



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Celina Carvalho Borges

**Deficiência de vitamina D e menopausa: efeitos no fígado e no tecido
adiposo periovariano de camundongos**

Rio de Janeiro

2019

Celina Carvalho Borges

Deficiência de vitamina D e menopausa: efeitos no fígado e no tecido adiposo periovariano de camundongos

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Márcia Barbosa Águila Mandarin de Lacerda

Coorientadora: Prof.^a Dra. Isabele Bringhenti Sarmento

Rio de Janeiro

2019

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

B732 Borges, Celina Carvalho.
Deficiência de Vitamina D e menopausa: efeitos no fígado e no tecido adiposo periovariano de camundongos / Celina Carvalho Borges. – 2019.
81 f.

Orientadora: Marcia Barbosa Águila Mandarin de Lacerda.

Coorientadora: Isabele Bringhenti Sarmento.

Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. Menopausa – Teses. 2. Vitamina D – Metabolismo – Teses. 3. Biologia molecular – Teses. 4. Fígado – Metabolismo – Teses. 4. Tecido adiposo - Teses. 5. Camundongos como animais de laboratório – Teses. I. Águila, Márcia Barbosa. II. Sarmento, Isabele Bringhenti . III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 618.173:577.161.2

Bibliotecária: Kalina Silva CRB7/4377

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Celina Carvalho Borges

**Deficiência de Vitamina D e menopausa: efeitos no fígado e no tecido adiposo
periovariano de camundongos**

Tese apresentada, como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-
Graduação em Biologia Humana e Experimental, da
Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 08 de maio de 2019.

Coorientadora: Prof.^a Dra. Isabele Bringhenti Sarmento
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Marcia Barbosa Águila Mandarin de Lacerda (Orientadora)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarin-de-Lacerda
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Lais de Carvalho
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Patrícia Machado Rodrigues e Silva Martins
Instituto Oswaldo Cruz

Prof. Dr. Anderson Junger Teodoro
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2019

DEDICATÓRIA

A todos que amo.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Maria Gorette e Alexandre, por estarem comigo a cada dificuldade. Acompanhar-me pelos caminhos trilhados sempre com muito amor, paciência e zelo. Obrigada por acreditarem e cuidarem de mim, sem vocês eu nada seria.

Ao meu noivo Junior, com quem eu divido três lindos anos de vida. Sempre me apoiando, é para mim um exemplo de companheirismo e amor. Obrigada por me acompanhar nessa jornada.

À minha orientadora Prof.^a Dra. Márcia Barbosa Águila Mandarin de Lacerda, pela oportunidade e confiança. Obrigada por me acolher tão bem no laboratório. Abriu-me portas e me mostrou caminhos por onde antes, eu não havia pensado em trilhar. Obrigada por acreditar no meu potencial e trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarin de Lacerda pela oportunidade e investimentos depositados em mim e no meu trabalho. Obrigada pelo incentivo, orientações, correções e confiança.

À minha coorientadora Prof.^a Dra. Isabele Bringhenti Sarmento, pela confiança e dedicação. Obrigada pelo apoio e valorização do meu trabalho. Mostrou-me que para a realização de um trabalho científico, além de muito trabalho, é necessária muita paciência. Obrigada por me mostrar isso com tanto carinho.

À Prof.^a Dra. Vanessa Souza Mello pelo apoio e aprendizados, sempre disposta a me ajudar e colaborar, sempre com muito carinho. Obrigada também à Prof.^a Dra. Sandra Barbosa por compartilhar seu conhecimento e experiência.

À aluna de iniciação científica Andreza Salles, um presentinho que fez parte dessa caminhada com tanto entusiasmo e êxito. Obrigada por se fazer presente e por todo carinho, dedicação e companheirismo. Agradeço também à Letícia Oliveira e Alexandre Junior, por toda ajuda, companheirismo e trocas nessa caminhada.

Um muito obrigado especial aos amigos Aline Penna, pela amizade, carinho, conselhos e amor; Iara Karise pela grata surpresa, pela amizade sincera e cheia de luz; Tamiris Rachid pela amizade, carinho, risadas e tanta ternura; Thereza Bargut pela amizade, apoio, conselhos e inúmeros conselhos; à amiga Fernanda Ornellas pela amizade, carinho, apoio, aprendizado e tanta doçura; ao André Vianna pelo apoio, risadas, pelas inúmeras ajudas durante todo o trabalho e principalmente pela paciência; à Janaína Carvalho, por ser um presente nessa caminhada, pela afinidade e amizade; à Thatiany Marinho por toda ajuda,

apoio e risadas; à Francielle Graus por todo carinho, apoio, conselhos, ajuda e desabafos; e à amiga Michele Soares por toda ajuda e assistência durante o trabalho.

Aos amigos do LMMC que dividiram comigo cada conquistas, realização, alegria e frustração. O trabalho em laboratório é árduo e longo, mas vale cada aprendizado e nos faz mais fortes.

A todos os professores do programa de pós-graduação BHEx pelas disciplinas ministradas e pelos ensinamentos repassados durante o mestrado.

À FAPERJ e ao CNPq, pelo suporte financeiro deste trabalho e pela bolsa concedida. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Um dia de cada vez...

Aline Penna de Carvalho

RESUMO

BORGES, Celina Carvalho. **Deficiência de vitamina D e menopausa**: efeitos no fígado e no tecido adiposo periovariano de camundongos. 2019. 81f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2019.

No presente estudo, avaliamos o impacto da deficiência de vitamina D em camundongos fêmeas ovariectomizadas. A hipótese do nosso estudo é que a deficiência de vitamina D aumenta a inflamação no tecido adiposo e promove acúmulo de gordura hepática em modelo de menopausa. Camundongos C57BL/6 fêmeas, com três meses de idade, foram ovariectomizados ou não, e divididos em grupos controle (C, alimentado com dieta padrão), ovariectomizados (Ovx, alimentado com dieta padrão), controle sem vitamina D (C (D-), alimentado com dieta padrão sem vitamina D) e ovariectomizados sem vitamina D (Ovx (D-), alimentados com dieta padrão sem vitamina D) por doze semanas. Como resultados, no grupo Oxv (D-), houve resistência à insulina e intolerância à glicose, além do aumento da massa corporal. No fígado, houve aumento da esteatose hepática, com consequente aumento da lipogênese e inflamação, fatores que foram comprovados pelo aumento na expressão de genes e proteínas responsáveis pelo metabolismo lipídico. Além disso, houve redução da beta-oxidação de ácidos graxos. No tecido adiposo periovariano, a ovariectomia aumentou a área média dos adipócitos e a expressão proteica e gênica de citocinas pró-inflamatórias. Associado aos achados supracitados, houve aumento do metabolismo local da vitamina D, como forma de compensar a deficiência dessa vitamina. Em conclusão, os achados experimentais atuais são robustos e demonstram que a ovariectomia e a restrição dietética de vitamina D em camundongos têm efeitos adversos aditivos que levam a um aumento da massa corporal, da esteatose hepática e resistência à insulina. Esses achados estão ligados ao aumento dos marcadores de lipogênese e diminuição da beta-oxidação, predispondo ao acúmulo de gordura no fígado, assim como o aumento da inflamação no tecido adiposo periovariano.

Palavras-chave: Menopausa. Vitamina D. Biologia molecular. Fígado. Tecido adiposo periovariano.

ABSTRACT

BORGES, Celina Carvalho. **Deficiency of vitamin d and menopause: effects on liver and periovarian adipose tissue of mice.** 2019. 81f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2019.

In the present study, we have evaluated the impact of vitamin D deficiency in ovariectomized female mice. The hypothesis of our study is that vitamin D deficiency increases the inflammation in adipose tissue and promotes accumulation of hepatic fat in the menopause model. Female C57BL / 6 mice, three months old, were ovariectomized or not, and divided into control (C, fed control diet), ovariectomized (Ovx fed control diet), control without vitamin D (D-), fed control diet without vitamin D) and ovariectomized without vitamin D (Ovx (D-), fed control diet without vitamin D) for twelve weeks. As a result, in Oxv (D-) group there was insulin resistance and glucose intolerance, as well as an increase in body mass. In the liver, there was an increase in hepatic steatosis, with consequent increase in lipogenesis and inflammation due to the increase in the expression of genes and proteins of lipid metabolism. In addition, there was a reduction of beta-oxidation and reduction of fatty acid oxidation. In periovarian adipose tissue, ovariectomy increased the mean area of adipocytes and protein and gene expression of pro-inflammatory cytokines. Associated with the findings, there was increase in the local vitamin D metabolism, to compensate the deficiency of this vitamin. In conclusion, that current experimental findings are robust showing that ovariectomy and vitamin D dietary restriction in mice have additive adverse effects that lead to increased body mass, hepatic steatosis and insulin resistance. These findings are linked to increase of lipogenesis markers and decreased of beta-oxidation, predisposing to accumulation of fat in the liver, as well as increased inflammation in periovarian adipose tissue.

Keywords: Menopause. Vitamin D. Molecular biology. Liver. Periovarian adipose tissue.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Fases do climatério	19
Figura 2 -	Fórmulas químicas da vitamina D	21
Figura 3 -	Ação da 1,25 (OH) ₂ D ₃ sobre o metabolismo ósseo	24
Figura 4 -	Via inflamatória MAPK no tecido adiposo	29
Figura 5 -	Etapas na cirurgia de ovariectomia bilateral	34
Figura 6 -	Linha do tempo dos grupos estudados	35
Figura 7 -	Análise do ciclo estral	36
Figura 8 -	Esteatose hepática quantificada por estereologia	39
Figura 9 -	Área seccional média dos adipócitos	40
Quadro -	Detalhamento dos primers utilizados	42
Figura 10 -	Evolução da massa corporal e da pressão arterial dos animais	45
Figura 11 -	Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG) e Área sob a Curva (AUC) dos animais.....	51
Figura 12 -	Esteatose e triacilglicerol hepático	53
Figura 13 -	Análise da expressão gênica da lipogênese no fígado (expressões relativas de RNAm).....	54
Figura 14 -	Análise da expressão proteica da lipogênese no fígado	55
Figura 15 -	Análise da expressão gênica da beta-oxidação e inflamação no fígado (expressões relativas de RNAm)	56
Figura 16 -	Análise da expressão proteica e gênica da captação de glicose e metabolismo do estradiol no fígado	57
Figura 17 -	Análise da expressão proteica no metabolismo local de vitamina D no fígado	59
Figura 18 -	Distribuição de adipócitos pela área média, no tecido adiposo periovariano	60
Figura 19 -	Expressão de genes inflamatórios no tecido adiposo periovariano	61
Figura 20 -	Expressão de proteínas inflamatórias no tecido adiposo periovariano ...	62
Figura 21 -	Efeitos da ovariectomia e da restrição dietética de vitamina D no fígado	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição das dietas utilizadas no experimento	32
Tabela 2 - ANOVA de dois fatores	46
Tabela 3 - Comportamento alimentar, biometria, dosagens plasmáticas e metabolismo de carboidratos	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1,25 (OH) ₂ D ₃	1,25 - diidroxivitamina D ₃
25 (OH) D ₃	25 - hidroxivitamina D ₃
7-DHC	7 – deidrocolesterol
AIN	<i>American Institute of Nutrition</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASM	Área seccional média
ATP	Adenosina trifosfato
AUC	Área sob a curva
C	Grupo controle
ChREBP	Proteínas de ligação do elemento de resposta sensível a carboidratos
CoA	Coenzima A
Cpt-1	Carnitina palmitoiltransferase 1
CT	Colesterol total
CYP27B1	1-alfa hidroxilase
(D-)	sem vitamina D
DBP	Proteína ligante de vitamina D
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
DM2	Diabetes melitus tipo 2
E2	Estradiol
EHNA	Esteatohepatite não alcoólica
ELISA	Ensaio imunoabsorvente ligado à enzima
ER	Receptor de estrogênio
ERK	Sinais extracelulares
ERKf	ERK fosforilado
ERKt	ERK total
FASn	Ácido graxo sintase
FSH	Hormônio folículo estimulante
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HE	Hematoxilina e eosina
HOMA	Modelo da avaliação de homeostase

IKB	Inibidor de NFkB
IL	Interleucina
JNK	Proteína que ajuda a regular o processo de autodestruição celular
JNKf	JNK fosforilado
JNKt	JNK total
LXR-alfa	Ligante X do receptor-alfa
MAPK	Proteína quinase ativada por mitogénio
NFkB	Fator nuclear <i>kappa</i> B
Ovx	Grupo ovariectomizado
P _p	Pontos parciais
PPAR	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma
P _T	Pontos totais
PTH	Paratormônio
QUICKi	Índice quantitativo de sensibilidade à insulina
RI	Resistência à insulina
SBEM	Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia
SREBP1c	Proteína 1 de ligação ao elemento regulador de esterol
TAG	Triacilglicerol
TAP	Tecido adiposo periovariano
TNF	Fator de necrose tumoral
TOTG	Teste oral de tolerância a glicose
UVB	Luz ultravioleta B
VDR	Receptor de vitamina D
V _v	Densidade de volume

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	15
1	REVISÃO DE LITERATURA	17
1.1	Menopausa	17
1.2	Vitamina D	21
1.3	Fígado	25
1.4	Tecido adiposo	27
2	OBJETIVOS	30
2.1	Objetivo Geral	30
2.2	Objetivos específicos	30
3	MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1	Animais	31
3.2	Dieta	31
3.3	Ovariectomia	32
3.4	Grupos experimentais	35
3.5	Ciclo estral	35
3.6	Massa corporal e ingestão alimentar	36
3.7	Pressão arterial	37
3.8	Teste Oral de Tolerância à Glicose	37
3.9	Eutanásia e retirada do material	37
3.10	Análise plasmática	38
3.11	HOMA-IR e QUICKi	38
3.12	Análise feita exclusivamente no fígado	38
3.13	Análise feita exclusivamente no tecido adiposo periovariano	40
3.14	qPCR	41
3.15	Western Blotting	42
3.16	Análise estatística	44
4	RESULTADOS	45
4.1	Ingestão alimentar e massa corporal	45

4.2	Pressão arterial	48
4.3	Útero	49
4.4	Análise plasmática	49
4.5	Metabolismo de carboidratos	50
4.6	Resultados exclusivos do fígado.	52
4.6.1	<u>Bioquímica e Estereologia</u>	52
4.6.2	<u>Lipogênese</u>	53
4.6.3	<u>Beta-oxidação</u>	55
4.6.4	<u>Inflamação</u>	56
4.6.5	<u>Captação de glicose</u>	57
4.6.6	<u>Metabolismo de estradiol</u>	58
4.6.7	<u>Metabolismo local de vitamina D</u>	58
4.7	Resultados exclusivos do tecido adiposo periovariano	59
4.7.1	<u>Inflamação</u>	60
5	DISCUSSÃO	63
	CONCLUSÃO	68
	REFERÊNCIAS	69
	ANEXO A – Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa	78
	ANEXO B – Artigo científico publicado	79
	ANEXO C – Artigo científico publicado.....	80
	ANEXO D – Artigo científico aceito para publicação	81

INTRODUÇÃO

A menopausa é um período marcante da vida das mulheres caracterizado pela alteração na produção de hormônios sexuais femininos. O diagnóstico de menopausa é feito após um período de 12 meses consecutivos de amenorreia e marca o fim do período reprodutivo de uma mulher, com alterações endocrinológicas, somáticas e psicológicas (SOULES *et al.*, 2001). Os sintomas vasomotores são os mais comuns, e, entre as comorbidades, estão alterações ósseas, cardiovasculares, resistência à insulina (RI) e obesidade (EDWARDS; LI, 2013).

A alteração hormonal durante a menopausa contribui para um déficit na qualidade de vida das mulheres, que aumentam o peso corporal e acumulam gordura visceral na região da cintura, além de apresentar redução da massa muscular (DAVIS *et al.*, 2012). Estas alterações na composição corporal das mulheres aumentam o risco para o desenvolvimento de doenças metabólicas (KAAJA, 2008; SUZUKI; ABDELMALEK, 2009).

Para estudar a menopausa experimentalmente em um modelo semelhante ao que acontece nas mulheres, procuramos um modelo em camundongos sujeitos à ovariectomia, que induz alterações metabólicas pela depleção do estrogênio muito semelhantes com as mudanças que ocorrem em mulheres na menopausa. A menopausa em roedores, semelhantemente às mulheres, por si só provoca ganho de peso com aumento da adiposidade, inflamação no tecido adiposo e desenvolvimento de esteatose hepática com processo inflamatório (ROGERS *et al.*, 2009; VIEIRA-POTTER *et al.*, 2012). Essas semelhanças indicam fêmeas ovariectomizadas de camundongo como um modelo adequado para estudar as alterações morfofisiológicas induzidas pela menopausa.

A hipovitaminose D é considerada um problema de saúde pública em todo o mundo (DE BORST *et al.*, 2011). A vitamina D é uma vitamina lipossolúvel cuja função fisiológica mais conhecida nos vertebrados é manter as concentrações séricas de cálcio e fósforo, de modo a sustentar os processos celulares, a função neuromuscular e a calcificação óssea, aumentando a eficiência do intestino delgado em absorver cálcio e fosfato da dieta (NORMAN, 2008).

Encontrada na forma biologicamente inativa, necessita de sucessivas hidroxilações no fígado para formar a 25 - hidroxivitamina D [25(OH)D₃] (Calcidiol) e no rim para formar a 1,25 - dihidroxivitamina D [1,25 (OH)₂ D₃] (Calcitriol), sua forma biologicamente ativa. A 1,25 (OH)₂ D₃ interage com um receptor nuclear específico, o receptor de vitamina D (VDR)

nos tecidos alvo, presentes nos principais locais de ação desta vitamina (rins, glândulas paratireoides, intestino delgado e osso) (KIMBALL *et al.*, 2008). Sabe-se que a maioria das células apresenta o VDR (como as células beta pancreáticas, miócitos, hepatócitos e adipócitos) (MASON; SEQUEIRA; GORDON-THOMSON, 2011), sugerindo que a função da vitamina D vai além do metabolismo ósseo.

É comum ocorrer deficiência de vitamina D em mulheres no período pós-menopausa em associação com efeitos multifatoriais que culminam com a redução da qualidade de vida e da saúde (ANDREOZZI *et al.*, 2016; ANNWEILER *et al.*, 2010).

Com o objetivo de investigar a associação da menopausa e da deficiência de vitamina D, avaliamos o impacto da deficiência de vitamina D em modelo de camundongos fêmeas, ovariectomizadas.

O estudo teve a hipótese de que a combinação da restrição dietética de vitamina D e a retirada dos ovários (que leva a deficiência estrogênica mimetizando a menopausa em mulheres) tem efeito aditivo adverso sobre o acúmulo de gordura hepática com incremento de inflamação no tecido adiposo periovariano.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Menopausa

Mulheres entre os 45 e os 55 anos de idade entram em um período chamado climatério, devido ao envelhecimento biológico. O climatério é definido como a transição do período reprodutivo para o período não reprodutivo em mulheres (EDWARDS; LI, 2013). A perimenopausa, ou transição menopausal, é um período de tempo mal definido que envolve os anos finais da vida reprodutiva da mulher. Começa com o primeiro aparecimento de irregularidade menstrual e termina após um ano de amenorreia, definindo assim o período menstrual final. Há dois estágios na perimenopausa: a transição inicial, em que os ciclos são geralmente regulares, com relativamente poucas interrupções, e a transição tardia, em que a amenorreia se torna mais prolongada e dura pelo menos 60 dias, até a menopausa (SANTORO, 2016).

A menopausa ocorre quando os ovários têm exaustão folicular completa (ou quase completa), caracterizada pela redução na produção dos hormônios sexuais femininos, resultando em níveis séricos de estradiol (E2) muito baixos e níveis marcadamente aumentados de hormônio folículo-estimulante (FSH). O diagnóstico de menopausa é feito após um período de 12 meses consecutivos de amenorreia (SOULES *et al.*, 2001).

A cessação da menstruação é apenas um dos eventos da menopausa, o fim do potencial período reprodutivo da mulher, com concomitantes alterações endocrinológicas, somáticas e psicológicas, que resultam tanto do envelhecimento quanto da diminuição dos níveis de estrogênio (EDWARDS; LI, 2013). Os sintomas comuns da menopausa geralmente começam durante a transição da perimenopausa, em média aos 47 anos, nos 4 a 6 anos que precedem a menopausa (Bacon, 2017). Os sintomas mais comuns são vasomotores, principalmente os *fogachos*, mas também existem alterações ósseas, cardiovasculares, RI e obesidade (EDWARDS; LI, 2013).

A função normal do ciclo menstrual requer interações integradas entre o eixo hipotálamo-hipófise e ovário, sendo o endométrio uma estrutura que serve como indicador clínico de ciclos reprodutivos (HALL, 2015). Durante o ciclo normal, a fase folicular do endométrio, que antecede o período menstrual, ocorre devido à secreção de E2 pelos folículos em desenvolvimento. Após a ovulação, a combinação de progesterona e E2 produz mudanças

que preparam o endométrio para implantação se a concepção ocorrer. Na ausência de gravidez a função do corpo lúteo declina, o suporte hormonal do endométrio é perdido e ocorre a menstruação como resultado final (HALL, 2015).

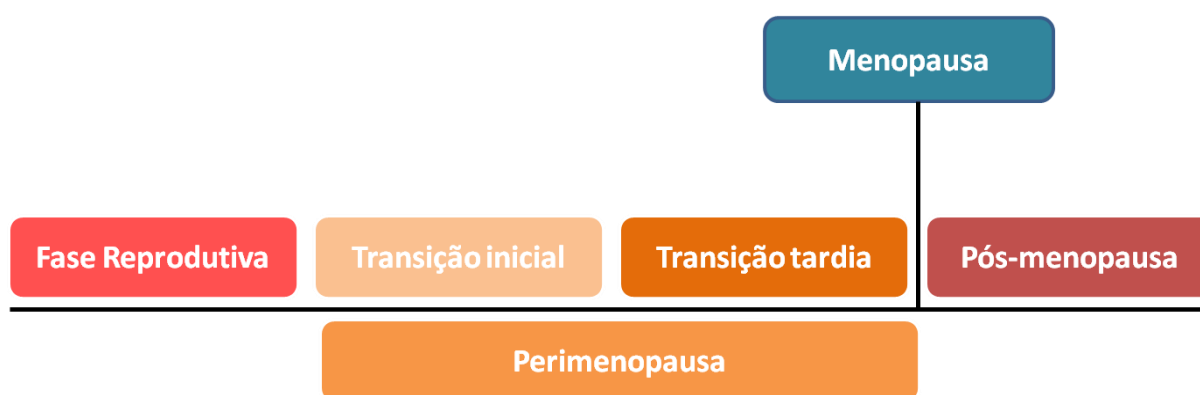
O número de folículos ovarianos nas mulheres atinge o limite no período neonatal. Portanto, as mulheres já nascem com a quantidade total de oócitos, que, durante o período reprodutivo, são gradualmente esgotados pela ovulação ou atresia. A mulher tem cerca de um milhão de folículos ao nascimento, que se encontram reduzidos para cerca de 250 mil na época da puberdade, decaindo gradativamente até a menopausa (GOUGEON, 1996).

Com a perda contínua dos folículos ovariano, os ciclos se tornam irregulares, indicando o início da transição menopausal. A diminuição do número de oócitos significa que menos hormônios são secretados diminuindo o *feedback* sobre esses hormônios (HALL, 2007). O consequente aumento no nível de hormônio folículo estimulante (FSH) leva ao recrutamento e à perda folicular acelerada, ainda com preservação dos níveis de estradiol na transição precoce da menopausa. Mas o esgotamento dos folículos ovarianos resulta em variabilidade na resposta ovariana ao FSH, níveis de estrogênio amplamente flutuantes e perda do ciclo reprodutivo normal. Quando todos os folículos ovarianos estão esgotados, o ovário é incapaz de responder até mesmo a altos níveis de FSH e os níveis de estrogênio diminuem. O período pós-menopausa é caracterizado hormonalmente pelo FSH elevado e baixos níveis de estradiol (COPELAND; CHU; TREMBLAY, 2004).

Na biossíntese de estradiol, o precursor 17-alfa-estradiol é convertido em estradiol pela aromatização de estrogênios e na conversão da testosterona. O fator de transcrição dependente do ligante X do receptor-alfa do fígado (LXR alfa) é um sensor dietético essencial, um modulador transcricional do metabolismo lipídico (ZHANG *et al.*, 2012). No fígado, o acoplamento entre o receptor de estrogênio (ER) com LXR alfa regula o metabolismo hepático na mulher (DELLA TORRE *et al.*, 2016), mas quando há deficiência de E2, o complexo de acoplamento cruzado ER alfa-LXR alfa fica comprometido e o desacoplamento do ER alfa do fígado pode causar alterações hepáticas e cardiovasculares (ZHANG *et al.*, 2012). A maior produção de estrogênios ocorre por aromatização de andrógenos em locais extragonadais após a menopausa, incluindo músculo, osso, medula óssea, fígado e principalmente, tecido adiposo (BACON, 2017).

A menopausa ocorre quando os ovários têm exaustão folicular completa (ou quase completa), caracterizada pela redução na produção dos hormônios sexuais femininos, resultando em níveis séricos de estradiol (E2) muito baixos e níveis marcadamente aumentados de hormônio folículo-estimulante (FSH). As fases da menopausa podem ser observadas na Figura 1. O diagnóstico de menopausa é feito após um período de 12 meses consecutivos de amenorreia (SOULES *et al.*, 2001).

Figura 1 - Fases do Climatério



Nota: Após o período de fase reprodutiva na vida da mulher, ocorre o climatério, entre aproximadamente 45 e 55 anos. O climatério é caracterizado por diferentes fases. A perimenopausa, ou transição menopausal, é dividida em transição inicial e transição tardia. A transição inicial é o período em que os ciclos menstruais são geralmente regulares, com relativamente poucas interrupções, e a transição tardia, o período em que a amenorreia se torna mais prolongada e dura pelo menos 60 dias, até a menopausa. O período que acontece após a menopausa, é chamado de pós-menopausa.

Fonte: A autora, 2019.

A cessação da menstruação é apenas um dos eventos da menopausa, o fim do potencial período reprodutivo da mulher, com concomitantes alterações endocrinológicas, somáticas e psicológicas, que resultam tanto do envelhecimento quanto da diminuição dos níveis de estrogênio (EDWARDS; LI, 2013). Os sintomas comuns da menopausa geralmente começam durante a transição da perimenopausa, em média aos 47 anos, nos 4 a 6 anos que precedem a menopausa (BACON, 2017). Os sintomas mais comuns são vasomotores, principalmente os *fogachos*, mas também existem alterações ósseas, cardiovasculares, RI e obesidade (EDWARDS; LI, 2013).

A função normal do ciclo menstrual requer interações integradas entre o eixo hipotálamo-hipófise e ovário, sendo o endométrio uma estrutura que serve como indicador clínico de ciclos reprodutivos (HALL, 2015). Durante o ciclo normal, a fase folicular do endométrio, que antecede o período menstrual, ocorre devido à secreção de E2 pelos folículos

em desenvolvimento. Após a ovulação, a combinação de progesterona e E2 produz mudanças que preparam o endométrio para implantação se a concepção ocorrer. Na ausência de gravidez a função do corpo lúteo declina, o suporte hormonal do endométrio é perdido e ocorre a menstruação como resultado final (HALL, 2015).

O número de folículos ovarianos nas mulheres atinge o limite no período neonatal. Portanto, as mulheres já nascem com a quantidade total de oócitos, que, durante o período reprodutivo, são gradualmente esgotados pela ovulação ou atresia. A mulher tem cerca de um milhão de folículos ao nascimento, que se encontram reduzidos para cerca de 250 mil na época da puberdade, decaindo gradativamente até a menopausa (GOUGEON, 1996).

Com a perda contínua dos folículos ovariano, os ciclos se tornam irregulares, indicando o início da transição menopausal. A diminuição do número de oócitos significa que menos hormônios são secretados diminuindo o *feedback* sobre esses hormônios (HALL, 2007). O consequente aumento no nível de FSH leva ao recrutamento e à perda folicular acelerada, ainda com preservação dos níveis de estradiol na transição precoce da menopausa. Mas o esgotamento dos folículos ovarianos resulta em variabilidade na resposta ovariana ao FSH, níveis de estrogênio amplamente flutuantes e perda do ciclo reprodutivo normal. Quando todos os folículos ovarianos estão esgotados, o ovário é incapaz de responder até mesmo a altos níveis de FSH e os níveis de estrogênio diminuem. O período pós-menopausa é caracterizado hormonalmente pelo FSH elevado e baixos níveis de estradiol (COPELAND; CHU; TREMBLAY, 2004).

Na biossíntese de estradiol, o precursor 17-alfa-estradiol é convertido em estradiol pela aromatização de estrogênios e na conversão da testosterona. O fator de transcrição dependente do ligante X do receptor-alfa do fígado (LXR alfa) é um sensor dietético essencial, um modulador transcricional do metabolismo lipídico (ZHANG *et al.*, 2012). No fígado, o acoplamento entre o receptor de estrogênio (ER) com LXR alfa regula o metabolismo hepático na mulher (DELLA TORRE *et al.*, 2016), mas quando há deficiência de E2, o complexo de acoplamento cruzado ER alfa-LXR alfa fica comprometido e o desacoplamento do ER alfa do fígado pode causar alterações hepáticas e cardiovasculares (ZHANG *et al.*, 2012). A maior produção de estrogênios ocorre por aromatização de andrógenos em locais extragonadais após a menopausa, incluindo músculo, osso, medula óssea, fígado e principalmente, tecido adiposo (BACON, 2017).

Durante a menopausa, a redução do estrogênio contribui para um déficit na qualidade de vida das mulheres. Muitas mulheres aumentam o peso corporal e acumulam gordura visceral na região da cintura, além de apresentar redução da massa muscular (DAVIS *et al.*,

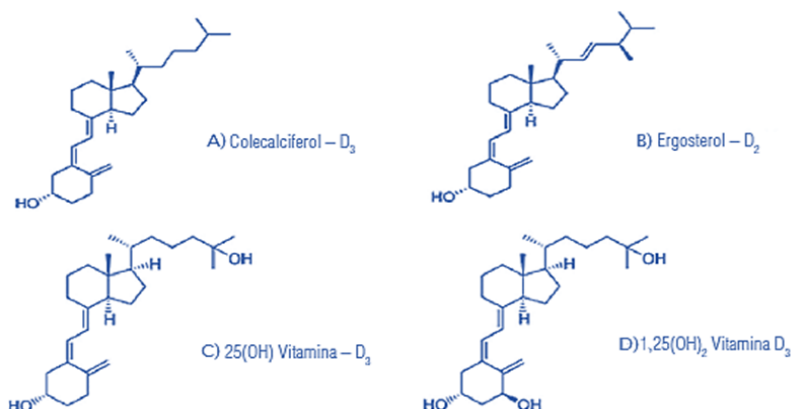
2012). Estas alterações da composição corporal aumentam o risco para o desenvolvimento da síndrome metabólica e doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) (KAAJA, 2008; SUZUKI; ABDELMALEK, 2009).

Como a menopausa é caracterizada por vários anos até o completo declínio hormonal e a cessação da vida reprodutiva, é difícil replicar esse período em modelos animais. No entanto, a ovariectomia bilateral atua em animais com capacidade de reprodução, como roedores, como um modelo preditivo notável de ooforectomia em mulheres na pré-menopausa (DIAZ BRINTON, 2012). Além disso, devemos considerar que os sinais e sintomas relacionados à menopausa são exacerbados pela ovariectomia bilateral quando comparados ao processo de menopausa natural, devido à cessação abrupta dos hormônios sexuais femininos (TOPATAN; YILDIZ, 2012).

1.2 Vitamina D

A vitamina D pertencente ao grupo de vitaminas lipossolúveis e é considerada um hormônio esteroide cujos precursores são obtidos na dieta ou produzidos na pele dos seres humanos. O termo “vitamina D” engloba um grupo de moléculas derivadas do 7-deidrocolesterol (7-DHC), que incluem tanto o metabólito ativo [1,25(OH)₂D₃] ou calcitriol como a sua forma de pré-hormônio [25(OH)D₃], o calcidiol, assim como seus precursores, entre eles vitamina D₃ (Colecalciferol) e vitamina D₂ (Ergosterol) (Figura 2) (CASTRO, 2011).

Figura 2 - Fórmulas químicas da vitamina D



Legenda: Colecalciferol ou Vitamina D₃ (A), Ergosterol ou Vitamina D₂ (B), Calcidiol (C) e Calcitriol (D).

Nota: Os diferentes compostos que são usualmente classificados como vitamina D.

Fonte: Adaptada de CASTRO, 2011.

A função da vitamina D e sua ação nos processos metabólicos são pesquisadas desde o século XVII, baseado em sua relação com o raquitismo que assolava os países ocidentais naquela época (BOUILLON *et al.*, 2008). O raquitismo atingia grande parcela das crianças, ou porque evitavam a exposição à luz solar, como acontecia com as de maior classe social, ou porque consumiam alimentos pobres em vitamina D, como acontecia nas famílias mais pobres que viviam nas favelas (BOUILLON *et al.*, 2008).

Desde o início do século 20 se demonstrou em cabras que quando eram mantidas ao ar livre com exposição ao sol do verão, apresentavam balanço positivo de cálcio. Entretanto, no inverno, quando as cabras eram mantidas em local fechado e na ausência de luz solar, apresentavam balanço negativo de cálcio (STEENBOCK; HART, 1916). Também em ratos se concluiu que uma fração de lipídios inativos presentes na pele dos animais seriam ativados pela luz ultravioleta (até então se desconhecia que a luz ultravioleta B [UVB] era responsável pela síntese de vitamina D) (STEENBOCK, 1924).

O raquitismo gradualmente desapareceu, pois as pessoas passaram a se expor mais à luz solar (com maior exposição à UVB) e, concomitantemente, passaram a ingerir mais alimentos fonte de vitamina D ou a usar suplemento oral de vitamina D, como por exemplo, o óleo de fígado de bacalhau (fonte de vitamina D3 ou colecalciferol). Em 1928, o químico Adolf Otto Reinhold Windaus ganhou o Prêmio Nobel de Química pela formulação e síntese química do colecalciferol (Vitamina D3), tendo proposto que a vitamina D fosse considerada um composto nutricional vital para o organismo (BOUILLON *et al.*, 2008).

Uma das principais funções da vitamina D é o controle da homeostase óssea. A 1,25 (OH)₂ D3 realiza esta função aumentando a eficiência da absorção no intestino delgado do cálcio e do fósforo da dieta e mobiliza os depósitos de cálcio e fósforo nos ossos, quando necessário, a fim de manter a homeostase sanguínea desses minerais. As vitaminas D2 e D3 podem ser obtidas pela alimentação (porém os alimentos não veiculam grandes quantidades dessa vitamina, contribuindo apenas com cerca de 10 a 20% das recomendações diárias) (NORMAN, 2008). As principais fontes dietéticas de vitamina D2 são encontradas em fungos comestíveis (alimento de origem não-animal), ao contrário de fontes de vitamina D3, que são alimentos de origem animal, como peixes gordurosos de água fria (atum, salmão e arenque), ovos e produtos lácteos. Os restantes 80% a 90% de vitamina D necessária para o organismo são sintetizadas endogenamente em um processo iniciado pela exposição aos raios solares UVB (HOLICK, 2006).

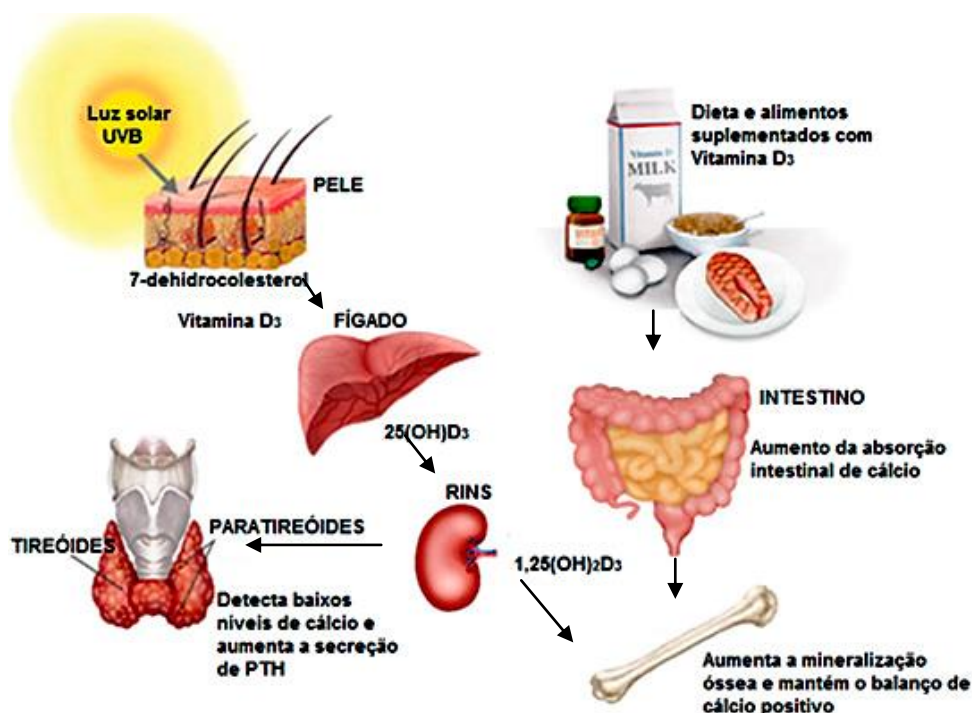
A síntese endógena de vitamina D se inicia através da transformação do precursor epitelial 7-DHC em vitamina D3 por ação dos raios UVB, através de uma cascata de reações

fotolíticas e enzimáticas na camada cutânea da pele. Depois, a vitamina D₃ entra na circulação sanguínea e é transportada para o fígado unida a uma proteína ligante da vitamina D (proteína ligante de vitamina D - DBP). No fígado, ocorre a primeira hidroxilação para formar a 25 (OH) D₃, que será secretada no plasma pela enzima CYP27A1. Nos rins ocorre a segunda hidroxilação e consequente ativação da vitamina D. Para se tornar ativa, a 25 (OH) D₃ é hidroxilada pela enzima 25-hidroxivitamina D-1alfa-hidroxilase (1alfa-hidroxilase ou CYP27B1) (ROSEN *et al.*, 2012) transformando a vitamina D na sua forma metabolicamente ativa, a 1,25 (OH)₂ D₃ (KENTY; MELTON, 2015). Já a inativação de 25 (OH) D₃ é predominantemente iniciada pela 23- e 24-hidroxilação pelo CYP24A1, também nos rins (MILLER, 2017).

O nível plasmático de vitamina D é mensurado na forma da 25 (OH) D₃, pois a forma biologicamente ativa desta vitamina, a 1,25 (OH)₂ D₃, é mais difícil de ser mensurada porque: a) os níveis plasmáticos da 1,25 (OH)₂ D₃ são mantidos rigorosamente em concentrações normais; b) os níveis plasmáticos de 25 (OH) D₃ são aproximadamente cem vezes maiores do que os da 1,25 (OH)₂ D₃; c) a hidroxilação da 25 (OH) D₃ a 1,25 (OH)₂ D₃ ocorre em diversos tecidos, suprimindo as necessidades locais; d) a meia-vida da 1,25 (OH)₂ D₃ é de aproximadamente seis horas, enquanto que a meia vida da 25(OH)D₃, é de duas a três semanas (MOSEKILDE, 2005).

Os efeitos biológicos da forma ativa da vitamina D (1,25 (OH)₂ D₃) são mediados pelo receptor da vitamina D (VDR) presente nos principais locais de ação (rins, glândulas paratireoides, intestino delgado e ossos) (KIMBALL *et al.*, 2008), e na maioria das células nucleadas (células beta-pancreáticas, hepatócitos, adipócitos e miócitos e osteócitos) (MASON; SEQUEIRA; GORDON-THOMSON, 2011). Com a redução de níveis plasmáticos de 1,25 (OH)₂ D₃ ocorre diminuição no nível sanguíneo de cálcio, consequentemente as glândulas paratireoides detectam essa redução e aumentam a síntese e secreção de paratormônio (PTH) (HEANEY *et al.*, 2003). Níveis circulantes altos de PTH aumentam a reabsorção no osso, promovendo a retirada de cálcio deste tecido, aumentam também a reabsorção tubular de cálcio pelo ultrafiltrado tubular renal e aumentam a produção renal da 1,25 (OH)₂ D₃ (HOLICK, 2006). Com o objetivo de aumentar a eficiência da absorção intestinal de cálcio, associado ao PTH, a 1,25 (OH)₂ D₃ induz indiretamente as células-tronco monocíticas a se tornarem osteoclastos funcionais e maduros para induzir a mobilização dos depósitos de cálcio do osso (Figura 3) (TSIARAS; WEINSTOCK, 2011).

Figura 3 - Ação da 1,25 (OH)₂ D₃ sobre o metabolismo ósseo



Legenda: calcidiol [25 (OH) D₃], calcitriol, [1,25 (OH)₂ D₃], paratormônio (PTH).

Nota: A vitamina D pode ser absorvida pela dieta ou ser sintetizada através da conversão da enzima 7-deidrocolesterol pela ação dos raios solares UVB. A vitamina D₃ é hidroxilada no fígado formando a 25 (OH) D₃ e no rim, sofre ação da enzima 1 α -hidroxilase, formando a 1,25 (OH)₂ D₃, forma metabolicamente ativa que atua no intestino delgado promovendo maior absorção de cálcio e mantendo o balanço de cálcio positivo. O PTH, produzido pelas glândulas paratireóides, também ajuda a manter o cálcio em níveis normais.

Fonte: A autora, 2015.

Apesar de o rim ser o principal local de ativação da vitamina D também encontramos a enzima 1 α -hidroxilase em outros órgãos (próstata, mama, intestino grosso, pâncreas e em células do sistema imune). Mas a hidroxilação extra renal possivelmente tem apenas efeito autócrino e parácrino local não fazendo parte da circulação sistêmica (PRENTICE, 2008).

A Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM) indica a dosagem sérica ideal de 25 (OH) D₃, o nível de 20 ng/mL (população adulta saudável) e entre 30 e 60 ng/mL como recomendado para grupos de risco (idosos, gestantes, pacientes com osteomalácia, raquitismos, osteoporose, hiperparatireoidismo secundário, doenças inflamatórias, doenças autoimunes, doença renal crônica e pré-bariátricos). Estes valores garantem uma homeostase óssea adequada, pode prevenir doenças cardiovasculares, hipertensão arterial sistêmica (HAS), diabetes mellitus tipo 2 (DM2), síndrome metabólica,

doenças autoimunes e desordens neuropsicológicas. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) faz a recomendação de ingestão diária de até 2000 UI de vitamina D.

1.3 Fígado

O fígado é um órgão de função metabólica vital. Após o consumo de alimentos as concentrações de glicose plasmáticas se elevam e o fígado é responsável por captar a porção de carboidratos ingerida, estoca na forma de glicogênio e sintetiza lipídios *de novo* a partir da glicólise (a glicose fornece carbonos para síntese de lipídios). A insulina favorece as vias mencionadas promovendo a redução da glicemia e o armazenamento de glicose sob a forma de glicogênio e ácidos graxos (POSTIC *et al.*, 1994).

Durante a lipogênese, as reações de síntese do palmitato ocorrem no citoplasma, sendo necessário realizar o transporte de acetil-coenzima A (CoA) da mitocôndria para o citoplasma. Já no citoplasma, a acetil-CoA sofre carboxilação pela ação da acetil-CoA carboxilase para formar malonil-CoA. Subsequentemente, a malonil-CoA é convertida em palmitato através da ação da ácido graxo sintase (Fasn). O palmitato pode formar triacilglicerol (TAG) no interior dos hepatócitos, outros lipídios por esterificação, ácidos graxos com maior número de carbonos por elongação, ácidos graxos insaturados por dessaturação ou, eventualmente, sofrer beta-oxidação (DULLOO *et al.*, 2004).

Os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs) representam uma família de fatores de transcrição de extrema importância no metabolismo lipogênico e oxidativo. Atuam como sensores de ácidos graxos no controle de muitos genes envolvidos na homeostase energética e da glicose, incluindo a diferenciação dos adipócitos, inflamação, metabolismo de lipoproteínas e oxidação de ácidos graxos (BERGER; AKIYAMA; MEINKE, 2005).

O PPAR gama, o principal regulador no controle de genes envolvidos em vias lipogênicas, promove a captação de ácidos graxos e diferenciação de adipócitos (BELLAFANTE *et al.*, 2013). O aumento na expressão de PPAR gama é uma característica da esteatose hepática (PETTINELLI; VIDELA, 2011).

O PPAR alfa é expresso principalmente no fígado, mas também nos rins, coração, intestinos e tecido adiposo marrom. No fígado, tem participação fundamental no metabolismo lipídico, aumentando a expressão de genes envolvidos na captação, ativação, transporte e

oxidação de ácidos graxos, ativando seu gene alvo (carnitina palmitoiltransferase 1 ou CPT-1) na beta-oxidação (CHAKRAVARTHY *et al.*, 2009).

A beta-oxidação ocorre na mitocôndria, sendo necessário a redução de ácidos graxos à molécula de acil-CoA no citoplasma para a produção de energia na forma de adenosina trifosfato (ATP). O ácido graxo é transportado para a mitocôndria via CPT-1, enzima da membrana mitocondrial que controla a velocidade de entrada para a beta-oxidação (RECTOR *et al.*, 2010). O metabolismo oxidativo dos ácidos graxos é também mediado pelo fator de transcrição PPAR alfa, que aumenta a transcrição da CPT-1 e de diversas enzimas da beta-oxidação (BERGER; AKIYAMA; MEINKE, 2005).

Concentrações plasmáticas aumentadas de glicose inibem a malonil-CoA, retardando a entrada de ácidos graxos para a matriz mitocondrial devido a inibição de CPT-1. A consequente diminuição na beta-oxidação mitocondrial leva a um aumento de ácidos graxos livres no fígado, desencadeando a síntese de TAG e a esteatose hepática. A exposição aguda à glicose e aos ácidos graxos promove secreção de insulina. No entanto, exposição crônica, pode levar à hiperinsulinemia e RI (SMITH; ADAMS, 2011).

O aumento de insulina é o principal fator hormonal de estímulo à expressão de genes lipogênicos. Um dos mais importantes mediadores deste efeito é a proteína de ligação ao elemento regulador de esterol (SREBP1c), um fator de transcrição capaz de induzir a síntese de ácidos graxos e TAG regulando a estocagem no fígado (SHIMOMURA; BASHMAKOV; HORTON, 1999). A SREBP1c por sua vez modula a ativação transcricional de genes lipogênicos, tais como a FASN (POSTIC; DENTIN; GIRARD, 2004).

A DHGNA é uma condição crônica caracterizada por esteatose hepática na ausência de um histórico significativo do uso de álcool ou outra doença hepática conhecida (AGUILA *et al.*, 2010). É acompanhada por uma série de alterações metabólicas que conduzem a danos no fígado e são caracterizados principalmente por liberação de ácidos graxos do tecido adiposo (lipólise), lipogênese *de novo* no fígado, diminuição da beta-oxidação mitocondrial, aumento no estresse oxidativo ou da combinação desses fatores (VIDELA; PETTINELLI, 2012). Geralmente é associada com anormalidades na ação da insulina e obesidade, variando clinicamente da simples esteatose hepática, podendo progredir para suas formas mais graves, como a esteatohepatite não alcoólica (KHACHATRYAN *et al.*), a cirrose e até o hepatocarcinoma (SMITH; ADAMS, 2011). A histologia é muito característica, e permite a visualização de uma lesão hepática com deposição de lipídios no citoplasma dos hepatócitos, na forma de vacúolos (CATTAPRETA *et al.*, 2011).

1.4 Tecido adiposo

O tecido adiposo branco é o principal local de reserva de energia do corpo com importante função endócrina e metabólica. Secreta peptídeos e proteínas bioativas, chamados adipocinas, os quais podem influenciar os processos metabólicos que participam da inflamação e da resposta do sistema imune, além de controlar o balanço energético (CINTI, 2005). Além de armazenar energia, o tecido adiposo exerce outras importantes funções, como proteção mecânica (contra choque e traumas), isolante térmico e manutenção da temperatura corporal (MASOODI *et al.*, 2015).

As células do tecido adiposo, os adipócitos, estão distribuídas por todo o corpo em diversos compartimentos, sendo localizado principalmente na região subcutânea (que forma uma camada sob a pele) e na cavidade tóraco-abdominal (tecido adiposo visceral). Em humanos, o tecido adiposo visceral envolve os órgãos e é dividido em omental, mesentérico, retroperitoneal, gonadal e pericárdico. Esses depósitos de gordura são ligados ao aumento do risco de desenvolvimento de morbidades e mortalidade relacionadas à obesidade (BJORNDAL *et al.*, 2011). Em camundongos, o tecido adiposo visceral é dividido em mesentérico, mediastínico, retroperitoneal, perirrenal e gonadal (epididimário, em machos e periovariano, em fêmeas) (CHUSYD *et al.*, 2016).

Quando há um desequilíbrio metabólico (obesidade por exemplo), a expressão de algumas citocinas e adipocinas são alteradas (adiponectina, leptina, fator de necrose tumoral alfa (TNF alfa) e interleucina-6 (IL-6)) (LAFONTAN; GIRARD, 2008). O perfil de secreção das adipocinas e seu papel na regulação da resposta inflamatória e na tolerância à glicose estão alterados não somente em indivíduos obesos, mas também em mulheres na pós-menopausa (TILG; MOSCHEN, 2006; WINTOUR; HENRY, 2006).

A leptina é um hormônio produzido pelo tecido adiposo e secretado na circulação em níveis proporcionais à massa adiposa. Foi a primeira adipocina a ser identificada (ZHANG *et al.*, 1994). A leptina, juntamente com o seu papel na regulação da ingestão de alimentos e gasto energético, também exerce atividade pró-inflamatória, ligada à sua função de ter múltiplos efeitos em diferentes tipos de células imunes do sistema imune inato, como aumento de secreção de Interleucina 1 (IL-1), IL-6 e TNF alfa por macrófagos (LA CAVA, 2017).

Ao contrário de outras adipocinas, a adiponectina apresenta níveis plasmáticos inversamente proporcionais aos índices de gordura corporal (SHETTY *et al.*, 2009). Sua ação

promove melhora na sensibilidade à insulina, efeito anti-inflamatório, supressão da gliconeogênese, aumento da oxidação lipídica e diminuição da lipogênese *de novo* (HAVEL, 2004). Sabe-se que baixos níveis plasmáticos de adiponectina se correlacionam com o desenvolvimento de obesidade, RI e DHGNA, que pode progredir para DM2 (SHETTY *et al.*, 2009).

As vias inflamatórias envolvem ativação do fator nuclear *kappa* B (NFκB) (TOURNIAIRE *et al.*, 2013). NFκB é um fator de transcrição nuclear capaz de ativar mediadores inflamatórios. Em condições normais, os dímeros da subunidade NFκB estão ligados no citosol por uma proteína inibidora conhecida como inibidor de NFκB (IκB) (OECKINGHAUS; GHOSH, 2009). Quando ativada, o complexo quinase, chamado IKK fosforila IκB, marcando-a para a degradação proteasomal e liberando os dímeros da subunidade NFκB. A ativação de IKK pode ser estimulada pela presença de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e principalmente TNF alfa (GERONDAKIS *et al.*, 2014).

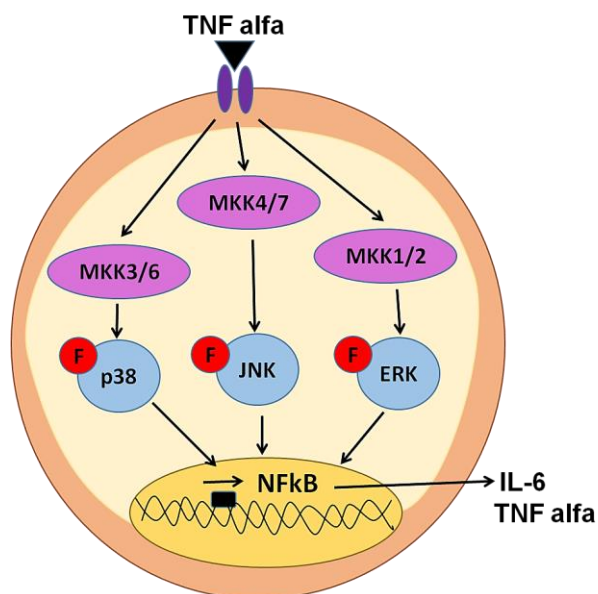
Há inflamação de baixo grau na obesidade, que causa RI devido à ativação de vias pró-inflamatórias intracelulares, como a cascata da proteína quinase ativada por mitogénio (MAPK) nos tecidos (RORATO *et al.*, 2017). No entanto, não está claro se o processo pró-inflamatório precede a RI ou se pode ser provocada por estímulos inflamatórios, através da ativação de vias pró-inflamatórias intracelulares que aumentam a expressão de proteínas intermediárias (HIROSUMI *et al.*, 2002).

A ligação do TNF alfa a receptores de superfície celular envolve múltiplas vias de transdução de sinal, incluindo três grupos de MAPK reguladas por sinais extracelulares (ERK), pela proteína que ajuda a regular o processo de autodestruição celular (JNK) e as p38 MAPK. Estas vias de sinalização de MAPK induzem a uma resposta secundária aumentando a expressão de vias inflamatórias, que contribuem para a atividade biológica do TNF alfa (SABIO; DAVIS, 2014). Em geral, as ERKs são ativadas por mitógenos e sinais de diferenciação enquanto as JNK e p38 MAP quinases são ativadas por estímulos de estresse.

A JNK é uma serina quinase ativada por citocinas e ácidos graxos livres e o aumento da atividade de JNK foi observado em animais alimentados com dieta rica em gordura (DE SOUZA *et al.*, 2005). No meio intracelular, JNK é fosforilado pelas isoformas MKK4 e MKK7 que preferencialmente fosforilam JNK em tirosina e treonina, respectivamente (TOURNIER *et al.*, 2001). Quando fosforilado, JNK contribui para a transcrição de fatores altamente inflamatórios, como NFκB (Figura 4, a seguir) (SABIO; DAVIS, 2014). Reforçando o papel da JNK no desenvolvimento da RI, camundongos *knokout* para JNK

exibem melhor sensibilidade à insulina em tecidos centrais e periféricos, prevenindo a disfunção do tecido adiposo e esteatose hepática (BELGARDT *et al.*, 2010).

Figura 4 - Via inflamatória MAPK no tecido adiposo



Legenda: fator de necrose tumoral (TNF), proteína quinase ativada por mitogénio (MAPK), sinais extracelulares (ERK), proteína que ajuda a regular o processo de autodestruição celular (JNK), fator nuclear *kappa* B (NFkB), fator de necrose tumoral (TNF), interleucina (IL).

Nota: A ligação do TNF alfa a receptores de superfície celular envolve múltiplas vias de transdução de sinal, incluindo três grupos de MAPK reguladas por sinais extracelulares (ERK), a proteína que ajuda a regular o processo de autodestruição celular (JNKs) e as p38 MAPK. No meio intracelular p38 é fosforilado pelas isoformas MKK3 e MKK6, JNK é fosforilado pelas isoformas MKK4 e MKK7 e ERK é fosforilado pelas isoformas MKK1 e MKK2, respectivamente. Estas vias de sinalização de MAPK induzem a uma resposta secundária que contribui para a transcrição de fatores altamente inflamatórios, como NFkB, aumentando a expressão de citocinas inflamatórias como TNF alfa e IL-6.

Fonte: A autora, 2019.

Há alteração das atividades metabólicas primárias na inflamação do tecido adiposo, como lipogênese, que se refere à síntese e estoque de TAG a partir de ácidos graxos e a lipólise, que se refere à mobilização ou hidrólise de TAG (PROENCA *et al.*, 2014). Essa relação, quando alterada, promove o acúmulo de gordura ectópica em diversos órgãos como no coração, pâncreas e fígado, contribuindo para o desenvolvimento de alterações metabólicas como obesidade, RI e DHGNA.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Produzir um modelo adequado em camundongo compatível com a menopausa em mulheres que apresente deficiência de vitamina D. Neste modelo estudar as possíveis alterações no metabolismo, no fígado e no tecido adiposo.

2.2 Específicos:

- a) comprovar a deficiência de 25 (OH) D3 e estradiol nos animais;
- b) avaliar a evolução da massa corporal, ingestão alimentar e energética, metabolismo de carboidratos (tolerância à glicose, resistência e sensibilidade à insulina);
- c) avaliar o perfil de adipocinas secretadas no tecido adiposo;
- d) avaliar no fígado o remodelamento e dano estrutural, via da lipogênese, da lipólise, da beta-oxidação e inflamação;
- e) avaliar fatores de transcrição envolvidos na inflamação do tecido adiposo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Os procedimentos experimentais realizados seguiram as normas estabelecidas pelos padrões estabelecidos para a experimentação com animais (Publicação NIH N°. 85-23, revisado em 1996) e o protocolo de experimentação foi aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto de Biologia Alberto Alcantara Gomes (IBRAG, CEUA número 038/2015).

Camundongos fêmeas C57BL/6 adultos foram *mantidos em estantes ventiladas com fluxo de ar unidirecional e constante* (Nexgen system, Allentown Inc., PA, EUA) *em condições controladas de temperatura* (21 ± 2 °C) *e umidade* ($57 \pm 10\%$). Os animais foram submetidos a ciclo invertido de 12/12h claro-escuro e tiveram livre acesso à comida e água (*biotério do Laboratório de Morfologia, Metabolismo e Doença Cardiovascular*).

3.2 Dietas

As duas dietas utilizadas no experimento foram produzidas pela PragSoluções (Jaú, SP, Brasil.) a dieta do grupo controle seguiu as recomendações de macro e micronutrientes do *American Institute of Nutrition (AIN) 93M* (REEVES; NIELSEN; FAHEY JUNIOR, 1993) e a dieta do grupo sem vitamina D, recebeu dieta padrão AIN-93M sem a vitamina D (D-) na formulação da dieta. As quantidades de macronutrientes e das demais vitaminas e minerais foram idênticas nas duas dietas. O protocolo experimental durou 12 semanas. As dietas foram oferecidas dos 3 aos 6 meses de idade (Tabela 1).

Tabela 1 - Composição das dietas utilizadas no experimento

Nutrientes (g/Kg)	C	D-
Caseína	140	140
Amido de milho	619,7	619,7
Sacarose	100	100
Óleo de soja	40	40
Fibra	50	50
L-Cistina	1,8	1,8
Colina	2,5	2,5
Antioxidante	1,0	1,0
Mistura de Minerais	35	35
Mistura de Vitaminas	10	10
Vitamina D (IU/Kg) *	1000	0,0
Gramas total	1000	1000
Energia (Kcal/Kg)	3.800	3.800
Energia (kJ/Kg)	15.960	15.960
Carboidrato (% Energia)	76	76
Proteína (% Energia)	14	14
Lipídios (% Energia)	10	10

Legenda: C, dieta padrão; D-, dieta padrão sem vitamina D.

Nota: * Vitaminas e Minerais presentes na mistura estão de acordo com a AIN93M (REEVES; NIELSEN; FAHEY JUNIOR, 1993), exceto para a Vitamina D na dieta (D-).

Fonte: A autora, 2019.

3.3 Ovariectomia

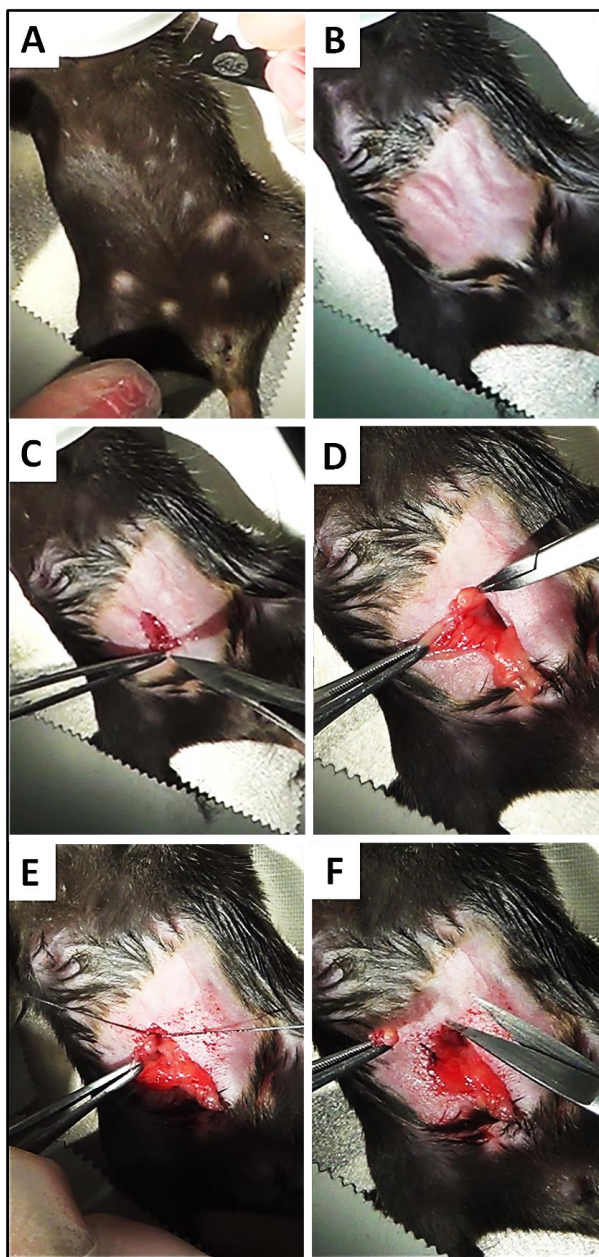
Para a remoção bilateral dos ovários (ovariectomia) foram utilizados 60 camundongos fêmeas com 3 meses de idade. Os animais foram anestesiados com isoflurano 2-5% e em seguida transferidos para uma plataforma aquecida (37 °C) e mantidos com 1-2% de isoflurano através de um cone respiratório na região nasal. Os animais foram aleatoriamente

submetidos à ovariectomia ou a um procedimento cirúrgico com manipulação das vísceras, sem remoção dos ovários em condições assépticas.

Animais anestesiados foram posicionados em decúbito dorsal, com os membros anteriores e posteriores abduzidos e fixados expondo amplamente a parede anterior do tronco. Foi realizada a tricotomia na região abdominal com assepsia e antissepsia. Campos cirúrgicos foram posicionados isolando a parede anterior do abdome e foi feita incisão mediana baixa incluindo a pele, tela subcutânea, até o peritônio parietal, com acesso à região dos ovários. Os animais foram divididos em dois grupos:

- a) grupo ovariectomizado (Ovx) (n=30): os ovários foram identificados *in situ* e tracionados lateralmente para adequada exposição do pedículo ovárico. Artéria e veia ováricas foram cauterizadas com bisturi elétrico e os ovários liberados e removidos após dissecação. Em sequência, foi fechada a ferida cirúrgica com sutura contínua (Vycril R000). O tecido adiposo periovariano foi preservado;
- b) grupo controle (C) (n=30): neste grupos também os ovários foram identificados *in situ* e tracionados lateralmente para adequada exposição do pedículo ovárico. Os ovários não foram retirados e houve o fechamento da ferida cirúrgica com sutura contínua (também com Vycril R000). O tecido adiposo periovariano foi preservado (Figura 5, a seguir).

Figura 5 – Etapas na cirurgia de ovariectomia bilateral



Legenda: A- Camundongo fêmea anestesiada e contida em decúbito dorsal. B- Tricotomia. C- Incisão na linha média. D- Localização do ovário *in situ*. E- Ligadura do pedículo vascular ovárico. F- Retirada dos ovários.

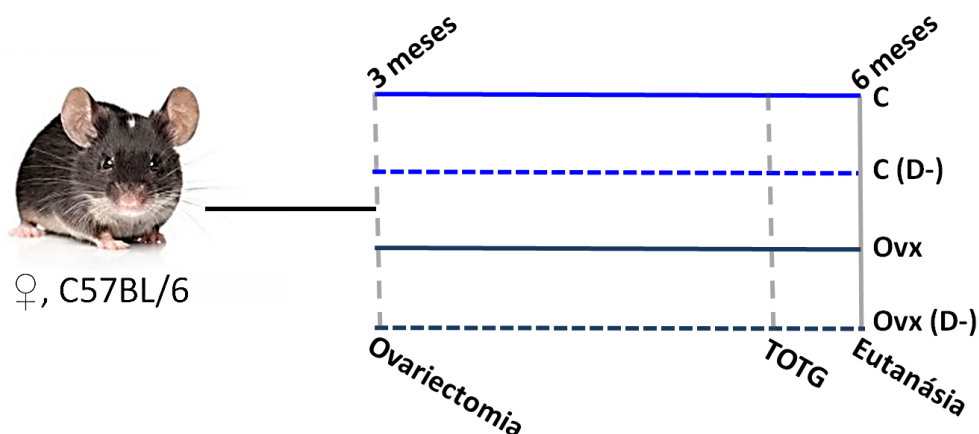
Fonte: A autora, 2019.

3.4 Grupos experimentais

Após a cirurgia os animais foram mantidos em gaiolas, individualmente por 24 horas para recuperação. Após uma semana de descanso, os grupos Ovx e C foram divididos aleatoriamente em quatro grupos (Figura 6):

- a) Grupo controle: **C**;
- b) Grupo ovariectomizado: **Ovx**;
- c) Grupo controle sem vitamina D: **C (D-)**;
- d) Grupo ovariectomizado sem vitamina D: **Ovx (D-)**.

Figura 6 – Linha do tempo dos grupos estudados



Legenda: C: controle; Ovx: ovariectomizado; (D-): sem vitamina D; TOTG: Teste Oral de Tolerância à Glicose.
 Nota: Aos 3 meses de idade os animais sofreram ou não a ovariectomia e passaram a receber as dietas experimentais durante 12 semanas, na décima primeira semana de administração das dietas experimentais foi realizado o TOTG e aos 6 meses de idade sofreram eutanásia.

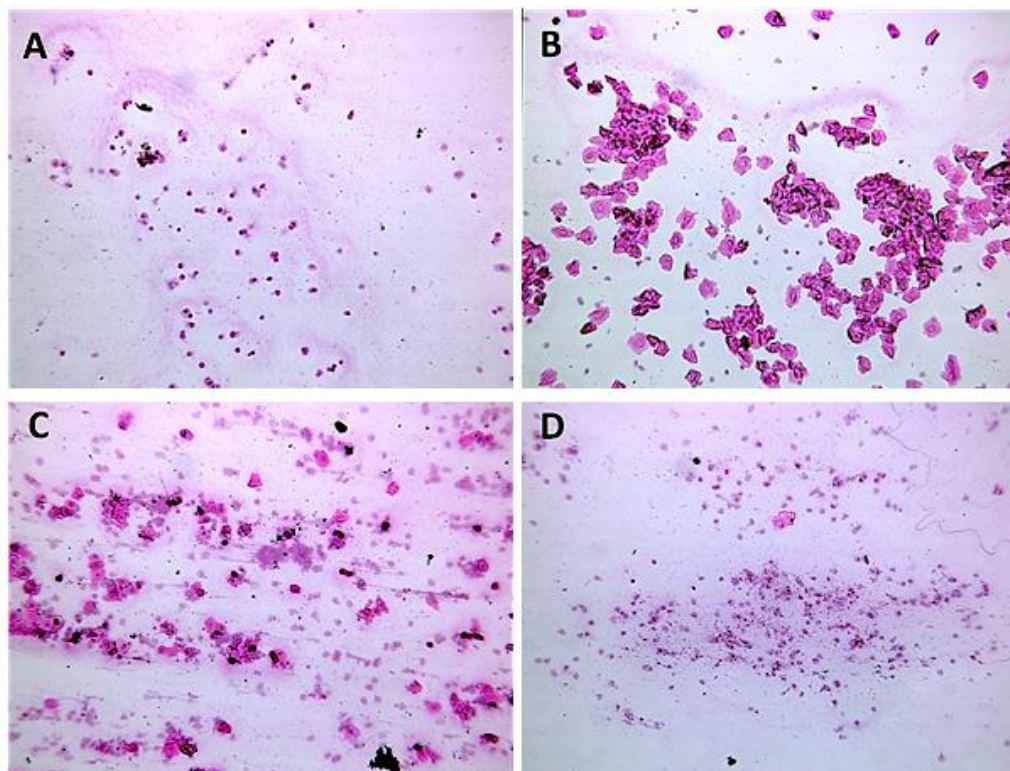
Fonte: A autora, 2019.

3.5 Ciclo estral

O exame citológico de esfregaço vaginal foi realizado duas vezes durante o experimento: antes da cirurgia (para garantir que todos os animais fossem operados na mesma

fase do ciclo estral), e novamente após duas semanas da ovariectomia com o objetivo de verificar se houve realmente indução da menopausa (Figura 7).

Figura 7 – Análise do ciclo estral



Legenda: A- Proestro, B- Estro, C- Metaestro, D- Diestro.
Nota: Esfregaço vaginal dos camundongos fêmeas.
Fonte: A autora, 2019.

3.6 Massa corporal e ingestão alimentar

A massa corporal dos camundongos foi aferida semanalmente, sempre na sexta-feira às 11h. A ingestão alimentar foi avaliada diariamente (no mesmo horário, entre 11h e 13h). O resto/ingestão foi avaliado como sendo a subtração da quantidade total de ração ofertada e a quantidade remanescente na gaiola. A ingestão energética foi calculada com base na gramatura da ingestão de ração (g/dia), multiplicada pela energia da ração em kilocalorias (depois convertido para kilojoules).

3.7 Pressão arterial

A pressão arterial sistólica foi mensurada semanalmente, sempre na segunda-feira entre 12h e 14h), por pletismografia da artéria da cauda (Storage Pressure Meter model LE 5002, Panlab Harvard Apparatus, Barcelona, Espanha). Após a ovariectomia, respeitado o período de recuperação pós cirúrgico de duas semanas, os animais foram adaptados ao equipamento por duas semanas, afim de minimizar o estresse (nesse período os resultados foram descartados). Portanto, a pressão arterial sistólica foi mensurada nas oito últimas semanas de experimento.

3.8 Teste oral de tolerância à glicose

Na semana anterior à eutanásia realizou-se o teste oral de tolerância à glicose (TOTG). Os animais ficaram em jejum por seis horas. Em seguida administrou-se, por gavagem orogástrica, solução de glicose à 25% (1g de glicose/Kg). A glicemia foi mensurada em amostras de sangue coletadas da veia caudal por ordenha nos tempos zero (jejum), 15, 30, 60 e 120 minutos após a sobrecarga de glicose. As concentrações de glicemia plasmática foram verificadas com o auxílio de glicômetro Accu-Chek Performa (Roche, Mannheim, Alemanha). Para a avaliação da tolerância à glicose foi considerada a área sob a curva (AUC) calculada com o método de trapezoide (Tai, 1994) (Graphpad Prism versão 8.01 para Windows, GraphPad Software, La Jolla CA, EUA).

3.9 Eutanásia e retirada do material

O sacrifício ocorreu com os animais aos seis meses de idade, após as oito semanas do protocolo experimental. Os animais estavam em jejum de seis horas e foram profundamente anestesiados (pentobarbital sódico intraperitoneal, 150mg/kg). O sangue foi coletado por punção cardíaca através do átrio direito e rapidamente foram dissecados e retirados o útero, o fígado e os depósitos de tecido adiposo periovariano que tiveram as massas mensuradas e

seguiram os protocolos previstos para estudo em microscopia de luz (n=5) ou biologia molecular (n=6, neste caso, congelados à -80 °C).

3.10 Análise plasmática

Para a dosagem em duplicata de 25 (OH) D3 foi utilizado o *kit* AC-57F1 IDS-EIA (Immunodiagnosics- Systems, Boldon, Reino Unido). Para dosagens de insulina, glucagon, leptina, adiponectina e estradiol, utilizamos os *kits* de ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA) #EZRMI-13K, #EZGLU-30K, #EZML-82K, #EZMADP-60K (Millipore, Darmstadt, Alemanha) e (KAQ0621, Thermo Fisher, USA).

3.11 HOMA-IR e QUICKi

Foi calculado o HOMA-IR (*Homeostasis Model Assessment* ou modelo da avaliação de homeostase) para avaliar a RI. O HOMA-IR foi calculado com os valores da glicemia e da insulina sérica, utilizando a fórmula: $\text{HOMA-IR} = (\text{insulina em jejum} \times \text{glicose}) / 22,5$ (MATTHEWS *et al.*, 1985).

Também avaliamos o índice quantitativo de sensibilidade à insulina (QUICKi), determinado pela fórmula: $[1 / \log (\text{insulina de jejum } \mu\text{U} / \text{mL}) + \log (\text{glicemia de jejum mg} / \text{dL})]$ (KATZ *et al.*, 2000).

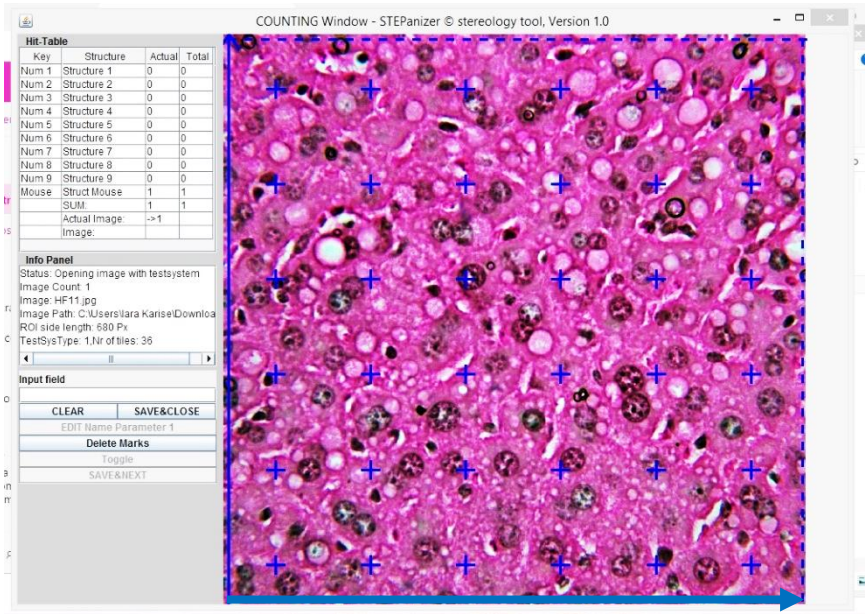
3.12 Análise feita exclusivamente no fígado

As concentrações de Colesterol Total (CT) e TAG no fígado foram analisadas em 50 mg de tecido sonificado com isopropanol. O homogeneizado foi centrifugado a 1200 *g* por 15 min e 5 ml do sobrenadante foram analisados utilizando-se kits comerciais em um espectrofotômetro automático (Bioclin System II, Quibasa, Belo Horizonte, MG).

Fragmentos de todos os lobos do fígado foram fixados durante 48 h em formaldeído 4% p/v, tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2 em temperatura ambiente. Depois foram processados para técnicas histológicas e incluído em *Paraplast Plus* (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA). Os blocos foram seccionados com 5 µm de espessura e corados com hematoxilina e eosina (HE). Imagens digitais foram obtidas em campos aleatórios cegos com microscópio de luz (Olympus BX51, câmera digital DP71, Olympus Inc, FL, EUA) e superpostas um sistema teste com 36 pontos, aplicação Java STEPAnizer (TSCHANZ; BURRI; WEIBEL, 2011). O método foi validado previamente para o estudo quantitativo da esteatose hepática (CATTAPRETA *et al.*, 2011).

A densidade de volume (Vv) de esteatose hepática (Vv [esteatose, fígado] foi estimada por contagem de pontos: $V_v \text{ [esteatose, fígado]} = P_p \text{ [esteatose, fígado]} / P_T$ sendo P_p é o número de pontos que tocam as gotículas de gordura nos hepatócitos e P_T o número total de pontos do sistema (Figura 8) (MANDARIM-DE-LACERDA, 2003; MANDARIM-DE-LACERDA; DEL SOL, 2017).

Figura 8 - Esteatose hepática quantificada por estereologia



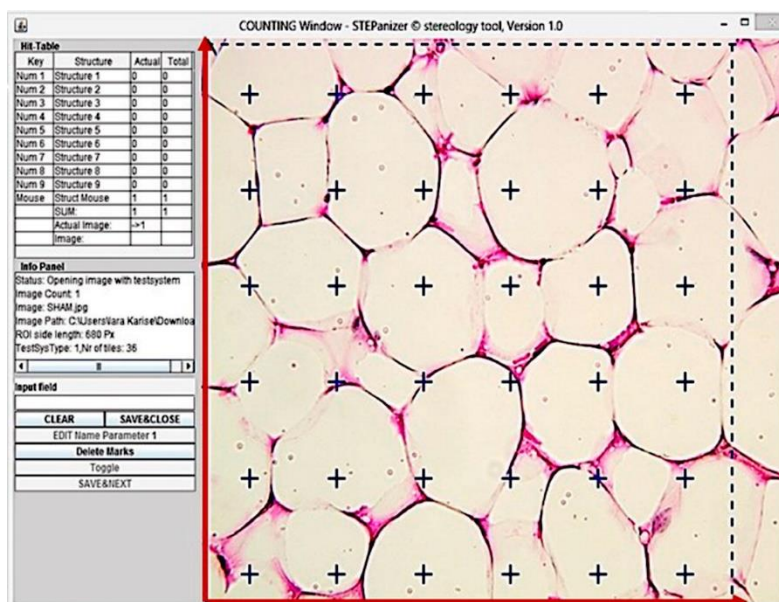
Nota: sistema-teste com pontos (cruz azul) foi sobreposto a imagem digital do fígado para a determinação da densidade de volume da esteatose hepática (Vv [esteatose, fígado] utilizando o aplicativo STEPAnizer.
Fonte: A autora, 2019.

3.13 Análise feita exclusivamente no tecido adiposo periovariano

Fragmentos do tecido adiposo periovariano (TAP) foram fixados durante 48 h em formaldeído 4% p/v, tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2 em temperatura ambiente, processados e incluídos em Paraplast plus (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA). Os blocos foram seccionados com 5 µm de espessura e as lâminas foram coradas com HE. Imagens digitais foram obtidas aleatoriamente e de modo cego (microscópio Olympus BX51, câmera digital DP71, Olympus Inc, FL, EUA).

Por estereologia, estimou-se a densidade de volume de adipócitos (V_v [adipócitos, TAP] por contagem de pontos como descrito anteriormente para o fígado. Além disso, estimou-se a área seccional média (ASM) dos adipócitos como a razão entre V_v [adipócitos, TAP] / 2. Q_A [adipócitos, TAP] sendo Q_A [adipócitos, TAP] a densidade numérica por área de perfis de adipócitos excluídos os adipócitos que tocavam a “linha proibida” do sistema-teste (Gundersen, 1977) (Figura 9). Para mais detalhes recomendamos uma recente revisão sobre o assunto (Mandarim-de-Lacerda e Del Sol, 2017).

Figura 9 – Área seccional média dos adipócitos



Nota: sistema-teste com pontos (cruz azul) foi sobreposto a imagem digital do fígado para a determinação da densidade numérica por área de adipócitos (foram contados os adipócitos dentre da área-teste que não cruzassem a “linha proibida” -- setas vermelhas). A área seccional média do adipócito foi estimada como descrito no texto.

Fonte: A autora, 2019.

O índice de adiposidade foi determinado como a razão entre a soma das gorduras intra-abdominal e subcutânea, dividido pelo total da massa corporal (PAWLAK; KUSHNER; LUDWIG, 2004).

3.14 qPCR

O fígado (alíquotas de 50 mg) e TAP (alíquotas de 30 mg) tiveram extração de RNA total utilizando 700µL de Trizol (Invitrogen, CA, EUA). Posteriormente, aos RNA extraídos adicionaram-se 100 µL de clorofórmio, seguido de centrifugação (12000 *g*, por 10 min a 4 °C), e retirou-se o sobrenadante da fase aquosa que corresponde ao RNA. A esse, adicionou-se 250 µL de isopropanol para precipitação do RNA, com posterior centrifugação (12000 *g*, por 10 min a 4 °C) com a formação de um *pellet* de RNA. Em seguida, retirou-se totalmente o isopropanol, ressuspensando com 500 µL de etanol 70% e nova centrifugação (12000 *g*, por 10 min a 4 °C). O etanol foi totalmente retirado e o *pellet* ressuspensado em 40 µL de água deionizada (MilliQ). A concentração de RNA foi determinada através de espectroscopia utilizando o equipamento Nanovue (GE Life Sciences), 1µg de RNA foi aliquoteado e acrescentou-se DNase I (Invitrogen). O cDNA foi sintetizado utilizando primers Oligo (dT) para RNAm e Superscript III transcriptase-reversa (Invitrogen, CA, EUA). O PCR em tempo real foi realizado utilizando o termociclador Biorad CFX96 e mix SYBR Green (Invitrogen, CA, EUA).

Os primers foram identificados com o programa *online* Primer3 (Quadro, a seguir). O controle endógeno beta-actina corrigiu a expressão dos genes-alvo. A eficiência da corrida dos genes-alvo e dos genes endógenos foram aproximadamente iguais, sendo calculada através de diluições em série do cDNA. As reações de PCR foram realizadas depois de um programa de desnaturação e ativação da polimerase (4 min a 95 °C), foram realizados 44 ciclos, cada ciclo consistindo em 95 °C durante 10 s e 60 °C durante 15 s, seguidos por uma curva de *melting* (60 °C a 95 °C, com taxa de aquecimento de 0,1 °C/s).

Os controles negativos consistiram de poços em que cDNA foi substituído por água deionizada. A razão de expressão relativa (QR) de RNAm foi calculada pela equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde o ΔCt expressa a diferença entre o número de ciclos dos genes-alvo e da média dos controles endógenos (BUSTIN *et al.*, 2009). A terminologia dos genes foi padronizada. Apenas a primeira letra dos genes estão em maiúscula e todas as letras estão em itálico,

segundo padronização proposta anteriormente na literatura, conforme observado no Quadro abaixo (DAVISSON, 1994).

Quadro - Detalhamento dos primers utilizados

Primers	3'-5'	5'-3'
Fígado		
<i>Cpt1</i>	GCAGAGCACGGCAAAATGA	GGCTTTTCGACCCGAGAAGAC
<i>Fasn</i>	TCGAGGAAGGCACTACACCT	CACCCACTGGAAGCTGGTAT
<i>Srebp1c</i>	CACCCACTGGAAGCTGGTAT	TCTGCCTTGATGAAGTGTGG
<i>Chrebp</i>	CACTCAGGGAATACACGCCTAC	ATCTTGGTCTTAGGGTCTTCAG
<i>Ppar alfa</i>	CAAGGCCTCAGGGTACCACTAC	GCCGAATAGTTCGCCGAAA
<i>Ppar gama</i>	CACAATGCCATCAGGTTTGG	GCTGGTCGATATCACTGGAGAT
<i>Glut 2</i>	AATTCCTGGCGTCTTCAG	TGTTGATATTCTAATCGG
<i>Il-6</i>	AGTTGCCTTCTTGGGAGTGA	ACAGGTCTGTTGGGAGTGGT
<i>Tnf alfa</i>	TCAGCCGATTGCTATCTCA	TGGAAGACTCCTCCCAGGTA
TAP		
<i>Il-1</i>	TGAGACCTTCAACACCCCAGCCA	CGTAGTGGGCACAGTGTGGGTG
<i>Il-6</i>	AGTTGCCTTCTTGGGAGTGA	ACAGGTCTGTTGGGAGTGGT
<i>Nfkb</i>	GCAGGCTATTGCTCATCACA	CGTACTCCACTGCTCCAACA
<i>Tnf alfa</i>	TCAGCCGATTGCTATCTCA	TGGAAGACTCCTCCCAGGTA
Controle endógeno		
<i>beta-actina</i>	TGAGACCTTCAACACCCCAGCCA	CGTAGTGGGCACAGTGTGGGTG

Legenda: *Chrebp*, proteínas de ligação do elemento de resposta sensível a carboidratos; *Cpt-1*, carnitina palmitoil transferase; *Fasn*, ácido graxo sintase; *Glut*, transportador de glicose; *Il*, interleucina; *Nfkb*, Fator nuclear *kappa* B; *Ppar*, receptor ativador de proliferação peroxissomal; *Srebp1c*, proteína 1 de ligação ao elemento regulador de esterol; *Tnf*, fator de necrose tumoral;

Fonte: A autora, 2019.

3. 15 *Western Blotting*

Adicionou-se tampão de lise RIPA com inibidor de protease e fosfatase às amostras com fígado e o TAP, depois homogeneizados e centrifugados (10000 *g* por 10 min a 4 °C). Após esta etapa, foi realizada a separação do sobrenadante com frações lipídicas e restos do homogenato. A quantidade de proteína total foi quantificada utilizando-se o kit BCA Protein

Assay (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) para a leitura em placa de ELISA. Em seguida, foi adicionado o tampão às amostras e levados ao banho-seco em temperatura de 100 °C por 5 min. Após desnaturação, as proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (8-10% dependendo do peso molecular das proteínas analisadas, SDS-PAGE), e transferidas para uma membrana de PVDF (Hybond-P GE Healthcare Life Sciences, Amersham Place, LC, Reino Unido) por eletrotransferência. As membranas foram incubadas durante a noite a 4 °C com anticorpo primário diluído em tampão com Tris (TBS-T [20 mmol/L de Tris/HCl (pH 7,4) e 500 mmol/L de NaCl] e 3% de BSA (albumina bovina sérica, peso/volume) para o bloqueio de marcações inespecíficas.

No fígado, foram avaliados beta-actina (anti-mouse, SC81178; Santa Cruz Biotechnology; 1:1000), ChREBP (proteínas de ligação do elemento de resposta sensível a carboidratos, anti-rabbit, sc-18634; Santa Cruz; 1:1000), CYP24A1 (anti-rabbit, ab54594; 1:1000), CYP27B1 (1-alfa hidroxilase, anti-rabbit, ab95047; Abcam; 1:1000), ER alfa (anti-rabbit, ab95256; Abcam; 1:500), GLUT2 (anti-rabbit, ab95256; Abcam; 1:500), PPAR gama (anti-mouse, sc-7273; Santa Cruz; 1:500), SREBP1c (anti-rabbit, sc-367; Santa Cruz; 1:500), VDR (anti-rabbit, ab3508; Abcam; 1:1000).

No TAP foram analisados beta-actina (anti-mouse, SC81178; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA; 1:1000), ERK (sinais extracelulares, SC-135900; Santa Cruz); pERKthr202/tyr204 (phosphorylated ERK, SC-81492; Santa Cruz); JNK (c-Jun N-terminal kinase, SC-7345; Santa Cruz); pJNKthr183/tyr185 (phosphorylated JNK, SC-12882; Santa Cruz); NFκB (factor nuclear kappa B, SC-109, Santa Cruz); TNF alfa (tumor necrosis factor alpha, SC-37217; Santa Cruz); IL-6 (interleukin six, AB1423; Merck Millipore, Temecula, CA, EUA). A beta-actina foi utilizada como fator de correção.

Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário com 5% (peso/volume) de leite em pó desnatado durante uma hora em temperatura ambiente. As membranas foram então reveladas usando um sistema de detecção de quimiluminescência com ECL e as imagens das bandas foram obtidas com o sistema ChemiDoc XRS de imagens moleculares (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). Para a análise da expressão das proteínas, a intensidade das bandas quimioluminescentes foi quantificada utilizando o software ImageJ, versão 1.51 (NIH, imagej.nih.gov/ij, EUA). Após esta etapa, os anticorpos foram retirados das membranas por solução *stripping* e remarcados com beta-actina (anti-camundongo, SC81178, Santa Cruz Biotechnology, 1:1000), como proteína constitutiva para normalizar os dados obtidos, exceto para p-JNK e p-ERK que foram corrigidas por JNK e ERK total, respectivamente. A terminologia das proteínas foi padronizada. Todas as letras das proteínas

estão em maiúscula, segundo padronização proposta anteriormente na literatura (Davisson, 1994).

3.16 Análise estatística

Os dados foram testados quanto à normalidade e homocedasticidade das variâncias (teste de Kolmogorov-Smirnov) e expressos como média e desvio padrão. Os resultados metabólicos, morfológico e de biologia molecular no fígado foram paramétricos e foram analisados com análise de variância (ANOVA) de um fator e pós teste de Holm-Sidak. Também executamos ANOVA de dois fatores para avaliar a influência da ovariectomia e restrição de vitamina D na dieta, bem como a interação entre esses fatores. No tecido adiposo não se assumiu a homocedasticidade entre os grupos, por isso usamos ANOVA com o teste de Brown-Forsythe e Welch e pós teste T2 de Tamhane (1979).

Realizamos uma análise de regressão linear simples e de correlação considerando a variável dependente a medida de TAG no fígado, e a variável independente a quantidade percentual de esteatose no fígado. Os dados foram ajustados pela técnica dos ‘mínimos quadrados’ e a significância do coeficiente de correlação de Pearson r foi testada pelo teste t com dois graus de liberdade:

(1)

$$t = \frac{r\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}}$$

Testamos com o teste t as inclinações das retas (teste de ‘slope’) e as intersecções das retas com o eixo y , o que nos permitiu comparar os grupos:

(2)

$$t = \frac{(b_1 - b_2)}{S_{(b_1-b_2)}}$$

Sendo $S_{(b_1-b_2)}$ o erro padrão da diferença das inclinações das retas (ZAR, 2010).

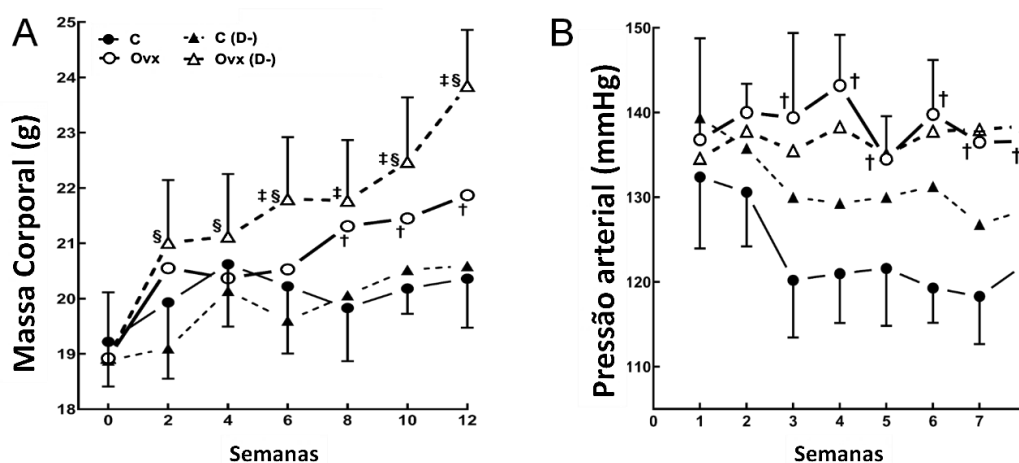
O nível de significância de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo (GraphPad Prism versão 8.01 para Windows, GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 Massa corporal (MC) e Ingestão alimentar

Os animais iniciaram o estudo sem diferença significativa na MC. Durante o estudo, o grupo Ovx ficou mais pesado do que o grupo C correspondente. A MC foi maior no grupo Ovx do que no grupo C (+7%, $P = 0,0153$), e maior no grupo Ovx (D-) do que em C (D-) (+16%, $P < 0,0001$). Além disso, a MC foi maior no grupo Ovx (D-) do que no grupo Ovx (+9%, $P = 0,0003$) (Figura 10A).

Figura 10 - Evolução da massa corporal e da pressão arterial dos animais



Legenda: C: controle; Ovx: ovariectomizado; (D-): sem vitamina D. Média e DP (n=15, ANOVA de um fator e pós teste de Holm-Sidak). $P < 0,05$ quando: † ≠ C, ‡ Ovx, § ≠ C (D-).

Fonte: A autora, 2019.

A ovariectomia foi responsável por 41% da MC ($P < 0,0001$), e a restrição dietética de vitamina D representou 9% da variância total ($P = 0,002$). A interação entre restrição dietética de vitamina D e ovariectomia foi significativa (ANOVA de dois fatores, $P = 0,0135$, Tabela 2).

Tabela 2 - ANOVA de dois fatores (continua)

Dados		% de variação e teste de significância					
		Interação		Ovx		D-	
		%	P	%	P	%	P
Metabolismo	Massa corporal	5,46	0,004	40,59	<0,0001	8,71	0,02
	Ingestão energética	1,66	NS	0,29	NS	0,12	NS
	Pressão arterial	2,82	NS	39,16	<0,0001	3,21	NS
Plasma	25 (OH) D3	1,02	0,2	1,57	NS	75,88	<0,0001
	Estradiol	4,27	NS	57,27	<0,0001	3,04	NS
	Insulina	9,98	0,001	7,81	0,003	15,35	<0,0001
	Glicemia em jejum	0,002	NS	48,01	0,0004	6,68	NS
	Leptina	5,95	NS	38,26	0,001	3,69	NS
	Adiponectina	0,01	NS	87,95	<0,0001	0,65	NS
	TOTG	6,37	NS	49,1	<0,0001	11,32	0,01
	HOMA-IR	67,63	<0,0001	1,04	NS	18,30	0,0002
	QUICKi	1,50	NS	14,06	0,04	30,80	0,004
TAP	Massa	13,70	<0,0001	64,74	<0,0001	1,04	NS
	Índice de adiposidade	0,62	NS	72,64	<0,0001	2,64	NS
	Área do adipócito	0,93	NS	26,09	<0,0001	20,20	<0,0001
	<i>Il-1</i>	22,99	0,02	13,51	NS	5,53	NS
	<i>Il-6</i>	27,42	<0,0001	51,19	<0,0001	5,73	0,02
	IL-6	34,97	0,001	11,73	NS	0,65	0,04
	<i>Tnf alfa</i>	23,37	<0,0001	44,06	<0,0001	26,30	<0,0001
	TNF alfa	6,19	NS	61,19	<0,0001	2,04	NS
	NFκB	14,13	0,01	16,97	0,01	24,96	0,003
	pJNK	2,85	NS	27,65	<0,0001	51,54	<0,0001
Fígado	pERK	44,16	<0,0001	14,36	0,002	16,59	0,001
	<i>Il-6</i>	2,63	NS	39,73	<0,0001	44,39	<0,0001
	<i>Tnf alfa</i>	3,21	NS	9,93	0,04	57,54	0,0001
	<i>Cpt-1</i>	0,04	NS	0,01	NS	71,58	<0,0001
	<i>Srebp1c</i>	5,56	NS	11,32	0,06	27,46	0,006
	<i>Fasn</i>	3,97	NS	14,26	0,001	67,03	<0,0001
	<i>Ppar alfa</i>	21,65	0,01	34,56	0,002	21,99	0,009

Tabela 2 - ANOVA de dois fatores (conclusão)

Dados		% de variação e teste de significância					
		Interação		Ovx		D-	
		%	P	%	P	%	P
	<i>Ppar gama</i>	3,56	NS	36,32	0,003	6,91	NS
	<i>Glut2</i>	3,03	NS	10,06	NS	51,51	0,002
	ChREBP	1,27	NS	2,86	NS	45,76	0,004
	SREBP1c	2,92	NS	72,50	<0,0001	5,06	0,03
	PPAR gamma	60,51	<0,0001	10,76	0,003	14,22	0,001
	GLUT2	12,36	NS	29,88	0,007	15,91	0,04
	CYP27B1	12,20	0,02	17,05	0,01	38,54	0,0005
	CYP24A1	4,69	NS	56,65	0,0003	0,002	NS

Legenda: 25 (OH) D3, 25 - hidroxivitamina D3; ChREBP, proteínas de ligação do elemento de resposta sensível a carboidrato; CPT-1, carnitina palmitoiltransferase 1; CYP27B1, 1-alfa hidroxilase; (D-): restrição dietética de vitamina D; ER, receptor de estrogênio; ERK, quinase regulada por sinal extracelular; FASn, ácido graxo sintase; HOMA, modelo da avaliação de homeostase; IL, interleucina; JNK, proteína que ajuda a regular o processo de autodestruição celular; NFkB, fator nuclear *kappa* B; NS, não significativo; Ovx, ovariectomia; PPAR, receptor ativado por proliferadores de peroxissoma; QUICKi, RI, resistência à insulina; SREBP1c, proteína 1 de ligação ao elemento regulador de esterol; TAP, tecido adiposo periovariano; TNF, Fator de necrose tumoral; TOTG, teste oral de tolerância à glicose.

Nota: Percentual de variação e nível de significância segundo o teste ANOVA de dois fatores.

Fonte: A autora, 2019.

Quanto à ingestão alimentar ou energética, os animais não apresentaram diferença significativa (Tabela 3, a seguir).

Tabela 3 – Comportamento alimentar, biometria, dosagens plasmáticas e metabolismo de carboidratos

Dados	C	Ovx	C (D-)	Ovx (D-)
Ingestão energética (kJ/dia)	47,3±1,5	43,5±1,8	45,6±7,1	47,7±11,5
Ingestão alimentar (g/dia)	2,9±0,7	2,7±0,4	2,9±0,4	2,9±0,7
Massa do útero (g)	0,09±0,01	0,02±0,003†	0,1±0,03	0,02±0,005§
Massa do TAP (g)	2,5±1,0	4,6±1,2†	2,8±0,7	6,9±1,4‡§
Índice de adiposidade	1,8±0,2	3,8±0,6†	2,0±0,5	4,5±0,9§
Plasma				
25 (OH) D3 (nmol/L)	21,0±0,6	20,6±1,1	6,5±1,0†	4,8±1,6‡
Estradiol (pmol/L)	134,3±35,9	44,0±19,4†	196,7±27,5	38,9±17,9§
Insulina (pmol/L)	64,2±23,3	53,8±23,3	91,2±29,3	119,8±39,1‡
Glicose (mmol/L)	5,9±0,7	7,7±1,3†	6,6±0,6	8,3±0,8
Leptina (10 ³ pg/mL)	1,5±0,5	2,4±0,3†	1,2±0,4	3,1±0,8§
Adiponectina (10 ⁶ pg/mL)	88,2±12,7	20,91±7,2†	81,6±13,0	15,9±5,2§
CT (mmol/L)	1,5±0,3	1,9±0,1†	2,0±0,3†	2,3±0,3‡
TAG (mmol/L)	0,6±0,2	0,9±0,1†	0,9±0,07†	0,9±0,04
Metabolismo				
HOMA-IR	2,7±0,2	5,0±0,7†	4,0±0,9†	6,0±0,6§
QUICKi	1,24±0,19	1,04±0,21	0,97±0,10	0,87±0,10

Legenda: C: controle; Ovx: ovariectomizado; (D-): sem vitamina D; CT, colesterol total; HOMA, modelo de avaliação da homeostase; QUICKi, índice de sensibilidade à insulina; MC, massa corporal; RI, resistência à insulina; TAG, triacilglicerol.

Nota: média ± DP (n = pelo menos 5, ANOVA de um fator e pós teste de Holm-Sidak), $P < 0,05$ quando: † ≠ C, ‡ Ovx, § ≠ C (D-).

Fonte: A autora, 2019.

4.2 Pressão arterial

A pressão arterial aumentou no grupo Ovx desde a segunda semana do estudo em comparação com o grupo C (+4%, $P = 0,02$). A restrição dietética de vitamina D não alterou a pressão arterial nos grupos. Na quarta semana, a diferença entre o grupo Ovx e o grupo C cresceu para +7% ($P = 0,004$). Na sexta semana a diferença foi +10% até o final do

experimento ($P = 0,008$) (Figura 10B). Observamos um efeito substancial da ovariectomia na pressão arterial dos animais (representaram 40% da variância total, $P < 0,001$), mas nenhum efeito da restrição dietética de vitamina D foi observado e ainda, não houve interação entre a restrição da vitamina D na dieta e a ovariectomia (ANOVA de dois fatores).

4.3 Útero

Como esperado, a massa do útero sofreu redução devido à ovariectomia: -78% no grupo Ovx em comparação com o grupo C ($P = 0,0001$) e -80% no grupo Ovx (D-) do que no grupo C (D-) ($P < 0,000$, Tabela 2), diferenças que persistiram após a correção da massa do útero pela MC nos grupos Ovx em comparação com os grupos C correspondentes (ANOVA de dois fatores).

4.4 Análises plasmáticas

O efeito da ovariectomia aumentando a MC pode estar relacionado a outros resultados, como nos valores do perfil lipídico plasmático (Tabela 3). Comparando o grupo Ovx com o grupo C, CT aumentou +27% ($P = 0,017$) e TAG aumentou +50% no grupo Ovx em relação ao grupo C ($P = 0,0007$). Além disso, CT aumentou +33% ($P = 0,0052$) e TAG aumentou +50% no grupo C (D-) em comparação com o grupo C ($P = 0,0017$). Curiosamente, observamos que CT foi maior +21% no Ovx (D-) do que no grupo Ovx ($P = 0,0485$).

As concentrações plasmáticas de 25 (OH) D3 e do estradiol eram esperados devido à restrição dietética de vitamina D e da ovariectomia. Assim, os grupos (D-) mostraram diminuição significativa nos níveis de 25 (OH) D3 no grupo C (D-) *versus* no grupo C (-82%) e no grupo Ovx (D-) *versus* no grupo Ovx (-80%), enquanto os grupos Ovx mostraram diminuição significativa nos níveis de estradiol (Ovx *versus* C, -79%; Ovx (D-) *versus* C (D-), -88%) (Tabela 3).

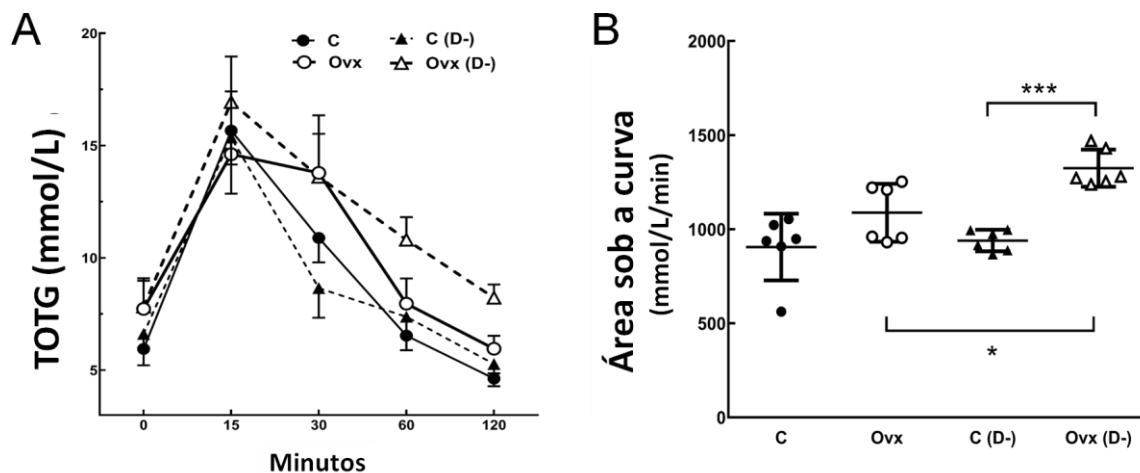
Os níveis de insulina aumentaram no grupo Ovx (D-) em +122% comparado ao grupo Ovx ($P = 0,008$). A restrição dietética da vitamina D foi responsável por 40% da variância total ($P = 0,001$, ANOVA de dois fatores). Já os valores de leptina, adiponectina e glicemia

em jejum aumentaram nos grupos Ovx. Leptina (+60%) e glicose (30%) foram maiores no grupo Ovx quando comparado ao grupo C. Também foram maiores no grupo Ovx (D-) (leptina +158%; glicose +27%) quando comparado com o grupo C (D-) (Tabela 1). Na análise plasmática de adiponectina, houve redução de -76% quando comparados os grupos Ovx e C, e redução de -80% entre os grupos Ovx (D-) e C (D-). A ovariectomia foi um fator primário que afetou as concentrações de adiponectina (diminuída) e leptina (aumentada) (ANOVA de dois fatores).

4.5 Metabolismo de carboidrato

O teste oral de tolerância à glicose (TOTG) mostrou, nos animais ovariectomizados, aumento da glicemia em comparação com os grupos controle. O grupo Ovx (D-) apresentou glicemia aumentada em todos os tempos avaliados e no grupo Ovx houve uma queda lenta percebida por estabilização da glicemia no tempo de 30 minutos. Um comprometimento significativo da tolerância à glicose foi evidente durante o TOTG (Figura 11A). Observamos uma descida lenta da curva do TOTG e maior AUC no grupo Ovx (D-) em comparação com os grupos C (D-) (+41%, $P = 0,0116$) e Ovx (+14%, $P = 0,0001$) (Figura 11B). A ovariectomia foi responsável por 49% da variância total ($P < 0,0001$) e a restrição dietética de vitamina D, 11% da variância total ($P = 0,0141$). A interação entre ovariectomia e a restrição dietética de vitamina D não foi significativa (ANOVA de dois fatores).

Figura 11 – Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG) e Área sob a Curva (AUC) dos animais



Legenda: C: controle; OvX: ovariectomizado; (D-): sem vitamina D; CT, colesterol total; HOMA, modelo de avaliação da homeostase; QUICKi, índice de sensibilidade à insulina; MC, massa corporal; RI, resistência à insulina; TAG, triacilglicerol.

Nota: média $\pm$ DP (n = pelo menos 5, ANOVA de um fator e pós teste de Holm-Sidak), $P < 0,05$ quando: † $\neq$ C, ‡ OvX, § $\neq$ C (D-).

Fonte: A autora, 2019.

O grupo OvX apresentou maior HOMA-IR do que o grupo C (+85%, $P = 0,0002$). O HOMA-IR também foi maior no grupo OvX (D-) do que no grupo C (D-) (+50%, $P = 0,0013$), sendo mais significativo no grupo C (D-) do que no grupo C (+48%, $P = 0,0412$). O grupo OvX não apresentou efeito significativo no HOMA-IR, mas a restrição dietética de vitamina D foi responsável por 18% da variância total ($P = 0,002$, ANOVA de dois fatores).

O QUICKi não foi significativamente diferente entre os grupos. A ovariectomia foi responsável por 14% da variância total ($P = 0,0435$) e a restrição dietética de vitamina D teve um impacto significativo (responsável por 31% da variância total, $P = 0,0048$) (ANOVA de dois fatores).

4.6 Resultados exclusivos do fígado

4.6.1 Bioquímica e Estereologia

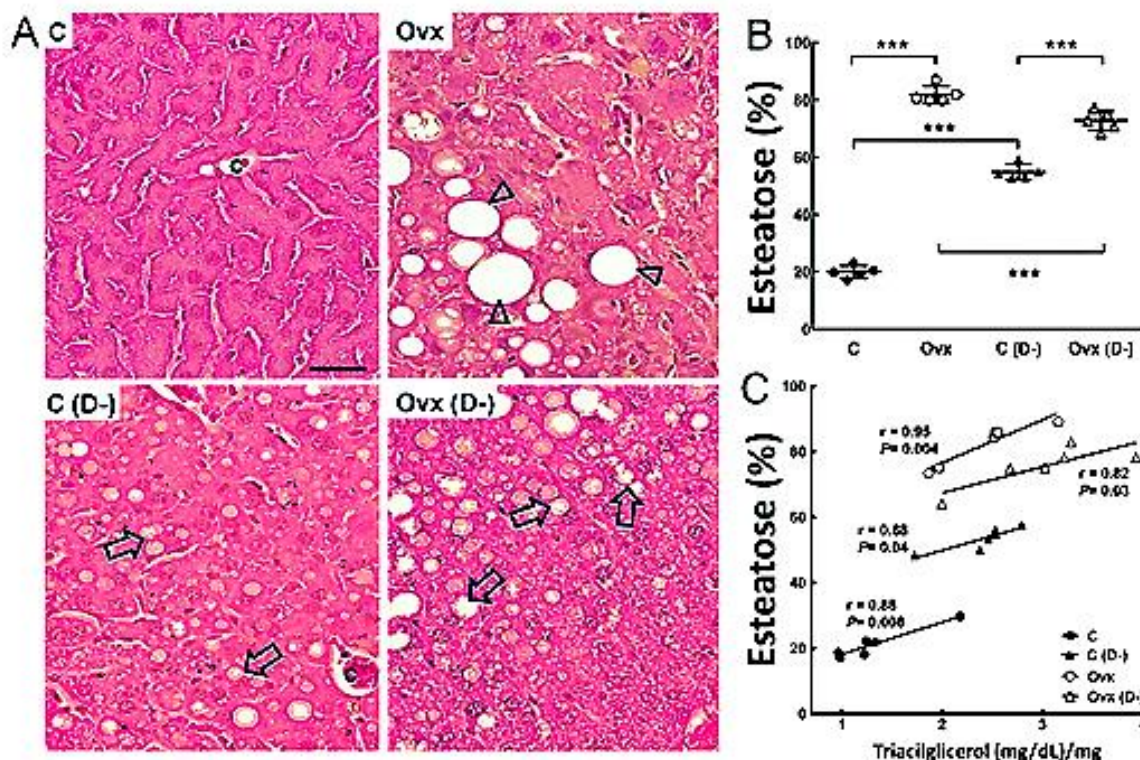
A massa hepática foi mais maior no grupo Ovx do que no grupo C (+43%, $P = 0,03$) e no grupo Ovx (D-) do que no grupo C (D-) (+37%, $P = 0,0281$). TAG hepático foi mais elevado nos grupos Ovx do que nos respectivos grupos C ($P = 0,0001$). Além disso, no grupo Ovx (D-), o TAG hepático foi maior do que no grupo C (D-) (+28%, $P = 0,0054$) e maior do que no grupo Ovx (+33% $P = 0,0232$). O TAG hepático no grupo C (D-) foi mais elevado do que no grupo C (+108%, $P < 0,0001$).

Observamos depósitos de gordura nos hepatócitos (Figura 12A) e quantificamos a esteatose hepática por técnicas de estereologia (Figura 12B). O grupo Ovx apresentou esteatose hepática mais significativa que o grupo C (+162%, $P < 0,0001$) e no grupo Ovx (D-), a esteatose hepática foi maior do que no grupo C (D-) (+46%, $P < 0,0001$). O grupo C (D-) apresentou esteatose mais abundante do que o grupo C (+64%, $P < 0,0001$), mas houve redução da esteatose hepática no grupo Ovx (D-) em comparação com o grupo Ovx (-8%, $P = 0,0003$).

A análise de correlação e regressão linear do TAG hepático vs. esteatose hepática teve coeficientes de correlação de Pearson fortes e significativos. O teste de inclinações não evidenciou diferenças entre os grupos (apenas que as taxas iniciais foram diferentes -- retas paralelas entre si), o que foi confirmado pelo teste de intersecções, que indicou que as taxas iniciais de TAG hepático vs. esteatose hepática foram diferentes nos grupos ($P < 0,0001$) (Figura 12C).

A ovariectomia mostrou um efeito extremamente significativo sobre a esteatose hepática (representou 30% da variância total, $P < 0,0001$), mas a restrição dietética de vitamina D não foi significativa. Além disso, houve uma interação entre os dois fatores na esteatose ($P = 0,0035$).

Figura 12 – Esteatose e triacilglicerol hepático



Legenda: A - Fotomicrografias de cortes de fígado coradas por hematoxilina e eosina (mesma ampliação para todas as fotomicrografias, barra = 50 μ m): Pontas de seta mostram macrovesículas no grupo Ovx, setas abertas indicam pequenas vesículas no tecido hepático em ambos os grupos C (D-) e Ovx (D-). B. Esteatose (%) nos grupos (média $\pm$ DP). *** $P < 0,001$ (ANOVA de um fator e pós teste de Holm-Sidak). C. Correlação e regressões lineares do triacilglicerol hepático vs. esteatose. Nota-se que as correlações são fortes (indicadas pelo coeficiente r) e significativas. Embora não tenha havido diferença entre as inclinações das retas, houve diferença entre os grupos no teste de intersecções.

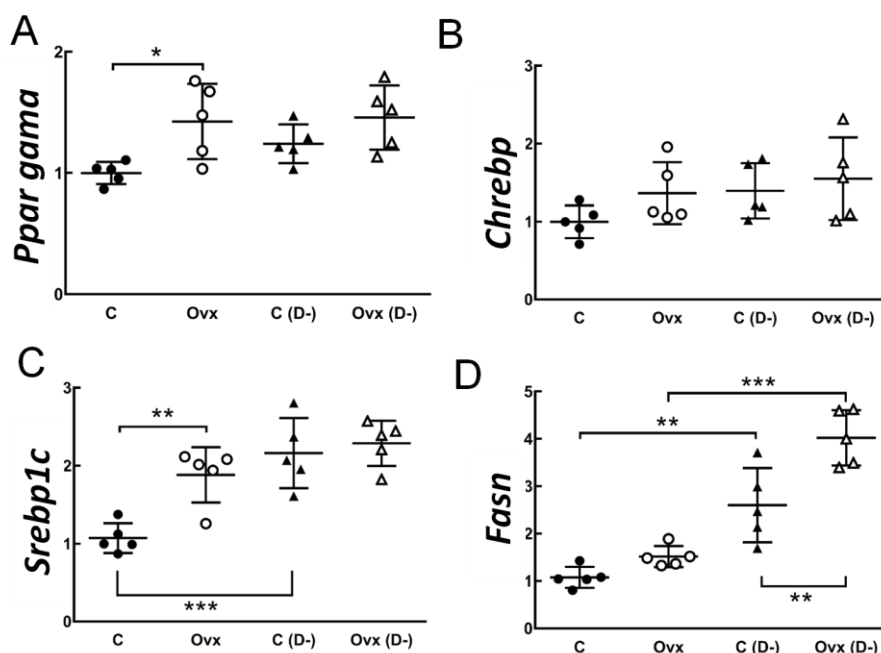
Nota: Grupos: C: controle; Ovx: ovariectomizado; (D-): sem vitamina D.

Fonte: A autora, 2019.

4.6.2 Lipogênese

Na análise da expressão gênica do fígado, o grupo Ovx, mostrou aumento de *Ppar gama* (+55%, $P = 0,04$) (Figura 13A) e *Srebp1c* (+90%, $P = 0,002$) (Figura 13C) em comparação com o grupo C. No entanto, o *Chrebp* não mostrou diferença significativa entre os grupos (Figura 13B). Ambos *Srebp1c* (+110%, $P = 0,0001$) e *Fasn* (+136%, $P = 0,002$) foram mais expressos no grupo C (D-) do que no grupo C. No grupo Ovx (D-), o *Fasn* foi maior em comparação com o grupo Ovx (+166%, $P < 0,0001$) e comparado com o grupo C (D-) (+54%, $P = 0,004$) (Figura 13D).

Figura 13 – Análise da expressão gênica da lipogênese no fígado (expressões relativas de RNAm)



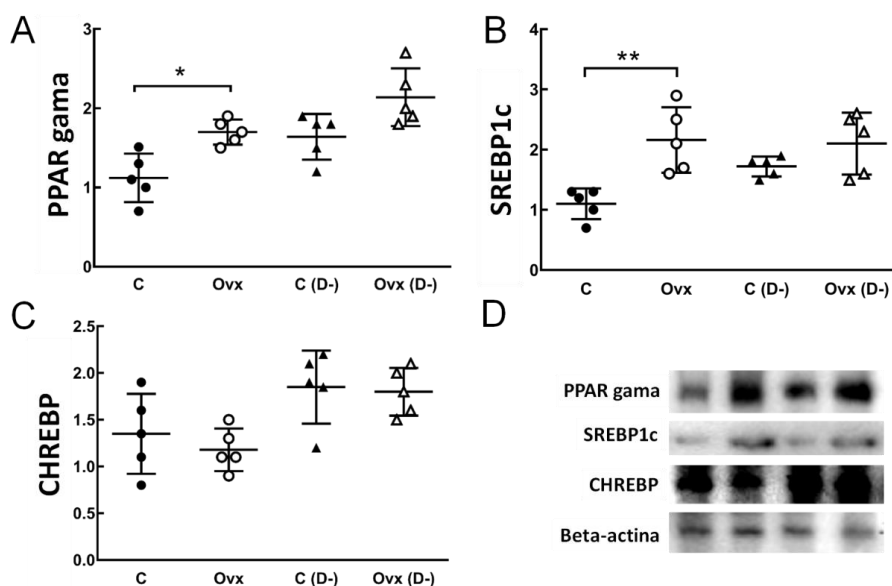
Legenda: A. *Ppar gamma*, B. *Chrebp*, C. *Srebp1c*, D. *Fasn*.

Nota: Grupos: C: controle; OvX: ovariectomizado; (D-): sem vitamina D. Média $\pm$ DP (ANOVA de um fator e o pós teste de Holm-Sidak). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$. CHREBP, Proteínas de ligação do elemento de resposta sensível a carboidratos; FASN, ácido graxo sintase; PPAR, receptor ativado por proliferadores de peroxissoma; SREBP1c, proteína 1 de ligação ao elemento regulador de esterol.

Fonte: A autora, 2019.

Na expressão proteica do fígado, o PPAR gama foi maior no grupo OvX em comparação com o grupo C (+54%, $P = 0,03$) (Figura 14A). Além disso, SREBP1c foi maior no grupo OvX em comparação com o grupo C (+91%, $P = 0,0006$) (Figura 14B). A ovariectomia teve um efeito significativo em todos os dados da qPCR, exceto no SREBP1c. Já a restrição dietética de vitamina D teve um impacto significativo em todos os dados, exceto no PPAR gama. Quando ambos os fatores foram avaliados juntos, mostraram efeitos significativos nas expressões proteicas de PPAR gama e SREBP1c (ANOVA de dois fatores).

Figura 14 - Análise da expressão proteica da lipogênese no fígado



Legenda: A. PPARgamma, B. ChREBP, C. SREBP1c, D. bandas representativas.

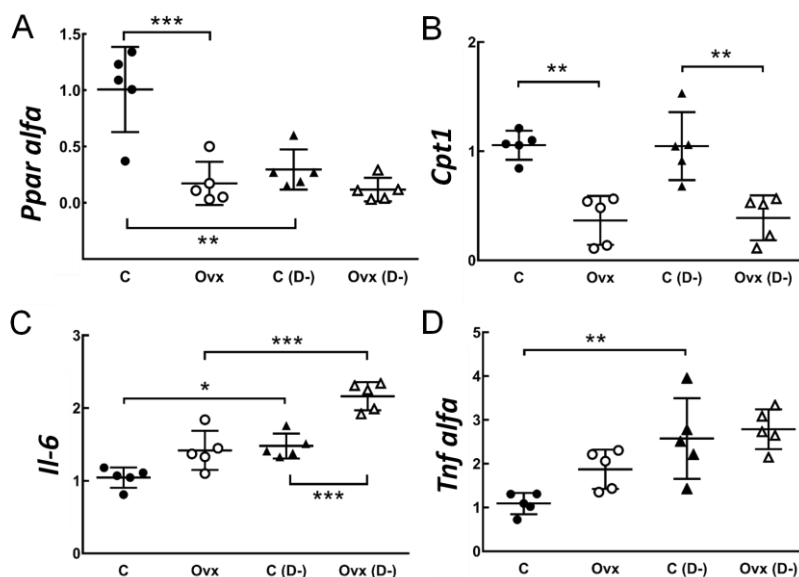
Nota: Grupos: C: controle; OvX: ovariectomizado; (D-): sem vitamina D. Média $\pm$ DP (ANOVA de um fator e o pós teste de Holm-Sidak). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$. Abreviações: CHREBP, Proteínas de ligação do elemento de resposta sensível a carboidratos; PPAR, receptor ativado por proliferadores de peroxissoma; SREBP1c, proteína 1 de ligação ao elemento regulador de esterol.

Fonte: A autora, 2019.

4.6.3 Beta-oxidação

Na análise da expressão gênica do fígado, o *Ppar alfa* foi menor no grupo OvX do que no grupo C (+94%, $P = 0,003$), e no grupo C (D-) em relação ao grupo C (-80% $P = 0,004$) (Figura 15A). Além disso, o grupo OvX comparado ao grupo C mostrou uma expressão diminuída de *Cpt-1* (-64%, $P = 0,004$) e o grupo OvX (D-) também apresentou uma expressão diminuída de *Cpt-1* em comparação com o C (D-) (-60% $P = 0,004$) (Figura 15B). No grupo C (D-) apenas o *Cpt-1* foi afetado (representou 72% da variância total, $P < 0,0001$). No *Ppar alfa*, a restrição dietética de vitamina D (com 22% da variância total, $P = 0,009$) e a ovariectomia (com 35% da variância total, $P = 0,002$) mostraram efeitos significativos, e ambos os fatores interagiram entre si ($P = 0,01$) (ANOVA de dois fatores).

Figura 15 – Análise da expressão gênica da beta-oxidação e inflamação no fígado (expressões relativas de RNAm)



Legenda: A. *Ppar alfa*, B. *Cpt1*, C. *Il-6*, D. *Tnf alfa*.

Nota: Grupos: C: controle; OvX: ovariectomizado; (D-): sem vitamina D. Média $\pm$ DP (ANOVA de um fator e o pós teste de Holm-Sidak). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$. Abreviações: Cpt-1, carnitina palmitoiltransferase 1; Il, interleucina; Ppar receptor ativado por proliferadores de peroxissoma; Tnf, fator de necrose tumoral.

Fonte: A autora, 2019.

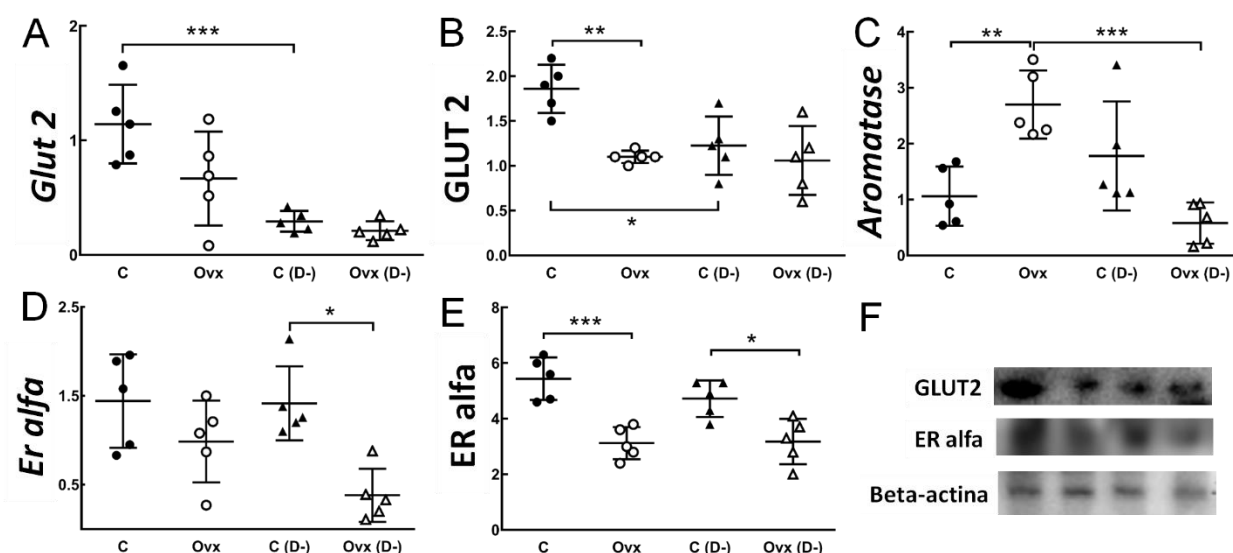
4.6.4 Inflamação

Ainda na análise da expressão gênica do fígado, o grupo C (D-) apresentou a *Il-6* maior que o grupo C (+50%, $P = 0,01$). Além disso, o grupo OvX (D-) apresentou *Il-6* maior que o grupo OvX (+46%, $P = 0,0005$) e maior que o grupo C (D-) (+46%, $P = 0,0002$) (Figura 15C). O grupo C (D-) apresentou maior *Tnf alfa* comparado ao grupo C (+136%, $P = 0,004$) (Figura 15D). A ovariectomia e restrição dietética de vitamina D tiveram efeitos significativos sobre *Il-6* e *Tnf alfa*, mas os fatores não interagiram entre si (ANOVA de dois fatores).

4.6.5 Captação da glicose

Na análise da expressão gênica no fígado, o grupo C (D-) comparado com o grupo C teve uma expressão diminuída de mRNA de *Glut2* (- 73,0%, $P = 0,03$) (Figura 16A). Na expressão proteica, o grupo Ovx comparado ao grupo C mostrou menor expressão da GLUT2 (-42%, $P = 0,01$) e a expressão proteica do GLUT2 foi menor no grupo C (D-) em comparação ao grupo C (-37%, $P = 0,04$) (Figura 16B). A restrição dietética de vitamina D mostrou apenas um efeito na expressão do gene *Glut2* (representou 51% da variância total, $P = 0,002$) (ANOVA de dois fatores).

Figura 16 – Análise da expressão proteica e gênica da captação de glicose e metabolismo do estradiol no fígado



Legenda: A. *Glut 2*, B. GLUT2, C. Aromatase, D. *Er alfa*, E. ER alfa, F. Bandas representativas.

Nota: Grupos: C: controle; Ovx: ovariectomizado; (D-): sem vitamina D. Média $\pm$ DP (ANOVA de um fator e o pós teste de Holm-Sidak). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$. Na nomenclatura dos genes, apenas a primeira letra está em maiúscula e todas as demais letras estão em itálico; já quanto à nomenclatura das proteínas, todas as letras estão em maiúsculo. Abreviações: ER, receptor de estradiol; GLUT, transportador de glicose.

Fonte: A autora, 2019.

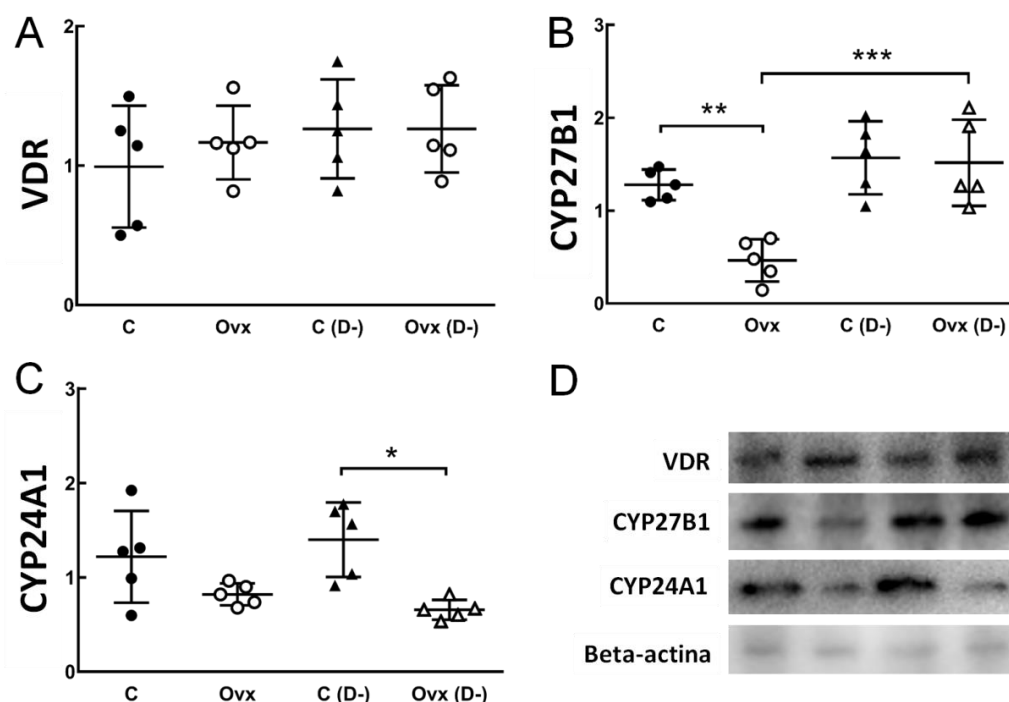
4.6.6 Metabolismo de estradiol

Na análise da expressão gênica no fígado, o grupo Ovx comparado ao grupo C apresentou maior valor da *Aromatase* (+154%, $P = 0,006$), mas o grupo Ovx (D-) apresentou menor expressão da *Aromatase* que o grupo Ovx (-214%, $P = 0,0006$) (Figura 16C). Além disso, o grupo Ovx (D-) comparado com o grupo C (D-) apresentou *Er alfa* inferior (-27%, $P = 0,006$) (Figura 16D). Na expressão proteica, o grupo Ovx apresentou o valor do ER alfa menor que o grupo C (-42%, $P = 0,005$) (Figura 16E). A ovariectomia não apresentou efeito sobre a *Aromatase*, enquanto que a restrição dietética de vitamina D, representou 14% da variância total ($P = 0,01$) (ANOVA de dois fatores).

4.6.7 Metabolismo local de vitamina D

Na análise da expressão proteica no fígado, o CYP27B1 (responsável pela conversão da vitamina D em sua forma ativa, 1,25-dihidroxi vitamina D₃), foi menor no grupo Ovx em comparação ao grupo C (-61%, $P = 0,01$). No entanto, o CYP27B1 foi maior no grupo Ovx (D-) comparado ao grupo Ovx (+200%, $P = 0,0006$) (Figura 17B). Além disso, o CYP24A1 (que regula negativamente a 1,25 (OH)₂ D₃ por hidroxilação da cadeia lateral) foi menor no grupo Ovx (D-) do que no grupo C (D-) (-57%, $P = 0,02$) (Figura 17C). Ovariectomia e restrição dietética de vitamina D tiveram efeitos significativos no CYP27B1 e mostraram interação ente si (ANOVA de dois fatores).

Figura 17 – Análise da expressão proteica do metabolismo local de Vitamina D no fígado



Legenda: VDR, receptor de vitamina D. A. VDR, B. CYP27B1, C. CYP24A1.

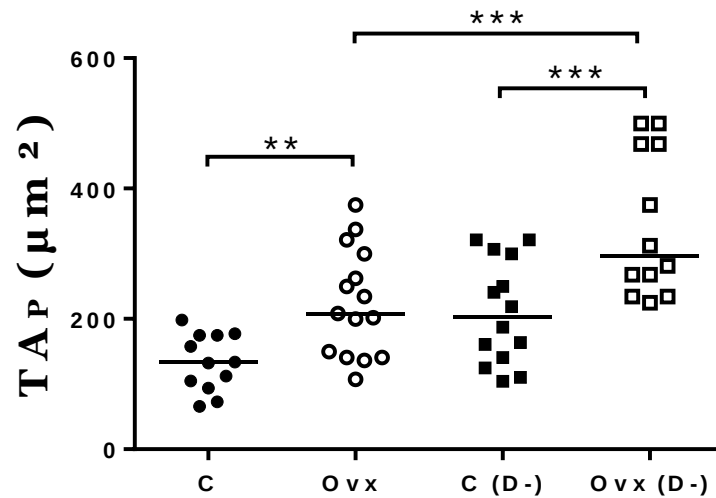
Nota: Grupos: C: controle; OvX: ovariectomizado; (D-): sem vitamina D. Média $\pm$ DP (ANOVA de um fator e o pós teste de Holm-Sidak). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Fonte: A autora, 2019.

4.7 Resultados exclusivos do tecido adiposo periovariano

O ganho de MC foi maior nos grupos ovariectomizados e esse resultado corrobora com o aumento da área média dos adipócitos do TAP. No grupo OvX, a massa do TAP teve aumento de 81% maior quando comparado ao grupo C (Tabela 2) e no grupo OvX (D-) o tamanho da área média dos adipócitos foi 147% maior quando comparado ao grupo C (D-), mostrando a influência da restrição dietética de vitamina D no parâmetro analisado (Figura 18). No grupo OvX (D-), um aumento ainda maior da massa do TAP foi observado, de 49% quando comparado ao grupo OvX (Tabela 2). Esse resultado é confirmado pela distribuição dos adipócitos pela área média. Esta medida foi 68% maior no grupo OvX (D-) em comparação com o grupo OVX; a área média dos adipócitos foi 63% maior no grupo OvX (D-) quando comparado com o grupo C (D-) e esta medida também foi 58% maior no grupo OvX quando comparado com o grupo C (Figura 18).

Figura 18 - Distribuição de adipócitos pela área média, no tecido adiposo periovariano



Legenda: TAP, tecido adiposo periovariano.

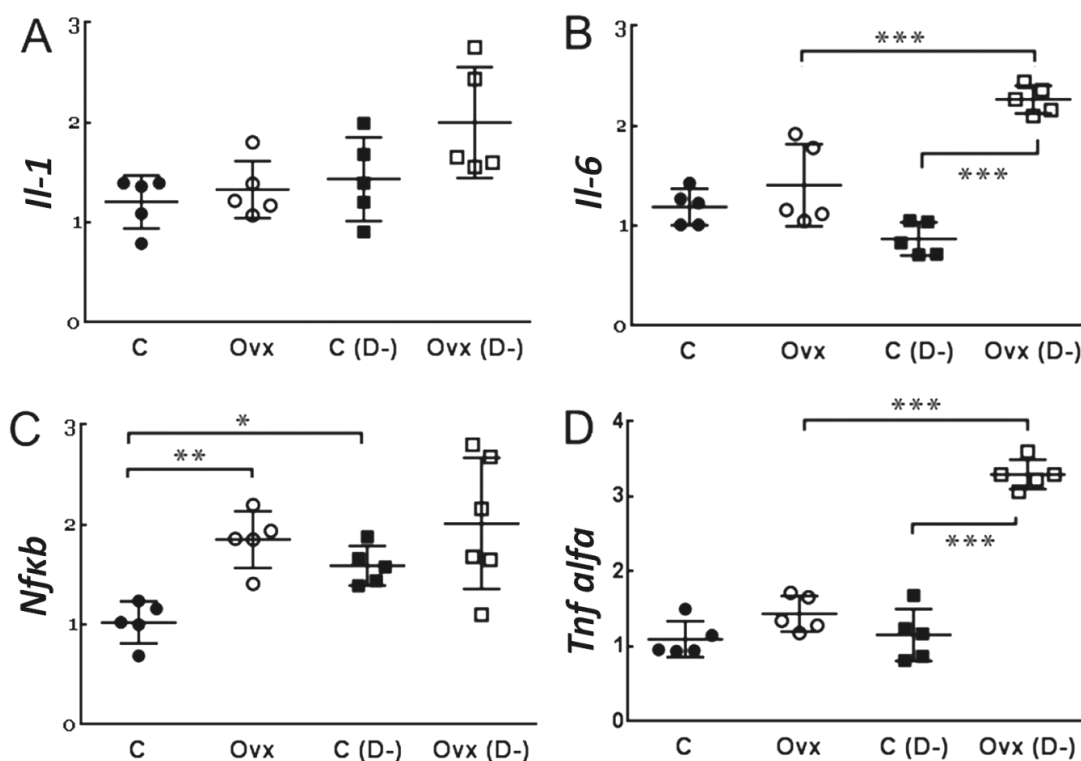
Nota: Grupos: C: controle; Ovx: ovariectomizado; (D-): sem vitamina D. Média $\pm$ DP (ANOVA com o teste de Brown-Forsythe e Welch e pós teste T2 de Tamhane). ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Fonte: A autora, 2019.

4.7.1 Inflamação

Na análise da expressão gênica no TAP, podemos observar que o *Nfkb* e *Il-1* foram maiores quando comparados o grupo Ovx e o grupo C (+ 80% e + 10%, respectivamente). O *Tnf alfa* foi maior no grupo Ovx (D-) quando comparado com os grupos C (D-) (+200%) e Ovx (D-) (+135%). A *Il-6* mostra um resultado semelhante, com um aumento de 160% quando comparados com o grupo C (D-) e aumento de 60% quando comparado com o grupo Ovx (Figura 19).

Figura 19 - Expressão de genes inflamatórios no tecido adiposo periovariano



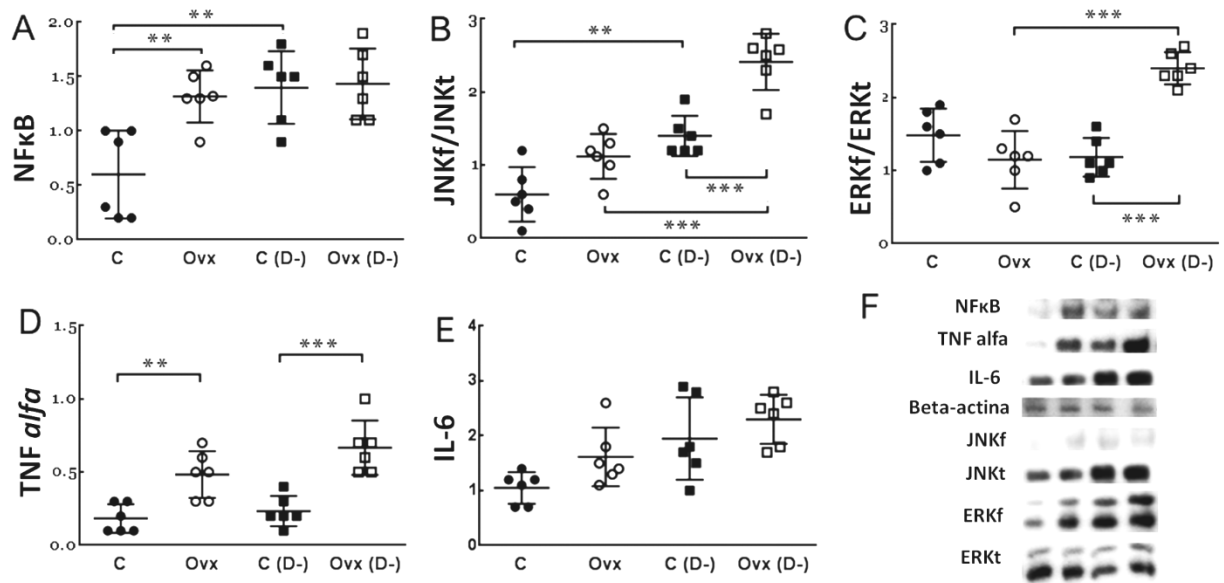
Legenda: Il, interleucina; Nfkb, Factor nuclear kappa B; Tnf, fator de necrose tumoral.

Nota: Grupos: C: controle; Ovx: ovariectomizado; (D-): sem vitamina D. Média $\pm$ DP (ANOVA com o teste de Brown-Forsythe e Welch e pós teste T2 de Tamhane). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Fonte: A autora, 2019.

Finalmente, na expressão proteica no TAP, podemos observar que o NFkB apresentou aumento de 100% quando os grupos Ovx e C foram comparados e aumento de 133% quando comparado com os grupos C (D-) e C. O resultado em pJNK mostrou uma diferença significativa entre todos os grupos analisados. O grupo Ovx apresentou aumento de 83% e o grupo C (D-) teve um aumento de 133% quando comparado ao grupo C. Já o Ovx (D-) apresentou aumento de 71% e 118% quando comparado aos grupos C (D-) e Ovx, respectivamente. O pERK teve um aumento de 100% no grupo Ovx (D-) quando comparado com o grupo C (D-), e um aumento de + 118% quando comparado com o grupo Ovx. O TNF alfa mostrou aumento no grupo Ovx quando comparado ao grupo C e no grupo Ovx (D-) quando comparado ao grupo C (D -), conforme observado na Figura 20.

Figura 20 - Expressão de proteínas inflamatórias no tecido adiposo periovariano



Legenda: A. NFκB, B. JNK, C. ERK, D. TNF alfa, E. IL-6, F. Bandas representativas.

Nota: Grupos: C: controle; OvX: ovariectomizado; (D-): sem vitamina D. Média ± DP (ANOVA com o teste de Brown-Forsythe e Welch e pós teste T2 de Tamhane). ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$; ERK, quinase regulada por sinal extracelular; IL, interleucina; JNK, Proteína que ajuda a regular o processo de autodestruição celular; NFκB, Fator nuclear *kappa* B; TNF, fator de necrose tumoral alfa.

Fonte: A autora, 2019.

5 DISCUSSÃO

Os animais do grupo Ovx (D-) foram expostos a dois insultos diferentes, castração cirúrgica e restrição dietética de vitamina D, resultando em uma soma de efeitos adversos. Os resultados mostraram que a ovariectomia pode prejudicar o metabolismo da glicose e do fígado, cujos efeitos podem ser ainda mais intensos quando combinados à restrição dietética de vitamina D, pois a interação entre ovariectomia e a restrição dietética de vitamina D potencializa os efeitos adversos no acúmulo de lipídios no fígado, na diminuição da beta-oxidação e no aumento da lipogênese. Além disso vimos a primeira evidência, em nosso conhecimento, da restrição dietética de vitamina D ser capaz de agravar o perfil inflamatório no TAP de camundongos fêmeas ovariectomizadas.

Os ovários produzem principalmente estrogênio como hormônio circulante. No entanto tecidos extragonadaes, principalmente o tecido adiposo, podem sintetizar estrogênio quando o ovário para de produzir estrogênio, porém apenas para suprir a necessidade local (CAO; GREGOIRE, 2016).

A reposição de estrogênio resulta em redução da MC em camundongos ovariectomizados (NIGRO *et al.*, 2014), enquanto que a deficiência de estrogênio induz acúmulo de gordura no fígado associado a RI, independente da adiposidade (COTE *et al.*, 2012). No presente estudo houve aumento acentuado do tecido adiposo devido à ovariectomia nos animais, o que concorda com a literatura (PIMENTA *et al.*, 2015; TAGLIAFERRI *et al.*, 2015). Embora os níveis de estrogênio possam exercer controle sobre a adiposidade, os mecanismos envolvidos não são totalmente compreendidos.

Vimos que não há definição do que poderia ser considerado deficiência de vitamina D em camundongos. No presente estudo, a restrição dietética de vitamina D foi acompanhada de menor concentração plasmática de 25 (OH) D₃. A ovariectomia isolada não parece afetar os níveis de 25 (OH) D₃, considerando que não houve diferença nessa dosagem comparando os grupos C e Ovx. O aumento da MC relacionado à deficiência de vitamina D é conhecido em humanos (POURSHAHIDI, 2015) e os níveis plasmáticos de 25 (OH) D₃ são inversamente proporcionais à MC em roedores (provavelmente devido ao efeito de 25 (OH) D₃ aumentando o metabolismo energético) (MARCOTORCHINO *et al.*, 2014). Neste trabalho, observamos aumento da MC quando houve combinação de ovariectomia e restrição dietética de vitamina D.

É comum se detectar na população incremento concomitante de MC e pressão arterial (KANG, 2013), o que é comum na pós-menopausa (RECKELHOFF; FORTEPIANI, 2004; BEN ALI *et al.*, 2016), e isso foi visto neste trabalho experimental. Entretanto, a associação de aumento de pressão arterial e deficiência de vitamina D é controversa. Em humanos se observou hiperatividade do sistema renina-angiotensina (SRA) associado a baixos níveis circulantes de 25 (OH) D3 (MCMULLAN *et al.*, 2017), embora nenhum benefício tenha sido descrito na atividade do SRA e PA quando se corrigiu a deficiência de vitamina D (MCMULLAN *et al.*, 2017; VAN BALLEGOIJEN *et al.*, 2017).

Recordando o metabolismo da vitamina D, 1,25 (OH) D3 (hormônio ativo) é formado por 25-hidroxilação sequencial no fígado e 1-alfa-hidroxilação no rim pelo CYP27B1 (ROSEN *et al.*, 2012). Portanto, a inativação de 25 (OH) D3 é predominantemente iniciada pela sua 23- e 24-hidroxilação pelo CYP24A1 e a produção local de 1,25 (OH) D3 pode suprir a deficiência de vitamina D no órgão alvo (MILLER, 2017). Vimos que o metabolismo local de vitamina D foi alterado no grupo Ovx (D-), e o VDR estável pode representar um efeito compensatório aumentado na expressão de CYP27B1 nesse grupo.

A ovariectomia está relacionada à desregulação da homeostase da glicose, como mencionado em mulheres na pós-menopausa (GRYGIEL-GORNIK *et al.*, 2016). Mulheres com ooforectomia bilateral (assim como ovariectomia em animais) podem ter risco aumentado para desenvolverem diabetes e outras doenças crônicas, como a obesidade (APPIAH; WINTERS; HORNUNG, 2014; ZHU *et al.*, 2014). Além disso, sabe-se que a deficiência de vitamina D em mulheres está associada com menor secreção de insulina estimulada pela glicose, bem como HOMA-IR aumentado (MITRI; MURARU; PITTAS, 2011; PARK; KIM DA; KANG, 2016).

No trabalho atual, em camundongos, a esteatose hepática aumentada ocorreu em ambos os grupos alimentados com dieta restrita em vitamina D. Sabemos que baixas concentrações de 25 (OH) D3 na população podem desempenhar um papel significativo no desenvolvimento da esteatose hepática e RI (LU *et al.*, 2015). Além disso, o aumento da MC e inflamação crônica alteram a resposta à perda hormonal, aumentando os lipídios plasmáticos (TAGLIAFERRI *et al.*, 2015). O mesmo acontece em animais ovariectomizados, há altos níveis plasmáticos de CT e TAG (LUDGERO-CORREIA *et al.*, 2012; NIGRO *et al.*, 2014). A elevação do TAG hepático nos animais Ovx é um achado frequente (TAGLIAFERRI *et al.*, 2015), também observado no presente estudo.

A deficiência de vitamina D agravou a DHGNA e a RI nos animais desse estudo. Há relato de associação de deficiência de vitamina D e aumento da expressão gênica da resistina

e regulação positiva de genes do estresse inflamatório e oxidativo no fígado (HOURIGAN *et al.*, 2015). Além disso sabe-se que o aumento da lipogênese *de novo* diminui a captação de glicose (TOMAZ *et al.*, 2016). No presente estudo houve aumento de IL-6 no grupo Ovx (D-), assim como o acúmulo de gordura hepática nos animais do grupo Ovx e Ovx (D-) foram acompanhados por diminuição na expressão de GLUT2.

A aromatase é fundamental na biossíntese de estrogênios e na conversão de 17-alfa-estradiol para estradiol. A regulação do metabolismo lipídico hepático e a esteatose hepática dependem de estrogênio e de seu receptor. O fígado é essencial para o metabolismo do estrogênio, assim como para a atividade do ER (DELLA TORRE *et al.*, 2011). No fígado, o fator de transcrição dependente de ligante, receptor X alfa hepático (LXR-alfa), funciona como sensor dietético, um modulador transcricional do metabolismo lipídico (ZHANG *et al.*, 2012). O acoplamento entre ER alfa com LXR alfa regula o metabolismo hepático (DELLA TORRE *et al.*, 2016),

Nos animais Ovx (D-) e C (D-) vimos diminuição na expressão do ER alfa, o que concorda com a literatura (GERHARDT, 2016). Contrariamente, o grupo Ovx (D-) apresentou níveis normais da expressão de ER alfa. Na ausência de estradiol (como ocorreu em ambos os grupos Ovx), o complexo de acoplamento cruzado ER alfa-LXR alfa fica comprometido e o desacoplamento de ER alfa do fígado pode causar distúrbios hepáticos e cardiovasculares (DELLA TORRE *et al.*, 2016). Além disso, os esteroides podem regular LXR alfa e 1,25 (OH)₂ D3 modulando a atividade da LXR alfa, regulando negativamente as expressões lipogênicas (como SREBP1C) (HONG; TONTONNOZ, 2014). A deficiência de 1,25 (OH)₂ D3 pode contribuir para aumentar a lipogênese hepática através do aumento do acoplamento de LXR alfa (ENDO-UMEDA *et al.*, 2017). Portanto, tanto a diminuição do estradiol (devido à ovariectomia) quanto a deficiência de vitamina D levam à esteatose hepática

O PPAR gama é um mediador da lipogênese no fígado. Além disso, o SREBP1C, o seu transcrito FASN, e o aumento da lipogênese leva a um acúmulo de lipídios no fígado (CHAMMA *et al.*, 2017; KARISE *et al.*, 2017). Os grupos Ovx e o Ovx (D-) apresentaram níveis elevados de PPAR gama, enquanto os grupos Ovx e C (D-) apresentaram altos níveis de SREBP1C, indicando um papel (tanto da ovariectomia quanto da restrição de vitamina D) na lipogênese. O 25 (OH) D3 é inibidor endógeno do SREBP1C (ASANO *et al.*, 2017), e o SREBP1C é um regulador da lipogênese (TOMAZ *et al.*, 2016), que foram aumentadas nos animais Ovx. A forma precursora do SREBP pode aumentar devido à ação de 25 (OH) D3 e do CT, com diminuição concomitante do SREBP1C (ADAMS *et al.*, 2004). Houve aumento

da FASN nos grupos com restrição dietética de vitamina D, corroborando a associação de deficiência de vitamina D e esteatose hepática em nossos animais.

Neste ponto da discussão, devemos mencionar que a DHGNA pode progredir para esteatohepatite não alcoólica (EHNA), cirrose hepática e, finalmente, carcinoma hepatocelular (QIAN; FAN, 2005), sublinhando o significado clínico desta complexa doença (AGUILA *et al.*, 2010; BETTERMANN; HOHENSEE; HAYBAECK, 2014). A DHGNA também pode estar relacionada com a diminuição da beta-oxidação dos ácidos graxos, além do aumento da lipogênese. O PPAR alfa é o principal regulador da beta-oxidação do ácido graxo nas mitocôndrias e peroxissomas e a ovariectomia regula negativamente o PPAR alfa (RUI, 2014). Sabemos que a 25 (OH) D3 reprime a atividade transcricional do PPAR alfa, mas não do PPAR gama (SAKUMA *et al.*, 2003).

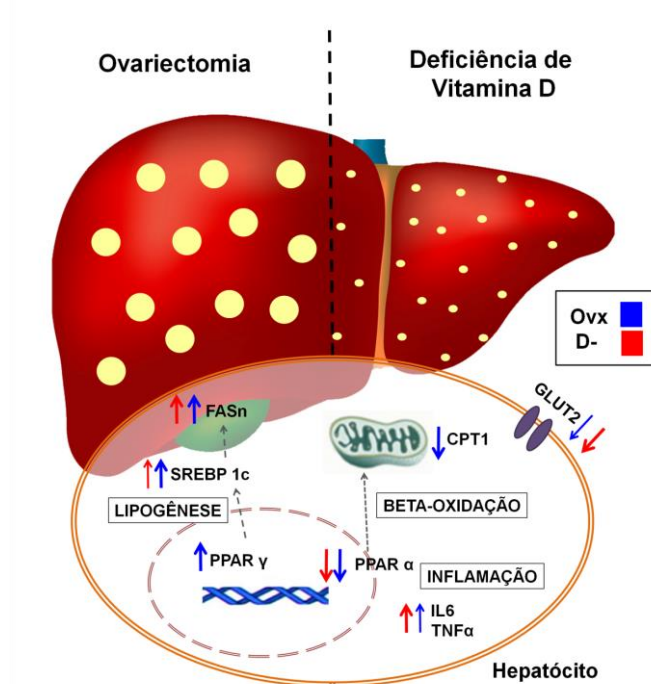
No presente estudo, a expressão de CPT-1 diminuiu nos grupos Ovx, e foi ainda menor no grupo Ovx (D-), indicando uma soma dos efeitos de ovariectomia e restrição dietética de vitamina D na beta-oxidação. Esse aumento na expressão de CPT-1 pode estimular a expressão de outros genes envolvidos no metabolismo da mitocôndria e na oxidação da gordura. Um aumento na expressão do PPAR alfa no fígado está relacionado com a melhora da esteatose hepática, da RI e da inflamação. Além disso, a suplementação de 1,25 (OH)2D3 aumenta tanto o PPAR alfa quanto o CPT-1 (NING *et al.*, 2015), melhorando a função oxidativa do fígado.

O declínio da função ovariana na menopausa também está associado ao incremento da secreção de citocinas inflamatórias (PFEILSCHIFTER *et al.*, 2002; SHIMIZU, 2003) e a menopausa está associada ao ganho de peso e alterações na distribuição da gordura corporal. O acúmulo de gordura visceral tem sido associado ao aumento dos níveis sistêmicos de citocinas inflamatórias, indicando que o estrogênio pode modular a adiposidade corporal e a inflamação sistêmica (LERCHBAUM, 2014). Em nosso estudo, a IL-6 aumentou nos grupos C (D-) e Ovx (D-), o TNF alfa aumentou no grupo C (D-). A IL-6 hepática é essencial para a manutenção metabólica dos hepatócitos e a ativação persistente da sua via de sinalização pode resultar no desenvolvimento de doenças no fígado (SCHMIDT-ARRAS; ROSE-JOHN, 2016). Além disso, a proteína 5 de ligação a ácidos graxos promove a angiogênese tumoral e pode ativar a IL-6 no carcinoma hepatocelular (PAN *et al.*, 2018). O TNF alfa é produzido principalmente por células de Kupffer ativadas no fígado (SU *et al.*, 2018), estando envolvida na fisiopatologia da DHGNA em modelo experimental (KAKINO *et al.*, 2018) (Figura 21).

As vias inflamatórias no tecido adiposo envolvem ativação do NFκB para o núcleo e translocação de p65 para núcleo mediada por degradação de IκB-alfa (TOURNIAIRE *et al.*,

2013). A 1,25 (OH)₂ D₃ inibe marcadores inflamatórios em adipócitos (tanto de camundongo quanto humanos) via p38 MAP quinase e NFκB. A 1,25 (OH)₂ D₃ suprime a secreção da IL-6 nos adipócitos (MARCOTORCHINO *et al.*, 2012) e atenua a secreção da MCP-1 induzida por TNF-alfa no tecido adiposo e inibe o fluxo de adiponectina sem afetar seus níveis de mRNA (LORENTE-CEBRIAN *et al.*, 2012), provando que existe uma ligação entre deficiência de vitamina D e inflamação sistêmica.

Figura 21 – Efeitos da ovariectomia e da restrição dietética de vitamina D no fígado.



Legenda: carnitine palmitoyltransferase (CPT); fatty acid synthase (FASN); glucose transporter (GLUT); interleukin (IL); lipoprotein lipase (FEREZOU-VIALA *et al.*); peroxisome proliferator activator receptor (PPAR); sterol regulatory element-binding transcription factor (SREBP); tumor necrosis factor (TNF), (Ovx, azul), (D-, vermelho).

Fonte: A autora, 2019.

As vias inflamatórias no tecido adiposo envolvem ativação do NFκB para o núcleo e translocação de p65 para núcleo mediada por degradação de IκB-alfa (TOURNIAIRE *et al.*, 2013). A 1,25 (OH)₂ D₃ inibe marcadores inflamatórios em adipócitos (tanto de camundongo quanto humanos) via p38 MAP quinase e NFκB. A 1,25 (OH)₂ D₃ suprime a secreção da IL-6 nos adipócitos (MARCOTORCHINO *et al.*, 2012) e atenua a secreção da MCP-1 induzida por TNF-alfa no tecido adiposo e inibe o fluxo de adiponectina sem afetar seus níveis de mRNA (LORENTE-CEBRIAN *et al.*, 2012), provando que existe uma ligação entre deficiência de vitamina D e inflamação sistêmica.

CONCLUSÃO

Em conclusão, nossos resultados mostram que a restrição dietética de vitamina D associada com a diminuição de estradiol plasmático ocasiona aumento da massa corporal, RI e alterações adversas no metabolismo de carboidratos. Também ocorre o desenvolvimento da esteatose hepática, com aumento do perfil inflamatório, alteração no metabolismo lipídico e RI local no fígado. Além disso, ocorre inflamação do tecido adiposo periovariano nos camundongos fêmea adultas.

Os achados do estudo são relevantes se considerarmos que estamos tratando de duas pandemias mundiais que comumente estão associadas. A deficiência de vitamina D é um problema de saúde pública prevalente em mulheres na pós-menopausa, mas é facilmente tratada. Os achados experimentais atuais são robustos, demonstrando que a ovariectomia e a restrição dietética de vitamina D em camundongos têm efeitos adversos aditivos no fígado e no TAP. O diagnóstico precoce da deficiência de vitamina D pode evitar que os efeitos deletérios fiquem mais graves, principalmente quando está associado com a obesidade.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, C .M. *et al.* Cholesterol and 25-hydroxycholesterol inhibit activation of SREBPs by different mechanisms, both involving SCAP and Insigs. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 279, n. 50, p. 52772-52780, 2004.
- AGUILA, M. B. *et al.* Hepatic insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease. In: MOLIÈRE, J.; GAUTHIER, L. (ed.). **Insulin resistance: symptoms, causes and treatment**. Hauppauge: Nova Science Pu, 2010. p 1-44.
- ANDREOZZI, P. *et al.* Relationship between vitamin D and body fat distribution evaluated by DXA in postmenopausal women. **Nutrition**, Burbank, v. 32, n. 6, p. 687-692, 2016.
- ANNWEILER, C. *et al.* Association of vitamin D deficiency with cognitive impairment in older women: cross-sectional study. **Neurology**, New York, v.74, n. 1, p. 27-32. 2010.
- APPIAH, D.; WINTERS, S. J.; HORNING, C. A. Bilateral oophorectomy and the risk of incident diabetes in postmenopausal women. **Diabetes Care**, Alexandria, v. 37, p. 725-733, 2014.
- ASANO, L. *et al.* Vitamin D Metabolite, 25-Hydroxyvitamin D, Regulates Lipid Metabolism by Inducing Degradation of SREBP/SCAP. **Cell Chem. Biol.**, [s.l.], v. 24, n. 2, p. 207-217. 2017.
- BACON, J. L. The Menopausal Transition. **Obstet. Gynecol. Clin. North Am.**, Philadelphia, v. 44, n. 2, p. 285-296, 2017.
- BELGARDT, B. F. *et al.* Hypothalamic and pituitary c-Jun N-terminal kinase 1 signaling coordinately regulates glucose metabolism. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, Washington, v.107, n. 13, p. 6028-6033, 2010.
- BELLAFANTE, E. *et al.* Hepatic-specific activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1beta protects against steatohepatitis. **Hepatology**, Baltimore, v. 57, n. 4, p. 1343-1356, 2013.
- BEN ALI, S. *et al.* Postmenopausal hypertension, abdominal obesity, apolipoprotein and insulin resistance. **Clin. Exp. Hypertens.**, New York, v. 38, n. 4, p. 370-374, 2016.
- BERGER, J. P.; AKIYAMA, T. E.; MEINKE, P. T. PPARs: therapeutic targets for metabolic disease. **Trends Pharmacol. Sci.**, Amsterdam, v. 26, n. 5, p. 244-251, 2005.
- BETTERMANN, K.; HOHENSEE, T.; HAYBAECK, J. Steatosis and steatohepatitis: complex disorders. **Int. J. Mol. Sci.**, [s.l.], v. 15, n. 6, p. 9924-9944, 2014.
- BJORNDAL, B. *et al.* Different adipose depots: their role in the development of metabolic syndrome and mitochondrial response to hypolipidemic agents. **J. Obes.**, [s.l.], v. 2011, p. 490650, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1155/2011/490650>.

BOUILLON, R. *et al.* Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. **Endocr. Rev.**, Baltimore, v. 29, n. 6, p. 726-776, 2008.

BUSTIN, S. A. *et al.* The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clin. Chem.**, New York, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009.

CAO, J. J.; GREGOIRE, B. R. A high-fat diet increases body weight and circulating estradiol concentrations but does not improve bone structural properties in ovariectomized mice. **Nutr. Res.**, New York, v. 36, n. 4, p. 320-327, 2016.

CASTRO, L. C. The vitamin D endocrine system. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, São Paulo, v. 55, p. 566-575, 2011.

CATTA-PRETA, M. *et al.* A critical analysis of three quantitative methods of assessment of hepatic steatosis in liver biopsies. **Virchows Arch.**, Berlin, v. 459, n. 5, p. 477-485, 2011.

CHAKRAVARTHY, M. V. *et al.* Identification of a physiologically relevant endogenous ligand for PPARalpha in liver. **Cell**, [s.l.], v. 138, n. 3, p. 476-488, 2009.

CHAMMA, C. M. *et al.* A rich medium-chain triacylglycerol diet benefits adiposity but has adverse effects on the markers of hepatic lipogenesis and beta-oxidation. **Food Funct.**, Cambridge, v. 8, n. 2, p. 778-787, 2017.

CHUSYD, D. E. *et al.* Relationships between Rodent White Adipose Fat Pads and Human White Adipose Fat Depots. **Front Nutr.**, [s.l.], v. 3, p. 10, 2016. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnut.2016.00010>.

CINTI, S. The adipose organ. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids**, Edinburgh, v. 73, n. 1, p. 9-15, 2005.

COPELAND, J. L.; CHU, S.Y.; TREMBLAY, M. S. Aging, physical activity, and hormones in women-a review. **J. Aging Phys. Act.**, [s.l.], v. 12, n. 1, p. 101-116, 2004.

COTE, I. *et al.* Liver fat accumulation may be dissociated from adiposity gain in ovariectomized rats. **Climacteric**, London, v. 15, n. 6, p. 594-601, 2012.

DAVIS, S. R. *et al.* Understanding weight gain at menopause. **Climacteric**, London, v. 15, n. 5, p. 419-429, 2012.

DAVISSON, M. T. Rules and guidelines for nomenclature of mouse genes. International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice. **Gene**, Amsterdam, v.147, n. 2, p. 157-160, 1994.

DE BORST, M. H. *et al.* Vitamin D deficiency: universal risk factor for multifactorial diseases? **Curr. Drug. Targets**, [s.l.], v. 12, n. 1, p. 97-106, 2011.

DE SOUZA, C. T. *et al.* Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. **Endocrinology**, Baltimore, v. 146, p. 4192-4199, 2005.

DELLA TORRE, S. *et al.* An Essential Role for Liver ERalpha in Coupling Hepatic Metabolism to the Reproductive Cycle. **Cell Rep.**, [s.l.], v. 15, n. 2, p. 360-371, 2016.

DELLA TORRE, S. *et al.* Amino acid-dependent activation of liver estrogen receptor alpha integrates metabolic and reproductive functions via IGF-1. **Cell Metab.**, Cambridge, v. 13, n. 2, p. 205-214, 2011.

DIAZ BRINTON, R. Minireview: translational animal models of human menopause: challenges and emerging opportunities. **Endocrinology**, Baltimore, v. 153, n. 8, p. 3571-3578, 2012.

DULLOO, A. G. *et al.* Substrate cycling between de novo lipogenesis and lipid oxidation: a thermogenic mechanism against skeletal muscle lipotoxicity and glucolipotoxicity. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.**, London, v. 28, n. 4, p. 29-37, 2004.

EDWARDS, B. J.; LI, J. Endocrinology of menopause. **Periodontol 2000**, Copenhagen, Periodontol, v. 61, n. 1, p. 177-194, 2013.

ENDO-UMEDA, K. *et al.* 1alpha-Hydroxy derivatives of 7-dehydrocholesterol are selective liver X receptor modulators. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, Oxford, v. 172, p. 136-148, 2017.

FEREZOU-VIALA, J. *et al.* Long-term consequences of maternal high-fat feeding on hypothalamic leptin sensitivity and diet-induced obesity in the offspring. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, Bethesda, v. 293, n. 3, p. 1056-1062, 2007.

GERHARDT, K. Two to Tango: ERalpha and Estrogen Balance Cholesterol Metabolism in the Liver. **Biol. Reprod.**, New York, v. 94, p. 131, 2016.

GERONDAKIS, S. *et al.* NF-kappaB control of T cell development. **Nat. Immunol.**, New York, v. 15, p. 15-25, 2014.

GOUGEON, A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. **Endocr. Rev.**, Baltimore, v. 17, n. 2, p.121-155, 1996.

GRYGIEL-GORNIK, B. *et al.* Genetic Background, Adipocytokines, and Metabolic Disorders in Postmenopausal Overweight and Obese Women. **Biochem. Genet.**, New York, v. 54, n. 5, p. 636-652, 2016.

GUNDERSEN, H. J. G. Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary profiles: the edge effect. **J. Microsc.**, Paris, v.111, p. 219-223, 1977.

HALL, J. E. Neuroendocrine changes with reproductive aging in women. **Semin. Reprod. Med.**, New York, v. 25, n. 5, p. 344-351, 2007.

HALL, J. E. Endocrinology of the Menopause. **Endocrinol. Metab. Clin. North Am.**, Philadelphia, v. 44, n. 3, p. 485-496, 2015.

HEANEY, R. P. *et al.* Calcium absorption varies within the reference range for serum 25-hydroxyvitamin D. **J. Am. Coll. Nutr.**, [s.l.], v. 22, n. 2, p. 142-146, 2003.

HIROSUMI, J. *et al.* A central role for JNK in obesity and insulin resistance. **Nature**, London, v. 420, n. 6913, p. 333-336, 2002.

HOLICK, M. F. High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health. **Mayo Clin. Proc.**, Rochester, v. 81, n. 3, p.353-373, 2006.

HONG, C.; TONTONOZ, P. Liver X receptors in lipid metabolism: opportunities for drug discovery. **Nat. Rev. Drug Discov.**, [s.l.], v. 13, n. 6, p. 433-444, 2014.

HOURIGAN, S. K. *et al.* Relation between vitamin D status and nonalcoholic fatty liver disease in children. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, New York, v. 60, n. 3, p. 396-404, 2015.

KAAJA, R. J. Metabolic syndrome and the menopause. **Menopause Int.**, London, v. 14, n. 1, p. 21-25, 2008.

KAKINO, S. *et al.* Pivotal Role of TNF-alpha in the Development and Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in a Murine Model. **Horm. Metab. Res.**, [s.l.], v. 50, p. 80-87, 2018.

KANG, Y. S. Obesity associated hypertension: new insights into mechanism. **Electrolyte Blood Press**, [s.l.], v. 11, n. 2, p. 46-52, 2013.

KARISE, I. *et al.* Liver and Metformin: lessons of a fructose diet in mice. **Biochimie Open**, [s.l.], v. 4, p. 19-30, 2017.

KATZ, A. *et al.* Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Philadelphia, v. 85, n. 7, p. 2402-2410, 2000.

KENTY, J. H.; MELTON, D. A. Testing pancreatic islet function at the single cell level by calcium influx with associated marker expression. **PLoS One**, San Francisco, v. 10, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122044>.

KHACHATRYAN, V. *et al.* Measurement of electroweak production of two jets in association with a Z boson in proton-proton collisions. **Eur. Phys. J. C. Part Fields**, [s.l.], v. 75, p. 66, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1140/epjc/s10052-014-3232-5>.

KIMBALL, S. *et al.* Vitamin D: a growing perspective. **Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.**, Boca Raton, v. 45, n. 4, p. 339-414, 2008.

LA CAVA, A. Leptin in inflammation and autoimmunity. **Cytokine**, San Diego, v. 98, p.51-58, 2017.

LAFONTAN, M.; GIRARD, J. Impact of visceral adipose tissue on liver metabolism. Part I: heterogeneity of adipose tissue and functional properties of visceral adipose tissue. **Diabetes Metab.**, Paris, v. 34, n. 4, p.317-327, 2008.

LERCHBAUM, E. Vitamin D and menopause-a narrative review. **Maturitas**, Limerick, v. 79, n. 1, p. 3-7, 2014.

LORENTE-CEBRIAN, S. *et al.* Differential effects of 1 α ,25-dihydroxycholecalciferol on MCP-1 and adiponectin production in human white adipocytes. **Eur. J. Nutr.**, Darmstadt, v. 51, n. 3, p.335-342, 2012.

LU, Z. *et al.* Serum vitamin D levels are inversely related with non-alcoholic fatty liver disease independent of visceral obesity in Chinese postmenopausal women. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, Oxford, v. 42, n. 2, p.139-145, 2015.

LUDGERO-CORREIA, A. *et al.* Effects of high-fat diet on plasma lipids, adiposity, and inflammatory markers in ovariectomized C57BL/6 mice. **Nutrition**, Burbank, v. 28, n. 3, p. 316-323, 2012.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Stereological tools in biomedical research. **An. Acad. Bras. Cienc.**, Rio de Janeiro, v. 75, n. 4, p. 469-486, 2003.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A.; DEL SOL, M. Tips for studies with quantitative morphology (morphometry and stereology). **Int. J. Morphol.**, Temuco, v. 35, p. 1482-1494, 2017.

MARCOTORCHINO, J. *et al.* Vitamin D reduces the inflammatory response and restores glucose uptake in adipocytes. **Mol. Nutr. Food Res.**, Weinheim, v. 56, p. 1771-1782, 2012.

MARCOTORCHINO, J. *et al.* Vitamin D protects against diet-induced obesity by enhancing fatty acid oxidation. **J. Nutr. Biochem.**, Stoneham, v. 25, n. 10, p.1077-1083, 2014.

MASON, R. S.; SEQUEIRA, V. B.; GORDON-THOMSON, C. Vitamin D: the light side of sunshine. **Eur. J. Clin. Nutr.**, London, v. 65, n. 9, p. 986-993, 2011.

MASOODI, M. *et al.* Lipid signaling in adipose tissue: Connecting inflammation & metabolism. **Biochim Biophys Acta**, v. 1851, p. 503-518, 2015.

MATTHEWS, D. R. *et al.* Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. **Diabetologia**, v. 28, p. 412-419, 1985.

MCMULLAN, C. J. *et al.* The effect of vitamin D on renin-angiotensin system activation and blood pressure: a randomized control trial. **J. Hypertens.**, London, v. 35, n. 4, p. 822-829, 2017.

MILLER, W. L. Genetic disorders of Vitamin D biosynthesis and degradation. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, Oxford, v. 165, p. 101-108, 2017.

MITRI, J.; MURARU, M.D.; PITTAS, A.G. Vitamin D and type 2 diabetes: a systematic review. **Eur. J. Clin. Nutr.**, London, v. 65, n. 9, p. 1005-1015, 2011.

MOSEKILDE, L. Vitamin D and the elderly. **Clin. Endocrinol.**, Oxford, v. 62, p. 265-281, 2005.

NIGRO, M. *et al.* A change in liver metabolism but not in brown adipose tissue thermogenesis is an early event in ovariectomy-induced obesity in rats. **Endocrinology**, Baltimore, v. 155, n. 8, p. 2881-2891, 2014.

NING, C. *et al.* Lipid metabolism and inflammation modulated by Vitamin D in liver of diabetic rats. **Lipids Health Dis.**, London, v. 14, p. 31, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12944-015-0030-5>.

NORMAN, A.W. From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v. 88, n. 2, p. 491S-499S, 2008.

OECKINGHAUS, A.; GHOSH, S. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. **Cold Spring Harb Perspect. Biol.**, v. 1, p.34, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000034>.

PAN, L. *et al.* Fatty acid binding protein 5 promotes tumor angiogenesis and activates the IL6/STAT3/VEGFA pathway in hepatocellular carcinoma. **Biomed. Pharmacother.**, Paris, v. 106, p. 68-76, 2018.

PARK, S.; KIM DA, S.; KANG, S. Vitamin D deficiency impairs glucose-stimulated insulin secretion and increases insulin resistance by reducing PPAR-gamma expression in nonobese Type 2 diabetic rats. **J. Nutr. Biochem.**, Stoneham, v. 27, p. 257-265, 2016.

PAWLAK, D. B.; KUSHNER, J. A.; LUDWIG, D. S. Effects of dietary glycaemic index on adiposity, glucose homeostasis, and plasma lipids in animals. **Lancet**, London, v. 364, n. 9436, p. 778-785, 2004.

PETTINELLI, P.; VIDELA, L.A. Up-regulation of PPAR-gamma mRNA expression in the liver of obese patients: an additional reinforcing lipogenic mechanism to SREBP-1c induction. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Philadelphia, v. 96, n. 5, p.1424-1430, 2011.

PFEILSCHIFTER, J. *et al.* Changes in proinflammatory cytokine activity after menopause. **Endocr. Rev.**, Baltimore, v. 23, n. 1, p. 90-119, 2002.

PIMENTA, M. *et al.* High-intensity interval training beneficial effects on body mass, blood pressure, and oxidative stress in diet-induced obesity in ovariectomized mice. **Life Sci.**, Oxford, v. 139, p. 75-82, 2015.

POSTIC, C.; DENTIN, R.; GIRARD, J. Role of the liver in the control of carbohydrate and lipid homeostasis. **Diabetes Metab.**, Paris, v. 30, p. 398-408, 2004.

POSTIC, C. *et al.* Development and regulation of glucose transporter and hexokinase expression in rat. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v. 266, n. 4, p. E548-559, 1994.

POURSHAHIDI, L. K. Vitamin D and obesity: current perspectives and future directions. **Proc. Nutr. Soc.**, London, v. 74, n. 2, p. 115-124, 2015.

PRENTICE, A. Vitamin D deficiency: a global perspective. **Nutr. Rev.**, New York, v. 66, suppl. 2, p. S153-S164, 2008.

PROENCA, A. R. *et al.* New concepts in white adipose tissue physiology. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirao Preto, v. 47, n. 3, p.192-205, 2014.

QIAN, Y.; FAN, J. G. Obesity, fatty liver and liver cancer. **Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.**, [s.l.], v. 4, p. 173-177, 2005.

RECKELHOFF, J. F.; FORTEPIANI, L. A. Novel mechanisms responsible for postmenopausal hypertension. **Hypertension**, Dallas, v. 43, n. 5, p. 918-923, 2004.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY JUNIOR, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J. Nutr.**, Philadelphia, v.123, n. 11, p. 1939-1951, 1993.

ROGERS, N. H. *et al.* Reduced energy expenditure and increased inflammation are early events in the development of ovariectomy-induced obesity. **Endocrinology**, Baltimore, v. 150, n. 5, p. 2161-2168, 2009.

RORATO, R. *et al.* LPS-Induced Low-Grade Inflammation Increases Hypothalamic JNK Expression and Causes Central Insulin Resistance Irrespective of Body Weight Changes. **Int. J. Mol. Sci.**, [s.l.], v.18, n. 7, p. 1431, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms18071431>.

ROSEN, C. J. *et al.* The nonskeletal effects of vitamin D: an Endocrine Society scientific statement. **Endocr. Rev.**, Baltimore, v. 33, n. 3, p. 456-492, 2012.

RUI, L. Energy metabolism in the liver. **Compr. Physiol.**, Bethesda, v. 4, n. 1, p.177-197, 2014.

SABIO, G.; DAVIS, R. J. TNF and MAP kinase signalling pathways. **Semin. Immunol.**, Philadelphia, v. 26, n. 3, p. 237-245, 2014.

SAKUMA, T. *et al.* Inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor alpha signaling by vitamin D receptor. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, New York, v. 312, n. 2, p. 513-519, 2003.

SANTORO, N. Perimenopause: From Research to Practice. **Womens Health**, London, v. 25, n. 4, p. 332-339, 2016.

SCHMIDT-ARRAS, D.; ROSE-JOHN, S. IL-6 pathway in the liver: From physiopathology to therapy. **J. Hepatol.**, Amsterdam, v. 64, n. 6, p. 1403-1415, 2016.

SHIMIZU, I. Impact of oestrogens on the progression of liver disease. **Liver Int.**, Oxford, v. 23, n. 1, p. 63-69, 2003.

SHIMOMURA, I.; BASHMAKOV, Y.; HORTON, J. D. Increased levels of nuclear SREBP-1c associated with fatty livers in two mouse models of diabetes mellitus. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 274, n. 42, p. 30028-30032, 1999.

SMITH, B. W.; ADAMS, L. A. Nonalcoholic fatty liver disease and diabetes mellitus: pathogenesis and treatment. **Nat. Rev. Endocrinol.**, London, v. 7, n. 8, p. 456-465, 2011.

SOULES, M. R. et al. Stages of Reproductive Aging Workshop (STRAW). **J. Womens Health Gend. Based. Med.**, Larchmont, v. 10, n. 9, p. 843-848, 2001.

STEENBOCK, H. The Induction of Growth Promoting and Calcifying Properties in a Ration by Exposure to Light. **Science**, Washington, v. 60, n. 1549, p. 224-225, 1924.

STEENBOCK, H.; HART, E. B. The influence of function on the lime requirement of animals. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 14, p. 59-73, 1916.

SU, L. et al. Kupffer cell-derived TNF-alpha promotes hepatocytes to produce CXCL1 and mobilize neutrophils in response to necrotic cells. **Cell Death Dis.**, [s.l.], v. 9, p. 323, 2018.

SUZUKI, A.; ABDELMALEK, M. F. Nonalcoholic fatty liver disease in women. **Womens Health**, London, v. 5, n. 2, p. 191-203, 2009.

TAGLIAFERRI, C. *et al.* Increased body fat mass and tissue lipotoxicity associated with ovariectomy or high-fat diet differentially affects bone and skeletal muscle metabolism in rats. **Eur. J. Nutr.**, Darmstadt, v. 54, n. 7, p. 1139-1149, 2015.

TAI, M. M. A mathematical model for the determination of total area under glucose tolerance and other metabolic curves. **Diabetes Care**, Alexandria, v. 17, n. 2, p. 152-154, 1994.

TAMHANE, A. C. A comparison of procedures for multiple comparisons of means with unequal variances. **J. Amer. Statist. Ass.**, [s.l.], v. 74, p. 471-480, 1979.

TILG, H.; MOSCHEN, A. R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. **Nat. Rev. Immunol.**, London, v. 6, p. 772-783, 2006.

TOMAZ, L. M. *et al.* GLUT2 proteins and PPARgamma transcripts levels are increased in liver of ovariectomized rats: reversal effects of resistance training. **J. Exerc. Nutrition Biochem.**, [s.l.], v. 20, n. 2, p. 51-57, 2016.

TOPATAN, S.; YILDIZ, H. Symptoms experienced by women who enter into natural and surgical menopause and their relation to sexual functions. **Health Care Women Int.**, New York, v. 33, n. 6, p. 525-539, 2012.

TOURNIAIRE, F. *et al.* Chemokine Expression in Inflamed Adipose Tissue Is Mainly Mediated by NF-kappaB. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 6, p. e66515, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066515>.

TOURNIER, C. *et al.* MKK7 is an essential component of the JNK signal transduction pathway activated by proinflammatory cytokines. **Genes Dev.**, New York, v. 15, n. 11, p. 1419-1426, 2001.

TSCHANZ, S. A.; BURRI, P. H.; WEIBEL, E. R. A simple tool for stereological assessment of digital images: the STEPanizer. **J. Microsc.**, Paris, v. 243, n. 1, p. 47-59, 2011.

TSIARAS, W. G.; WEINSTOCK, M. A. Factors influencing vitamin D status. **Acta Derm. Venereol.**, Stockholm, v. 91, p. 115-124, 2011.

VAN BALLEGOOIJEN, A. J. *et al.* Joint Association of Low Vitamin D and Vitamin K Status With Blood Pressure and Hypertension. **Hypertension**, Dallas, v. 69, n. 6, p. 1165-1172, 2017.

VIDELA, L. A.; PETTINELLI, P. Misregulation of PPAR Functioning and Its Pathogenic Consequences Associated with Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Human Obesity. **PPAR Res**, New York, v. 2012, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1155/2012/107434>.

VIEIRA-POTTER, V. J. *et al.* Adipose tissue inflammation and reduced insulin sensitivity in ovariectomized mice occurs in the absence of increased adiposity. **Endocrinology**, Baltimore, v. 153, n. 9, p. 4266-4277, 2012.

WINTOUR, E. M.; HENRY, B. A. Glycerol transport: an additional target for obesity therapy? **Trends Endocrinol. Metab.**, New York, v. 17, n. 3, p. 77-78, 2006.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. 5. ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 2010.

ZHANG, Y. *et al.* Liver LXRA expression is crucial for whole body cholesterol homeostasis and reverse cholesterol transport in mice. **J. Clin. Invest.**, New York, v. 122, n. 5, p.1688-1699, 2012.

ZHANG, Y. *et al.* Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, London, v. 372, p. 425-432, 1994.

ZHU, L. *et al.* Estrogen signaling prevents diet-induced hepatic insulin resistance in male mice with obesity. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, Bethesda, v. 306, n. 10, p. E1188-1197, 2014.

ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCANTARA GOMES



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº CEUA/038/2015 sobre " Impacto da deficiência de vitamina D no risco metabólico na menopausa" sob a responsabilidade de Márcia Barbosa Aguiar Mandarim de Lacerda, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEUA), em 24/11/2015. Este certificado expira em 24/11/2019.

Rio de Janeiro, 24 de Novembro de 2015.

Prof. Dr. Israel Felzenszwalb
CEUA/IBRAG/UERJ

Profa. Dra. Patrícia C. Lisboa
CEUA/IBRAG/UERJ

/ass

ANEXO B – Primeiro artigo científico publicado

Biomedicine & Pharmacotherapy 107 (2018) 878–888



Contents lists available at ScienceDirect

Biomedicine & Pharmacotherapy

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bioph

Vitamin D deficiency aggravates the liver metabolism and inflammation in ovariectomized mice

Celina C. Borges, Isabele Bringhenti, Carlos A. Mandarim-de-Lacerda, Marcia B. Aguilã^{a,1}^a Laboratory of Morphometry, Metabolism and Cardiovascular Disease, Biomedical Center, Institute of Biology, The University of the State of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Menopause
Liver lipogenesis
Liver beta-oxidation
Steatosis
Molecular biology

ABSTRACT

Aims: A prevalence of vitamin D deficiency has been reported in association with the postmenopause. Thus, we aimed to experimentally study the effect of the vitamin D deficiency and ovariectomy, alone or combined, in the liver damage.

Main methods: Three-months-old female mice C57BL/6 with bilateral ovariectomy (Ovx group, n = 30) or a sham procedure (n = 30) were separated feeding control diet (C, n = 15) or a diet restricted in vitamin D (D-, n = 15) during additional 12 weeks.

Key findings: Body mass (BM) and blood pressure (BP) were higher in Ovx than in C animals, but highest in Ovx (D-) that also showed glucose intolerance/ insulin resistance. Plasmatic lipids, alanine aspartase transferase, and hepatic steatosis were increased because of the combination of Ovx and D-. However, D- had little implication in the changes of the BM and BP, but affected hepatic steatosis. Gene and protein expressions demonstrated an impaired glucose uptake in the liver because of Ovx and D-, and an increase in lipogenesis and decrease in beta-oxidation in the liver associated more to the Ovx, but also evident in D-. Also, interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha showed an enhancement due to dietary restriction of vitamin D.

Significance: The findings demonstrated that ovariectomy and dietary restriction of vitamin D are inducers of harmful effects on the liver of mice, enhancing lipogenesis and inflammation and compromising beta-oxidation. The treatment of vitamin D deficiency is simple and not costly and can reduce the impact of menopause on metabolism and especially the liver.

ANEXO C – Segundo artigo científico publicado

Life Sciences 191 (2017) 1–8



Contents lists available at ScienceDirect

Life Sciences

journal homepage: www.elsevier.com/locate/lifescie

Ovariectomy modify local renin-angiotensin-aldosterone system gene expressions in the heart of ApoE (–/–) mice

Celina Carvalho Borges, Aline Penna-de-Carvalho, Jorge L. Medeiros Junior, Marcia Barbosa Aguila, Carlos A. Mandarim-de-Lacerda*

Laboratory of Morphometry, Metabolism and Cardiovascular Disease, Biomedical Center, Institute of Biology, State University of Rio de Janeiro, Brazil



ARTICLE INFO

Keywords:
Menopause
Hypertension
Renin
Angiotensin-converting enzyme
Knockout animals

ABSTRACT

Aims: The evaluation of the local Renin-Angiotensin-Aldosterone system (RAAS) gene expressions in the heart of ovariectomized (OVX) apolipoprotein E deficient mice (ApoE).

Methods: Four-months old C57BL/6 female mice (wild-type, wt, $n = 20$), and ApoE female mice ($n = 20$), were submitted to OVX or a surgical procedure without ovary removal (SHAM) and formed four groups ($n = 10$ /group): SHAM/wt, SHAM/ApoE, OVX/wt, and OVX/ApoE.

Key findings: OVX led to greater body mass, plasma triglycerides (TG) and total cholesterol, and resulted in insulin resistance and altered RAAS gene expressions in the heart tissue. The gene expression of angiotensin-converting enzyme (ACE)-2 was lower in OVX/wt than in SHAM/wt ($P = 0.0004$), Mas receptor (MASr) was lower in OVX/wt compared to SHAM/wt ($P < 0.0001$). Also, angiotensin II receptor type 1 (AT1r) was higher in OVX/wt than in SHAM/wt ($P = 0.0229$), and AT2r was lower in OVX/wt than in SHAM/wt ($P = 0.0121$). OVX and ApoE deficiency showed interaction potentializing the insulin resistance, increasing TG levels and altering ACE and MASr gene expressions. ACE gene expression was higher in OVX/ApoE than in OVX/wt ($P < 0.0001$), and MASr gene expression was lower in OVX/ApoE than in OVX/wt ($P < 0.0001$).

Significance: The impact of OVX on local RAAS cascade in the heart of ApoE deficient animals, besides the metabolic changes culminating with insulin resistance, involves an upregulation of renin, ACE, and AT1r gene expressions. The findings may contribute to clarify the mechanisms of development of postmenopausal hypertension and the link between RAAS and apolipoprotein E.

ANEXO D - Artigo científico aceito para publicação

Climacteric - Decision on Manuscript ID DCLI-2019-0005.R1

Caixa de entrada



Climacteric

para mandarim, eu

13-Mar-2019

Dear Professor Mandarin-de-Lacerda:

Ref: Vitamin D restriction enhances the periovarian adipose tissue inflammation in a model of menopause

Our referees have now considered your revised paper and have recommended publication in Climacteric. We are pleased to accept your paper in its current form which will now be forwarded to the publisher for copy editing and typesetting.

You will receive proofs for checking, and instructions for transfer of copyright in due course.

The publisher also requests that proofs are checked and returned within 48 hours of receipt.

Thank you for your contribution to Climacteric and we look forward to receiving further submissions from you.

Sincerely,
Professor Baber
Editor-in-Chief, Climacteric
Rodney.baber@sydney.edu.au