p
Número de Pacientes com FC	N = 17	N = 31	
OVO			0,42
- Nunca	0	5 (16,13)	
- 1 a 3 vezes na semana	9 (52,94)	16 (51,61)	
≥ 4 vezes na semana	8 (47,06)	10 (32,26)	
Peixes como (Atum)			0,58
-Nunca	16 (94,12)	2 (6,45)	
- 1 a 3 vezes na semana	1 (5,88)	28 (90,32)	
≥ 4 vezes na semana		1 (3,23)	
Sardinha			0,03*
-Nunca	10 (58,82)	27 (87,10)	
- 1 a 3 vezes na semana	7 (22,58)	4 (12,9)	
≥ 4 vezes na semana	0	0	
Leite Integral			0,40
- Nunca	2 (11,76)	5 (16,12)	
- 1 a 3 vezes na semana	5 (29,41)	3 (9,67)	
≥ 4 vezes na semana	10 (58,82)	22 (70,96)	
Queijo			0,47
-Nunca	1 (5,88)	6 (19,36)	
- 1 a 3 vezes na semana	8 (47,06)	13 (41,94)	
≥ 4 vezes na semana	8 (47,06)	12 (38,70)	
Manteiga			0,87
-Nunca	3 (17,64)	8 (25,81)	
- 1 a 3 vezes na semana	4 (23,53)	5 (16,12)	
≥ 4 vezes na semana	10 (58,82)	18 (58,06)	

Resultados apresentados em frequência (N) e percentual (%). Dados analisados pelo teste Quiquadrado ou exato de Fisher quando a frequência <5 em um grupo. Valor de p significativo < 0,05.

APÊNDICE D

Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira

Escola de Pós-graduação em Saúde Materno Infantil

Instituição Civil Filantrópica



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Modelo para participante a partir dos 18 anos)

Influência do polimorfismo BSMI (rs 1544410) do gene VDR no efeito da suplementação de megadose de vitamina D3, processo inflamatório e estresse oxidativo, metilação do gene VDR e densidade mineral óssea em pacientes com Fibrose Cística

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa porque foi atendido (a) ou está sendo atendido (a) nesta instituição. Para que você possa decidir se quer participar ou não, precisa conhecer os benefícios, os riscos e as consequências pela sua participação.

Este documento é chamado de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e tem esse nome porque você só deve aceitar participar desta pesquisa depois de ter lido e entendido este documento. Leia as informações com atenção e converse com o pesquisador responsável e com a equipe da pesquisa sobre quaisquer dúvidas que você tenha. Caso haja alguma palavra ou frase que você não entenda, converse com a pessoa responsável por obter este consentimento para maiores esclarecimentos. Caso prefira, converse com os seus familiares, amigos e com a equipe médica antes de tomar uma decisão. Se você tiver dúvidas depois de ler estas informações, entre em contato com o pesquisador responsável.

Após receber todas as informações, e todas as dúvidas forem esclarecidas, você poderá fornecer seu consentimento **rubricando e/ou assinando em todas as páginas deste Termo**, em duas **vias** (uma do pesquisador responsável e outra do participante da pesquisa), caso queira participar.

PROPÓSITO DA PESQUISA

A vitamina D é uma vitamina que possui vários benefícios para os pacientes com fibrose cística, como, por exemplo, melhora dos sintomas respiratórios. Sendo assim, esta pesquisa tem como objetivo identificar pacientes com vitamina D abaixo do normal no exame de sangue e verificar se dando uma dose alta de vitamina D faz melhorar essa taxa no sangue de crianças, adolescentes e

jovens adultos portadores de fibrose cística. Também é objetivo da pesquisa avaliar o estado nutricional (peso, altura e a largura do braço - circunferência do braço), o consumo alimentar e outras taxas de exame de sangue.

PROCEDIMENTOS DA PESQUISA

Durante a pesquisa serão realizados três encontros. O primeiro encontro será para preenchimento deste documento - TCLE, preenchimento de um questionário sobre dados pessoais e da doença, realização da avaliação antropométrica (peso, altura e circunferência do braço), avaliação do consumo alimentar e realização de exames de sangue. O segundo momento será a entrega dos resultados dos exames e para os indivíduos que estiverem com baixos níveis de vitamina D, será entregue os frascos de vitamina D suficiente para dois meses de tratamento. Após 8 semanas de tratamento, será realizado o terceiro encontro, nesse momento serão aplicados novamente o questionário sobre dados pessoais e consumo alimentar, avaliação antropométrica e reavaliação dos exames. Todos os pacientes que apresentarem dosagem sanguínea baixa de vitamina D no exame de sangue receberão frascos contendo solução sublingual contendo dose alta de vitamina D e orientação nutricional com o objetivo de aumentar a ingestão de alimentos com vitamina D.

A coleta de sangue será realizada depois de um jejum (ficar sem comer) de 10 a 12 horas, que será avisado anteriormente. Serão coletados 15 ml de sangue, o equivalente a 4 tubos ou 3 colheres de sopa. Todas as amostras de sangue coletadas durante esta pesquisa, serão utilizadas apenas para os propósitos descritos neste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Se você concordar, os pesquisadores responsáveis por esta pesquisa consultarão seus dados clínicos e laboratoriais que se encontram no seu prontuário. Os dados coletados no prontuário serão mantidos em sigilo e confidencialidade.

BENEFÍCIOS

A sua participação trará alguns benefícios, que são: fazer um tratamento sem custo com vitamina D (que já possui comprovação de benefícios para o uso em pacientes com fibrose cística); ter acesso a diversos exames de sangue; fazer avaliação do estado nutricional e; contribuir para a pesquisa científica.

RISCOS

Estes procedimentos poderão trazer alguns riscos previsíveis:

- Como dor na hora da coleta de sangue;
- Constrangimento durante a entrevista para preenchimento do questionário e durante a aferição de medidas antropométricas para avaliação nutricional
- Os riscos da coleta de sangue podem incluir desmaio, dor e/ou hematoma (mancha roxa na pele). Raramente pode haver coágulo sanguíneo ou infecção no local;
- A utilização de dose alta de vitamina D raramente causa algum efeito perigoso, podendo causar diarreia, dor de barriga, enjoo.

CUSTOS

- Você não terá nenhum custo para participação nesta pesquisa. Caso necessário, haverá reembolso de despesas com transporte e/ou alimentação e quem irá financiar. Você não pagará por qualquer procedimento, medicação em estudo ou exames bioquímicos (caso exista) como parte desta pesquisa.
- Em caso de dano físico, diretamente causado pela coleta de sangue, ou pela utilização da dose alta da vitamina D, o participante terá direito a tratamento médico no IMIP, custeado pelos pesquisadores.

CONFIDENCIALIDADE

Se você optar por participar desta pesquisa, as informações sobre a sua saúde e seus dados pessoais serão mantidas de maneira confidencial e sigilosa. Seus dados somente serão utilizados depois de que ninguém possa identificar (ou seja, sem sua identificação). Apenas os pesquisadores autorizados terão acesso aos dados individuais, resultados de exames e testes bem como às informações do seu registro médico. Mesmo que estes dados sejam utilizados para propósitos de divulgação e/ou publicação científica, sua identidade permanecerá em segredo.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA

A sua participação é voluntária e você poderá se recusar a participar sem quaisquer penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito, ou mudança no seu tratamento e acompanhamento médico nesta instituição. Você poderá retirar seu consentimento a qualquer momento sem qualquer prejuízo. Em caso de você decidir interromper sua participação na pesquisa, a equipe de pesquisadores deve ser comunicada e a coleta de dados relativos à pesquisa será imediatamente interrompida.

ACESSO AOS RESULTADOS DE EXAMES

Você pode ter acesso a qualquer resultado relacionado à esta pesquisa. Estes resultados serão enviados ao seu médico e ele os discutirá com você. Se você tiver interesse, você poderá receber uma cópia dos exames.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS

A pessoa responsável por apresentar a você este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido lhe explicou claramente o conteúdo destas informações e se colocou à disposição para responder às suas perguntas sempre que você tiver novas dúvidas. Você terá garantia de acesso, em qualquer etapa da pesquisa, sobre qualquer esclarecimento de eventuais dúvidas e inclusive para tomar conhecimento dos resultados desta pesquisa. Neste caso, por favor, ligue para um dos pesquisadores responsáveis: **Dayanna Queiroz** no telefone (83) 99629-6511 e no e-mail nutricaoinfantilcomciencia@gmail.com ou para **Celso Costa** no telefone (83) 98810-0454 e no e-mail celsocostamail@gmail.com ou para **Patrícia Bezerra** no telefone (81)99971-5238 e no e-mail pmvbezerra@uol.com.br no horário das 8h as 18h de segunda-feira a sexta-feira.

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do IMIP. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre esta pesquisa, entre em contato com o comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do IMIP (CEP-IMIP) que objetiva defender os interesses dos participantes, respeitando seus direitos e contribuir para o desenvolvimento da pesquisa desde que atenda às condutas éticas.

O CEP-IMIP está situado à Rua dos Coelhos, nº 300, Boa Vista. Diretoria de Pesquisa do IMIP, Prédio Administrativo Orlando Onofre, 1º Andar tel: (81) 2122-4756 – Email: comitedeetica@imip.org.br O CEP/IMIP funciona de 2ª a 6ª feira, nos seguintes horários: 07:00 às 11:30 h e 13:30 às 16:00h.

Este termo está sendo elaborado em duas **vias**, sendo que uma via ficará com você e outra será arquivada com os pesquisadores responsáveis.

CONSENTIMENTO

Li as informações acima e entendi o propósito do estudo. Ficaram claros para mim quais são procedimentos a serem realizados, riscos, benefícios e a garantia de esclarecimentos permanentes.

Ficou claro também que a minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso aos dados e de esclarecer minhas dúvidas a qualquer tempo.

Entendo que meu nome não será publicado e toda tentativa será feita para assegurar o meu anonimato.

Concordo voluntariamente em participar desta pesquisa e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidade ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

Quando houver armazenamento de amostras/biorrepositório, inserir:

() Eu concordo em participar desta pesquisa e CONCORDO em ter minhas amostras armazenadas e utilizadas para uso em pesquisas futuras aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IMIP e para isto deverei assinar no futuro, um novo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, se eu concordar.

ou

() Eu concordo em participar desta pesquisa, mas NÃO CONCORDO em ter minhas amostras armazenadas para uso em pesquisas futuras.

Eu, por intermédio deste, dou livremente meu consentimento para participar desta pesquisa.

Nome e Assinatura do Participante

/ /

Data

Nome e Assinatura da Testemunha Imparcial

/ /

Data

Eu, abaixo assinado, expliquei completamente os detalhes relevantes desta pesquisa ao paciente indicado acima e/ou pessoa autorizada para consentir pelo mesmo.

Nome e Assinatura do Responsável pela Obtenção do
Termo

/ /

Data

Impressão digital
(opcional)

Rubrica do Participante da Pesquisa

UTILIDADE PÚBLICA MUNICIPAL – Dec. Lei 9851 de 08/11/67

UTILIDADE PÚBLICA ESTADUAL – Dec. Lei 5013 de 14/05/84

UTILIDADE FEDERAL – Dec. Lei 86238 de 30/07/81

INSCRIÇÃO MUNICIPAL: 05.879-1

INSCRIÇÃO ESTADUAL: isento

C.G.C. 10.988.301/0001-29

Rubrica do Pesquisador

Rua dos Coelhos, 300 Boa
Vista

Recife-PE – Brasil CEP
50070-550

PABX: (081) 2122 -4100

Fax: (081) 2122-4703 Cx.
Postal 1393

E-mail: imip@imip.org.br

Home

Page:<http://www.imip.org.br>

APÊNDICE E

Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira

Escola de Pós-graduação em Saúde Materno Infantil

Instituição Civil Filantrópica



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Modelo para os responsáveis pelos menores)

Influência do polimorfismo BSMI (rs 1544410) do gene VDR no efeito da suplementação de megadose de vitamina D3, processo inflamatório e estresse oxidativo, metilação do gene VDR e densidade mineral óssea em pacientes com fibrose cística

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa porque seu filho(a) foi atendido (a) ou está sendo atendido (a) nesta instituição. Para que você possa decidir se quer que seu filho(a) participe ou não, precisa conhecer os benefícios, os riscos e as consequências pela sua participação.

Este documento é chamado de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e tem esse nome porque você só deve aceitar que seu filho(a) participe desta pesquisa depois de ter lido e entendido este documento. Leia as informações com atenção e converse com o pesquisador responsável e com a equipe da pesquisa sobre quaisquer dúvidas que você tenha. Caso haja alguma palavra ou frase que você não entenda, converse com a pessoa responsável por obter este consentimento para maiores esclarecimentos. Caso prefira, converse com os seus familiares, amigos e com a equipe médica antes de tomar uma decisão. Se você tiver dúvidas depois de ler estas informações, entre em contato com o pesquisador responsável.

Após receber todas as informações, e todas as dúvidas forem esclarecidas, e caso aceite participar, será realizado processo de obtenção do Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) Você poderá fornecer autorização para a participação do menor na pesquisa **rubricando e/ou assinando em todas as páginas deste Termo**, em **duas vias** (uma do pesquisador responsável e outra sua), caso deseje que seu filho(a) participe.

Da mesma forma, será procedido com as crianças e adolescentes dos 8 aos 17 anos: caso aceitem participar, será colhida a assinatura do termo de assentimento para menores de idade (Termo de Assentimento Livre e Esclarecido - TALE).

PROPÓSITO DA PESQUISA

A vitamina D é uma vitamina que possui vários benefícios para os pacientes com fibrose cística, como, por exemplo, melhora dos sintomas respiratórios. Sendo assim, esta pesquisa tem como objetivo identificar pacientes com vitamina D abaixo do normal no exame de sangue e verificar se dando uma dose alta de vitamina D faz melhorar essa taxa no sangue de crianças, adolescentes e jovens adultos portadores de fibrose cística. Também é objetivo da pesquisa avaliar o estado nutricional (peso, altura e a largura do braço - circunferência do braço), o consumo alimentar e outras taxas de exame de sangue.

PROCEDIMENTOS DA PESQUISA

Durante a pesquisa serão realizados três encontros. O primeiro encontro será para preenchimento deste documento - TCLE, preenchimento de um questionário sobre dados pessoais e da doença, realização da avaliação antropométrica (peso, altura e circunferência do braço), avaliação do consumo alimentar e realização de exames de sangue. O segundo momento será a entrega dos resultados dos exames e para os pacientes que estiverem com baixos níveis de vitamina D, será entregue a vitamina D em solução suficiente para dois meses de tratamento. Após 8 semanas de tratamento, será realizado o terceiro encontro, nesse momento serão aplicados novamente o questionário sobre dados pessoais e consumo alimentar, avaliação antropométrica e reavaliação dos exames. Todos os responsáveis pelas crianças que apresentarem insuficiência ou deficiência da vitamina D que participarem da pesquisa receberão frascos contendo solução sublingual contendo a dose alta de vitamina D e orientação nutricional com o intuito de aumentar a ingestão de vitamina D pelo paciente.

A coleta de sangue será realizada depois de um jejum de 10 a 12 horas, que será avisado anteriormente. Serão coletados 15 ml de sangue, o equivalente a 4 tubos ou 3 colheres de sopa. Todas as amostras biológicas coletadas durante esta pesquisa, serão utilizadas apenas para os propósitos descritos neste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Se você concordar que seu filho(a) ou menor sob sua responsabilidade participe, os pesquisadores responsáveis por esta pesquisa consultarão os dados clínicos e laboratoriais que se encontram no prontuário do seu filho(a). Os dados coletados no prontuário serão mantidos em segredo e confidencialidade.

BENEFÍCIOS

A participação trará alguns benefícios, que são: fazer um tratamento sem custo com vitamina D (que já possui comprovação de benefícios para o uso em pacientes com fibrose cística); ter acesso a diversos exames de sangue; fazer avaliação do estado nutricional e; contribuir para a pesquisa científica.

RISCOS

Estes procedimentos poderão trazer alguns incômodos previsíveis:

- Como dor na hora da coleta de sangue;
- Constrangimento durante a entrevista para preenchimento do questionário e durante a aferição de medidas antropométricas para avaliação nutricional;
- Os riscos da coleta de sangue podem incluir desmaio, dor e/ou hematoma (mancha roxa na pele). Raramente pode haver coágulo sanguíneo ou infecção no local;
- A utilização de dose alta de vitamina D raramente causa algum efeito perigoso, mas pode causar diarreia, dor de barriga, náusea.

CUSTOS

- Você não terá nenhum custo para participação do seu filho(a) nesta pesquisa. Caso necessário, haverá reembolso de despesas com transporte e/ou alimentação e quem irá financiar. Você não pagará por qualquer procedimento, medicação em estudo ou exames bioquímicos (caso exista) como parte desta pesquisa.
- Em caso de dano físico, diretamente causado pela coleta de sangue, ou pela utilização da dose alta da vitamina D, o participante terá direito a tratamento médico, custeado pelos pesquisadores.

CONFIDENCIALIDADE

Se você optar por autorizar seu filho(a) a participar desta pesquisa, as informações sobre a saúde e os dados pessoais serão mantidas de maneira confidencial e sigilosa. Seus dados somente serão utilizados sem que ninguém possa identificar (ou seja, sem sua identificação). Apenas os pesquisadores autorizados terão acesso aos dados individuais, resultados de exames e testes bem como às informações do registro médico. Mesmo que estes dados sejam utilizados para publicação científica, a identidade do seu filho(a) permanecerá em segredo.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA

A participação do seu filho(a) é voluntária e você poderá recusar a participar sem quaisquer penalidades ou perda de benefícios aos quais você e seu filho(a) tem direito, ou mudança no seu tratamento e acompanhamento médico nesta instituição. Você poderá retirar seu consentimento a qualquer momento sem qualquer prejuízo. Em caso de você decidir interromper a participação do seu filho(a) na pesquisa, a equipe de pesquisadores deve ser comunicada e a coleta de dados relativos à pesquisa será imediatamente interrompida.

ACESSO AOS RESULTADOS DE EXAMES

Você pode ter acesso a qualquer resultado relacionado à esta pesquisa. Estes resultados serão enviados ao médico e ele os discutirá com você. Se você tiver interesse, você poderá receber uma cópia dos exames realizados no seu filho(a).

GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS

A pessoa responsável por apresentar a você este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido lhe explicou claramente o conteúdo destas informações e se colocou à disposição para responder às suas perguntas sempre que você tiver novas dúvidas. Você terá garantia de acesso, em qualquer etapa da pesquisa, sobre qualquer esclarecimento de eventuais dúvidas e inclusive para tomar conhecimento dos resultados desta pesquisa. Neste caso, por favor, ligue para um dos pesquisadores responsáveis: **Dayanna Queiroz** no telefone **(83) 99629-6511** e no e-mail **nutricaoinfantilcomciencia@gmail.com** ou para **Celso Costa** no telefone **(83) 98810-0454** e no e-mail **celsocostamail@gmail.com** ou para **Patrícia Bezerra** no telefone **(81)99971-5238** e no e-mail **pmvbezerra@uol.com.br** no horário das 8h as 18h de segunda-feira a sexta-feira.

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do IMIP. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre esta pesquisa, entre em contato com o comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do IMIP (CEP-IMIP) que objetiva defender os interesses dos participantes, respeitando seus direitos e contribuir para o desenvolvimento da pesquisa desde que atenda às condutas éticas.

O CEP-IMIP está situado à Rua dos Coelhos, nº 300, Boa Vista. Diretoria de Pesquisa do IMIP, Prédio Administrativo Orlando Onofre, 1º Andar tel: (81) 2122-4756 – Email: comitedeetica@imip.org.br O CEP/IMIP funciona de 2ª a 6ª feira, nos seguintes horários: 07:00 às 11:30 h e 13:30 às 16:00h.

Este termo está sendo elaborado em duas **vias**, sendo que uma **via** ficará com você e outra será arquivada com os pesquisadores responsáveis.

CONSENTIMENTO

Li as informações acima e entendi o propósito do estudo. Ficaram claros para mim quais são procedimentos a serem realizados no meu filho(a) ou menor sob minha responsabilidade, riscos, benefícios e a garantia de esclarecimentos permanentes.

Ficou claro também que a participação do meu filho(a) ou menor sob minha responsabilidade é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso aos dados e de esclarecer minhas dúvidas a qualquer tempo.

Entendo que meu nome e do meu filho(a) não será publicado e toda tentativa será feita para assegurar o meu anonimato.

Concordo voluntariamente que meu filho(a) ou menor sob minha responsabilidade participe desta pesquisa e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidade ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que meu filho(a) ou menor sob minha responsabilidade possa ter adquirido.

Quando houver armazenamento de amostras/biorrepositório, inserir:

Eu concordo que meu filho(a) ou menor sob minha responsabilidade participe desta pesquisa e CONCORDO em ter as amostras armazenadas e utilizadas para uso em pesquisas futuras aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IMIP e para isto deverei assinar no futuro, um novo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, se eu concordar.

ou

Eu concordo que meu filho(a) ou menor sob minha responsabilidade participe desta pesquisa, mas NÃO CONCORDO em ter as amostras dele(a) armazenadas para uso em pesquisas futuras.

Eu, por intermédio deste, dou livremente meu consentimento para que meu filho(a) ou menor sob minha responsabilidade participe desta pesquisa.

	/ /
Nome e Assinatura do Responsável	Data

	/ /
Nome e Assinatura da Testemunha Imparcial	Data

Eu, abaixo assinado, expliquei completamente os detalhes relevantes desta pesquisa ao paciente indicado acima e/ou pessoa autorizada para consentir pelo mesmo.

	/ /
Nome e Assinatura do Responsável pela Obtenção do Termo	Data

Impressão digital
(opcional)

Rubrica do Pai ou Responsável pelo menor

UTILIDADE PÚBLICA MUNICIPAL – Dec. Lei 9851 de 08/11/67
UTILIDADE PÚBLICA ESTADUAL – Dec. Lei 5013 de 14/05/84
UTILIDADE FEDERAL – Dec. Lei 86238 de 30/07/81
INSCRIÇÃO MUNICIPAL: 05.879-1
INSCRIÇÃO ESTADUAL: isento
C.G.C. 10.988.301/0001-29

Rubrica do Pesquisador

Rua dos Coelhos, 300 Boa
Vista
Recife-PE – Brasil CEP
50070-550
PABX: (081) 2122 -4100
Fax: (081) 2122-4703 Cx.
Postal 1393
E-mail: imip@imip.org.br
Home
Page:<http://www.imip.org.br>

APÊNDICE F

Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira

Escola de Pós-graduação em Saúde Materno Infantil

Instituição Civil Filantrópica



TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Para menores de oito a 17 anos)

Título da Pesquisa:

Influência do polimorfismo BSMI (rs 1544410) do gene VDR no efeito da suplementação de megadose de vitamina D3, processo inflamatório e estresse oxidativo, metilação do gene VDR e densidade mineral óssea em pacientes com fibrose cística.

Estamos convidando você para participar de uma pesquisa chamada: Influência do polimorfismo BSMI (rs 1544410) do gene VDR no efeito da suplementação de megadose de vitamina D3, processo inflamatório e estresse oxidativo, metilação do gene VDR e densidade mineral óssea em pacientes com fibrose cística.

Somos pesquisadores e queremos saber se, tomando vitamina D com uma dose mais alta, melhora sua respiração, a tosse e o catarro por conta da sua doença fibrose cística. A vitamina D é boa para quem tem fibrose cística. Queremos saber quais os pacientes com fibrose cística que tem a vitamina D mais baixa do normal no sangue, e ver se, tomando a vitamina D na forma de remédio em dose mais alta, melhora algumas taxas no exame de sangue. Nós queremos conhecer também se seu peso e tamanho estão normais, o que e quanto você come diariamente e se seus exames de sangue estão normais.

Essa pesquisa quer melhorar o tratamento das pessoas com fibrose cística. A pesquisa será da seguinte forma: os pesquisadores vão procurar os pacientes para a pesquisa. Você será convidado(a) para participar da pesquisa. Se você aceitar participar pediremos que você assine seu nome num documento. Esse documento tem duas vias. Uma das duas vias ficará com você. Pediremos também aos seus pais ou responsáveis a autorização para sua participação: caso eles autorizem você participar da pesquisa eles assinarão um documento com duas vias também.

Como será a pesquisa: ela terá três encontros. O primeiro encontro será para preencher e assinar este documento chamado Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE), para preencher um questionário sobre seu nome, endereço, idade e outros dados sobre você e sobre sua doença; vamos pesar, medir sua altura e medir ao redor do seu braço - circunferência do

braço; perguntar quanto e o que você come e fazer um exame de sangue. No segundo encontro vamos entregar os resultados dos exames e, para os pacientes que estiverem com a vitamina D baixa no sangue, será entregue o frasco contendo vitamina D em dose alta para dois meses de tratamento. Após 2 meses de tratamento, será realizado o terceiro encontro para preencher um questionário sobre seu nome, endereço, idade e outros dados sobre você e sobre sua doença; vamos pesar, medir sua altura e medir ao redor do seu braço - circunferência do braço; perguntar quanto e o que você come e fazer a reavaliação dos exames. No caso da vitamina D estar baixa no sangue, seu pai, mãe ou responsável receberão de graça frascos contendo vitamina D em dose alta e orientação nutricional para aumentar na sua alimentação a quantidade de alimentos com vitamina D.

O exame de sangue será realizado depois de jejum (ficar sem comer) de 10 a 12 horas, que será avisado para você antes. Serão coletados 15 ml de sangue, mais ou menos como 4 tubinhos ou como 3 colheres de sopa. Todos os exames de sangue serão utilizados apenas para os motivos que escrevemos neste documento - Termo de Assentimento Livre e Esclarecido.

Se você concordar, os pesquisadores responsáveis por esta pesquisa vão poder olhar os dados pessoais (sobre você) e sobre sua doença, seus exames de sangue que se encontram no seu prontuário (ficha do hospital). Tudo isso será guardado segredo e ninguém conseguirá saber que foi você que participou da pesquisa.

Você pode perder uns 10 minutos respondendo as perguntas da entrevista, sendo isso um pouco desconfortável. Você poderá também sentir um pouco de desconforto com a retirada de sangue para os exames. Mas isso ajudará os pesquisadores a passarem a receita com a vitamina D com a dose certa. A utilização de dose alta de vitamina D raramente causa algum desconforto perigoso, mas pode causar diarreia, dor de barriga, enjoo. Se isto acontecer, você será tratado sem precisar pagar nada pelos médicos pesquisadores do estudo.

A pesquisa será explicada para você em qualquer coisa que desejar. Você é livre para não querer participar, retirar seu consentimento (autorização) ou parar de participar a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a não aceitar em participar não irá causar qualquer problema para você.

Os pesquisadores irão guardar em segredo as informações sobre você. Seu nome ou os materiais que indiquem a sua participação não serão liberados sem a sua permissão. Ninguém conseguirá saber que é você quando nós publicarmos essa pesquisa numa revista científica. Uma via deste documento será guardada junto com o pesquisador e outra será dada para você.

A participação no estudo não custará nenhum dinheiro para você nem você receberá dinheiro pela participação.

DECLARAÇÃO DO PARTICIPANTE

Eu, _____ fui informada (o) dos motivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada e tirei minhas dúvidas. Sei que poderei pedir novas informações quando eu quiser. Os pesquisadores me disseram que todos os dados sobre mim serão mantidos em segredo.

Também sei que não precisarei pagar nada de dinheiro para participar na pesquisa.

Se eu ficar com dúvidas poderei tirar as dúvidas com os pesquisadores responsáveis: Dayanna Queiroz no telefone (83) 99629-6511 e no e-mail nutricaoinfantilcomciencia@gmail.com ou para Celso Costa no telefone (83) 98810-0454 e no e-mail celsocostamail@gmail.com ou para Patrícia Bezerra no telefone (81)99971-5238 e no e-mail pmvbezerra@uol.com.br no horário das 8h as 18h de segunda-feira a sexta-feira. Ou pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do IMIP (CEP – IMIP), situado à Rua dos Coelhoos, 300, Boa Vista. Diretoria de Pesquisa do IMIP. Prédio Administrativo Orlando Onofre, 1º Andar. Telefone: 2122-4756. E-mail: comitedeetica@imip.com.br. O CEP – IMIP funciona de 2ª a 6ª feira, nos seguintes horários: 07:00 às 11:30hs (manhã) e 13:30 às 16:00hs (tarde). O CEP do IMIP defende os interesses dos participantes, respeitando seus direitos e contribuir para o desenvolvimento da pesquisa desde que atenda às condutas éticas.

Declaro que aceito (concordo) em participar desse estudo. Recebi uma via deste termo de consentimento livre e esclarecido e me deixaram ler e tirar todas as minhas dúvidas.

Nome e Assinatura do Menor _____ Data _____

Nome e Assinatura do Pesquisador _____ Data _____

Nome e Assinatura da Testemunha _____ Data _____

Impressão digital

CONSENTIMENTO

Li as informações acima e entendi o motivo da pesquisa. Ficaram claros para mim quais são os procedimentos (as coisas) que serão feitas, os desconfortos (riscos), benefícios e a garantia de poder tirar dúvidas sempre que quiser.

Ficou claro também que não vou gastar nenhum dinheiro e que poderei ver todos os dados sobre mim e de tirar minhas dúvidas sempre quando quiser.

Entendo que meu nome não vai aparecer em nenhum lugar e ficará em segredo.

Concordo voluntariamente em participar desta pesquisa e que posso tirar o meu consentimento quando eu quiser, antes ou durante o mesmo, sem nenhuma multa e sem perder nenhum benefício do meu acompanhamento no hospital.

Marque com um X a sua resposta:

() Eu concordo em participar desta pesquisa e **CONCORDO** em ter as amostras do meu sangue guardadas e utilizadas para uso em pesquisas futuras aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IMIP e para isto deverei assinar no futuro, um novo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, se eu concordar.

ou

() Eu concordo em participar desta pesquisa, mas **NÃO CONCORDO** em ter as amostras guardadas para uso em pesquisas futuras.

	/	/	
Nome e Assinatura do Menor			Data
	/	/	
Nome e Assinatura da Testemunha Imparcial			Data

Eu, abaixo assinado, expliquei completamente os detalhes relevantes desta pesquisa ao paciente indicado acima.

	/	/	
Nome e Assinatura do Responsável pela Obtenção do Termo			Data

**Impressão digital
(opcional)**

Rubrica do Pesquisador

UTILIDADE PÚBLICA MUNICIPAL – Dec. Lei 9851 de 08/11/67

UTILIDADE PÚBLICA ESTADUAL – Dec. Lei 5013 de 14/05/84

UTILIDADE FEDERAL – Dec. Lei 86238 de 30/07/81 INSCRIÇÃO

MUNICIPAL: 05.879-1

INSCRIÇÃO ESTADUAL: isento

C.G.C. 10.988.301/0001-29

Rua dos Coelhos, 300 Boa Vista

Recife-PE – Brasil CEP 50070-550

PABX: (081) 2122 -4100

Fax: (081) 2122-4703 Cx.

Postal 1393

E-mail: imip@imip.org.br

APÊNDICE G

QUESTIONÁRIO DE COLETA ANTES E APÓS SUPLEMENTAÇÃO

Nome do Participante:

Nome do Responsável [para menores de idade]:

Telefone para contato: **tel. 1** => _____ **tel. 2** =>

Endereço:

Sexo: ()⁰ Feminino ()¹ Masculino **Cor:** ()⁰ Parda ()¹ negra ()² branco ()³ amarelo ()⁴ outros

Data de Nascimento: ____/____/____ **Idade atual:** ____anos. **Idade do diagnóstico:** ____anos.

Grau de instrução do responsável: ()⁰ Analfabeto ()¹ 1º Grau concluído ()² 2º Grau concluído

()³ Graduação concluída ()⁴ Pós Graduação concluída

Renda familiar [salários mínimos por mês]:

()⁰ 1 a < 5 salários mínimos; ()¹ 5 a 10 salários mínimos; ()² mais que 10 salários mínimos

Fototipo	Descrição	Sensibilidade ao sol
I- () ⁰ Branca	Queima com facilidade, nunca bronzeia	Muito sensível
II- () ¹ Branca	Queima com facilidade, bronzeia muito pouco	Sensível
III- () ² Morena clara	Queima moderadamente, bronzeia moderadamente	Normal
IV- () ³ Morena	Queima pouco, bronzeia com facilidade	Normal
V- () ⁴ Morena escura	Queima raramente, bronzeia bastante	Pouco sensível
VI- () ⁵ Negra	Nunca queima, totalmente pigmentada	Insensível

EXPOSIÇÃO SOLAR – Tempo [minutos] por dia de exposição ao sol: _____ minutos.

Áreas expostas diariamente (assinalar as opções): ()⁰ ambos os braços; ()¹ ambas as pernas; ()² parte anterior do tronco; ()³ parte posterior do tronco; ()⁴ cabeça; ()⁵ períneo.

Uso de veste específica que limite exposição solar: ()⁰ SIM ()¹ NÃO Qual?:

Na última semana quanto tempo em média por dia (em minutos) você se expõe ao sol? _____ minutos.

Pratica ATIVIDADE FÍSICA – ()⁰ SIM ()¹ NÃO Qual?:

Qual a duração?

Qual o local?

Qual o horário?

Mutação genética: ()⁰ SIM ()¹ NÃO Qual?:

Como foi feito o diagnóstico? ()⁰ 1 Teste de Suor positivo; ()¹ 2 Testes de Suor positivos; ()² Teste do pezinho positivo; ()³ Teste genético positivo; ()⁴ Suspeita diagnóstica [sem diagnóstico fechado] ; ()⁵ Outro _____

Uso de bomba inibidora de prótons (omeprazol, pantoprazol, lansoprazol, rabeprazol, esomeprazol, tenatoprazol): ()⁰ SIM ()¹ NÃO
Outro: _____

Colonização bacteriana? ()⁰ SIM ()¹ NÃO Qual?:

Esteve internado nos últimos 30 dias? ()⁰ SIM ()¹ NÃO Causa da internação?:

Presença e Doenças Crônica: ()⁰ SIM ()¹ NÃO Qual?: _____

Complicação Renal : ()⁰ SIM ()¹ NÃO Qual?: _____

Complicação Hepática: ()⁰ SIM ()¹ NÃO Qual?: _____

Diabete Mellitus: ()⁰ SIM ()¹ NÃO

USO DE MEDICAMENTOS: ()⁰ SIM ()¹ NÃO **USO DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES:** ()⁰ SIM ()¹ NÃO

Qual?	Quantidade?	Frequência?

Uso de Repositor Enzimático : ()⁰ SIM ()¹ NÃO Qual?:

AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA

Peso atual (kg): _____ Estatura (cm): _____ IMC (kg/m²): _____ Circ. Braço (cm): _____

Dobra Cutânea Tricipital (mm): _____ Estado nutricional:

CONSUMO DE ALIMENTOS FONTES DE VITAMINA D

FONTES	Nunca	1-3x/semana	≥4x/semana	Diariamente
Ovo				
Peixes				
Atum				
Cavala				
Salmão				
Sardinha				
Arenque				
Outros				
Leite desnatado				
Leite integral				
Queijo				
Manteiga				

CONSULTA PÓS-SUPLEMENTAÇÃO

DADOS PESSOAIS

Nº do Questionário

Participante: _____ Data da Coleta:

_____/_____/_____

1. SINTOMAS E QUEIXAS ATUAIS:

Vômito: 1. Não 2. Sim

Insônia: 1. Não 2. Sim

Náusea: 1. Não 2. Sim

Estresse: 1. Não 2. Sim

Ansiedade: 1. Não 2. Sim

Cansaço: 1. Não 2. Sim

Refluxo: 1. Não 2. Sim

Diarreia: 1. Não 2. Sim

Constipação : 1. Não 2. Sim

Alterações do Apetite: 1. Não 2. Sim

Desde quando: _____

Outros: 1. Não 2. Sim

Especificar: _____

Após a Suplementação teve alguma reação? 1. Não 2. Sim

Especificar: _____

2. USO DE MEDICAMENTOS:

1. () Não.

2. () Sim.

Quais?

Qual a frequência?

Qual a quantidade?

3. ATIVIDADE FÍSICA:

1. () Não.

2. () Sim. Qual a frequência?

Qual a duração?

Qual o tipo?

Qual o local?

Qual o horário?

4. TABAGISMO:

1. () Não. Já foi fumante? () Não. () Sim. Por quanto tempo?

2. () Sim. Há quanto tempo?

5. CONSUMO DE ÁLCOOL:

1. () Não. Já consumiu anteriormente? () Não. () Sim.

2. () Sim.

Qual a frequência?

Qual a quantidade?

6. HISTÓRICO ALIMENTAR NUTRICIONAL

Mudou os Hábitos Alimentares?

1. () Não

2. () Sim Especificar:

VI- EXPOSIÇÃO SOLAR:

1. Por dia, você passou a se expor ao sol por quanto tempo?

1. () Até 15 minutos;

2. () Entre 15-30 minutos;

3. () Entre 30-60 minutos;

4. () >60min.

2. Você costuma usar protetor solar?

1. () Não;

2. () Sim. Quantas vezes ao dia? _____

Quando?

1. () Diariamente;

2. () Quando vai se expor ao sol;

3. () Só quando vai à praia;

4. () Outros

APÊNDICE H

RECORDATÓRIO ALIMENTAR 24 HORAS.

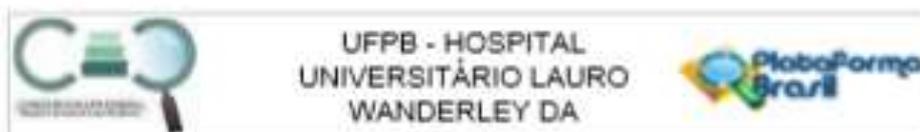
Paciente: _____ Nº DE ORDEM _____

Data da aplicação: ___/___/____. Dia referente: ___/___/____.

Refeição	Preparação	Alimentos	Medida Caseira	Quantidade (g/mL)
Desjejum: Horário: _____				
Lanche: Horário: _____				
Almoço: Horário: _____				
Lanche: Horário: _____				
Jantar: Horário: _____				
Colação: Horário: _____				

ANEXOS

ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ HULW



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO BsmI (rs 1544410) DO GENE VDR NO EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM MEGADOSE DE VITAMINA D3, PROCESSO INFLAMATÓRIO E ESTRESSE OXIDATIVO, METILAÇÃO DO GENE VDR E DENSIDADE MINERAL ÓSSEA EM PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA

Pesquisador: Constantino Giovanni Braga Cartão

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 87354018.1.0000.5183

Instituição Proponente: Hospital Universitário Lauro Wanderley/UFPB

Fornecedor Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.723.537

Apresentação do Projeto:

O parecer a ser relatado trata-se da avaliação de pendências apontadas no parecer anterior de nº 2.656.069. Projeto de pesquisa vinculado ao PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO CURSO DE DOUTORADO, sob a responsabilidade da pesquisadora DAYANNA JOYCE MARQUES QUEIROZ e orientação dos pesquisadores Constantino Giovanni Braga Cartão e MARIA DA CONCEIÇÃO RODRIGUES GONÇALVES. Trata-se de um ensaio clínico de fase II randomizado não cego, com pacientes com fibrose cística maiores de 10 anos de idade de ambos os sexos, provenientes do ambulatório de hospital referência Hospital Universitário Lauro Wanderley que aceitarem participar desta pesquisa, fibrocístico. No momento inicial será feita uma triagem dos pacientes, onde será realizada uma avaliação clínica e nutricional, através de entrevista, com aplicação de formulário e avaliação do consumo alimentar. Em seguida será realizada coleta de células bucais para análise genética de identificação do polimorfismo no genes VDR (BsmI (rs1544410)). Serão determinadas dosagens séricas de 25 hidroxivitamina D [25(OH)D], Hormônio Paratireóide (PTH), Cálcio sérico. Os marcadores inflamatórios avaliados serão, Proteína C Reativa ultrasensível (PCR-us), -1 Glicoproteína Ácida (-1-GPA) e os marcadores de estresse oxidativo, Malondialdeído (MDA) e capacidade antioxidante total (CAT). Serão realizados exames para a avaliar a função hepática (alanina transaminase (ALT), aspartato transaminase (AST)), a função

Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley - 2º andar - Campus I - UFPB.
Cidade: Cidade Universitária **CEP:** 58.059-080
UF: PB **Município:** JOÃO PESSOA
Telefone: (81)3216-7904 **Fax:** (81)3216-7022 **E-mail:** comite.cep@hulw.ufpb.br

ANEXO B – APROVAÇÃO IMIP

	INSTITUTO DE MEDICINA INTEGRAL PROFESSOR FERNANDO FIGUEIRA -	
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP		

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO BsmI (rs 1544410) DO GENE VDR NO EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM MEGADOSE DE VITAMINA D3, PROCESSO INFLAMATÓRIO E ESTRESSE OXIDATIVO, METILAÇÃO DO GENE VDR E DENSIDADE MINERAL ÓSSEA EM PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA.

Pesquisador: Patrícia Gomes de Matos Bezerra

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 12994619.6.1001.5201

Instituição Proponente: Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira - IMIP/PE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.340.670

Apresentação do Projeto:

Resposta às pendências éticas do Projeto: INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO BsmI (rs 1544410) DO GENE VDR NO EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM MEGADOSE DE VITAMINA D3, PROCESSO INFLAMATÓRIO E ESTRESSE OXIDATIVO, METILAÇÃO DO GENE VDR E DENSIDADE MINERAL ÓSSEA EM PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA.

Objetivo da Pesquisa:

Já descritos anteriormente

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Devidamente avaliados

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa factível. As recomendações foram acatadas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TALE e o TCLE para os responsáveis foram devidamente adequados.

Recomendações:

Nenhuma

Endereço: Rua dos Coelhos, 305			
Salina: Boa Vista		CEP: 50.070-000	
UF: PE	Município: RECIFE		
Telefone: (81)2122-4799	Fax: (81)2122-4792	E-mail: comiteetica@imip.org.br	

ANEXO C – PONTO DE CORTES UTILIZADOS NA PESQUISA

Pontos de cortes	Valores
Glicemia (mg/dL)	< 100
Vitamina D (ng/dL)	< 19 : deficiência 20 e < 30 : insuficiência 30- 100 suficiência
PTH (mg/dL)	15-65
Calcio (mg /dL)	8,0-10,5 mg/dL- criança 8,3 a 10,6 mg/dL adultos
A1GPA (mg/dL)	50 a 120
PCR (mg/dL)	< 3
HEMOGLOBINA	Crianças 5 a 11 anos: < 11,5 mg/dL Adolescentes 12 a 14 anos e mulheres grávidas não < 12,0 g/dl Adultos do sexo masculino acima de 15 anos: hemoglobina < 13 g/dL
HMT (g/dL)	Criança de 5 a 11 anos
MDA (µmol/L) mediana	3,4
CAOT (%)	18,7
Vitamina D (mcg/dia) consumo	EAR : 10 mcg