



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Thais Christine Maia Ceciliano

**Metabolismo e fígado em camundongos alimentados cronicamente
com frutose: papel da vitamina D, deficiência e suplementação**

Rio de Janeiro

2019

Thais Christine Maia Ceciliano

Metabolismo e fígado em camundongos alimentados cronicamente com frutose: papel da vitamina D, deficiência e suplementação

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

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarin-de-Lacerda

Rio de Janeiro

2019

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CBA

C388 Ceciliano, Thais Christine Maia.

Metabolismo e fígado em camundongos alimentados cronicamente com frutose: papel da vitamina D, deficiência e suplementação/ Thais Christine Maia Ceciliano. – 2019.
84 f.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarin-de-Lacerda

Tese (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) –
Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia
Roberto Alcântara Gomes.

1. Frutose – Teses. 2. Vitamina D - Teses. 3. Deficiência de
Vitamina D - Teses. 4. Fígado – Teses. 5. Metabolismo – Teses.
6. Camundongo como animal de laboratório. I. Mandarin de
Lacerda, Carlos Alberto. II. Universidade do Estado do Rio de
Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 664.162.7

Bibliotecária: Thais Ferreira Vieira CRB/7 - 5302

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

Assinatura

Data

Thais Christine Maia Ceciliano

Metabolismo e fígado em camundongos alimentados cronicamente com frutose: papel da vitamina D, deficiência e suplementação

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 04 de novembro de 2019.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarim de Lacerda (Orientador)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof^a. Dra. Márcia Barbosa Águila Madarim de Lacerda
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof^a. Dra. Simone Vardas da Silva
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

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

Prof^a. Dra. Wilza Arantes Ferreira
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro
2019

DEDICATÓRIA

Mais uma vez, dedico este trabalho as pessoas mais importantes da minha vida: meus pais Cristina e Valter. Sem vocês, eu nada seria.

AGRADECIMENTOS

À UERJ, pela oportunidade de realizar mais um sonho. Universidade à qual o meu orgulho será eterno. Pelos últimos 10 anos, minha segunda (as vezes primeira) casa. Muito obrigada;

Aos Animais Experimentais, com todo respeito e gratidão;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo oferecimento a este e muitos outros trabalhos em nosso laboratório, uma chance;

Ao meu orientador Dr. Carlos Alberto Mandarin-de-Lacerda, pela oportunidade em mais um passo do meu crescimento intelectual e profissional, pelos ensinamentos e pelas inúmeras trocas de conhecimentos às quais me deu oportunidade sempre;

À minha IC, Rafaela Dutra, por todo auxílio, amizade, força e companheirismo;

À amiga Priscila Carapeto, por toda ajuda com os animais, desde as primeiras manipulações até o momento final, e pelas inúmeras conversas e desabafos. Tenho muito orgulho de você;

À Thaty Marinho, pela divisão de cuidado com meus filhotes, do início ao fim;

Ao grande amigo Victor Motta, por você estar sempre ao meu lado. Junto com o título de doutora, levo o título de sua amiga para sempre;

À irmã científica mais nova, Renata Spezani, pela força dada nesse finalzinho;

Aos companheiros e técnicas do LMMC por toda ajuda e convivência;

Aos professores dessa jornada, que dividiram conosco seu bem mais preciso: o conhecimento;

À amiga Rosane, pela cumplicidade de sempre, em tudo;

À amiga Yasmin, pelas doses diárias de humor, força e parceria, mesmo que a distância;

À família presente nos momentos necessários;

Ao gêmulo Ricardo, que chegou no momento de colocar minha cabeça no eixo, capaz de passar os mais sábios ensinamentos e embarcar de cabeça em todas as minhas ideias loucas;

Aos meus pais, Cristina e Valter, pelo amor incondicional, pelo exemplo, por me ensinar a nunca aceitar a derrota e por estarem sempre ao meu lado não importando da circunstância;

Aos meus anjinhos, vô, dinda e tia, que me guiam diariamente. Isso também é por vocês. Vocês fazem muita falta!

“Pesquisar é acordar para o mundo”

Marcelo Lamy

RESUMO

CECILIANO, Thais Christine Maia. **Metabolismo e fígado em camundongos alimentados cronicamente com frutose: papel da vitamina D, deficiência e suplementação**. 2019. 84 f. Tese. Doutorado (Biologia Humana e Experimental) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 2019.

A frutose adicionada a refrigerantes e alimentos processados, assim como a detecção frequente de deficiência de vitamina D no organismo, são dois insultos cada vez mais considerados como causadores de lesões em órgãos-alvo. Estudamos o fígado após uma dieta crônica rica em frutose, deficiente e suplementada com vitamina D. Sessenta camundongos machos *C57Bl/6* adultos foram alocados em seis grupos (n=10) por dez semanas de acordo com a dieta experimental: controle (C), controle deficiente em vitamina D (CDD), controle suplementado com vitamina D (CDS), frutose (F), frutose deficiente em vitamina D (FDD) e frutose suplementada com vitamina D (FS). As expressões gênicas do receptor de vitamina D (*Vdr*) e *Cyp27b1* e do nível plasmático de 25-hidroxivitamina D asseguraram que as dietas causaram deficiência de vitamina D ou suplementação. A massa corporal não mudou, mas a pressão arterial (PA) aumentou em CDD, F e FDD, enquanto a PA foi controlada em FS. Insulina, tolerância à glicose e resistência à insulina foram observadas tanto na deficiência de vitamina D como nos grupos frutose, mas melhoraram com a suplementação de vitamina D. Esteatose hepática e fibrose foram observadas nos grupos CDD, F e FDD. Além disso, F e FDD mostraram ativação de células estreladas hepáticas. As expressões gênicas de lipogênese e inflamação aumentaram nos grupos CDD, F e FDD, mas diminuíram com a suplementação de vitamina D. Em conclusão, demonstramos os efeitos adversos da deficiência de vitamina D no metabolismo, esteatose hepática e, combinado com ingestão de frutose, fibrose intersticial hepática com ativação das células estreladas hepáticas, e alteração da lipogênese, beta-oxidação e inflamação hepática. Todos esses dados melhoraram quando a vitamina D foi suplementada nos animais.

Palavras-chave: Vitamina D; Esteatose hepática; *Plin2*; Fibrose hepática; Células estreladas hepáticas; Resistência à insulina.

ABSTRACT

CECILIANO, Thais Christine Maia. **Metabolism and liver in chronically fructose fed mice: role of vitamin D, deficiency and supplementation.** 2019. 84 f. Tese. Doutorado (Biologia Humana e Experimental) - Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 2019.

Fructose added to soft drinks and processed foods, as well as the frequent detection of vitamin D deficiency in the body, are two insults increasingly considered to cause target organ damage. We studied the liver after a chronic high-fructose diet deficient and supplemented with vitamin D. Sixty adult *C57Bl/6* male mice were allocated into six groups (n=10) for ten weeks, according to the experimental diet: control (C), vitamin D deficient control (CDD), vitamin D supplemented control (CDS), fructose (F), vitamin D deficient fructose (FDD) and vitamin D supplemented fructose (FDS). Gene expressions of the vitamin D receptor (*Vdr*) and *Cyp27b1* and plasma level of 25-hydroxyvitamin D ensured that diets caused vitamin D deficiency or supplementation. Body mass did not change, but blood pressure (BP) increased in CDD, F and FDD, while BP was controlled in FDS. Insulin, glucose tolerance, and insulin resistance were observed in both vitamin D deficiency and fructose groups but improved with vitamin D supplementation. Liver steatosis and fibrosis were observed in CDD, F, and FDD groups. Furthermore, F and FDD showed activation of hepatic stellate cells. Gene expressions of lipogenesis and inflammation increased in the CDD, F and FDD groups, but decreased with vitamin D supplementation. In conclusion, we demonstrated the adverse effects of vitamin D deficiency on metabolism, hepatic steatosis and, combined with fructose intake, hepatic interstitial fibrosis with hepatic stellate cell activation, and alteration of lipogenesis, beta-oxidation and hepatic inflammation. All these data improved when vitamin D was supplemented in animals.

Keywords: Vitamin D. Liver steatosis. Plin2. Liver fibrosis. Hepatic stellate cells. Insulin resistance

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Modelo de absorção da frutose pelos receptores de glicose	20
Figura 2 –	Vias de metabolismo da frutose vs. glicose	21
Figura 3 –	Formas químicas da Vitamina D	23
Figura 4 –	Metabolismo da Vitamina D, desde a obtenção, a sua forma circulante e ativa até a ligação com o VDR	25
Figura 5 –	Recomendações para a interpretação dos níveis séricos de 25(OH)D	29
Figura 6 –	Metabolismo de acúmulo de gordura hepática	34
Figura 7 –	Progressão das doenças hepáticas	35
Figura 8 –	Linha do tempo do experimento, demonstrando o período de administração das dietas e seus experimentos	41
Figura 9 –	Análise esterológica de estatoze hepática pelo software STEPanizer	46
Figura 10 –	Ingestão de água	49
Figura 11 –	Massa corporal	50
Figura 12 –	Pressão arterial e área sob as curvas da pressão arterial	51
Figura 13 –	Teste oral de tolerância à glicose, teste de tolerância à insulina intraperitoneal e suas áreas sob as curvas	54
Figura 14 –	Análise plasmática de 25(OH)D	55
Figura 15 –	Análise plasmática de adiponectina e de leptina	56
Figura 16 –	Fibrose hepática	57
Figura 17 –	Células estreladas hepáticas ativadas	58
Figura 18 –	Esteatose hepática	59
Figura 19 –	Imunoflorescência de Perilipina 2 (Plin2)	60
Figura 20 –	Expressão gênica hepática de <i>Perilipina 2 (Plin2)</i>	61
Figura 21 –	Expressão gênica hepática: <i>Srebp1c</i> , <i>Chrebp</i> , <i>Fas</i> e <i>PPar gamma</i>	62
Figura 22 –	Expressão gênica hepática: <i>Ppar alfa</i> , <i>Il1</i> , <i>Il6</i> e <i>Tnf alfa</i>	63
Figura 23 –	Expressão gênica hepática: <i>Vdr</i> e <i>Cyp27b1</i>	64
Figura 24 –	Resumo gráfico do trabalho apresentado	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Composição das dietas experimentais	40
Tabela 2 –		48
Tabela 3 –	<i>Primers</i> para o qPCR	
	Ingestão alimentar, bioquímica, resistência a insulina e	53
Tabela 4 –	sensibilidade a insulina	
	Análise de variância (ANOVA) de dois fatores: frutose ingerida vs.	66
	concentração de vitamina D	
		

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1,25(OH) ₂ D ₃	1,25-di-hidroxivitamina D ₃ , calcitriol
25(OH)D	25-hidroxivitamina D
ADP	Adenosina difosfato
AGL	Ácidos graxos livre
ANOVA	Análise de variância
ALT	Alanina aminotransferase
AMP	Adenosina monofosfato
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
AIN93M	Dieta de manutenção segundo o Instituto Americano de Nutrição
ASC	Área Sob a Curva
cDNA	Ácido Desoxirribonucléico complementar
CEh	Célula estrelada hepática
CHREBP	Proteína de ligação a elementos responsivos a carboidratos
CoA	Coezima A
CT	Colesterol total
CYP27B1	Citocromo P450, família 27, subfamília B, polipeptídeo 1 mitocondrial, 1,25-hidroxilase
DBP	Proteína de ligação da vitamina D
DMT2	Diabetes Mellitus Tipo 2
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DP	Desvio padrão da média
DHGNA	Doença Hepática Gordurosa Não-alcoólica
EGNA	Esteatohepatite não alcoólica
FAS	Ácido graxo sintase
GGT	Glutamiltransferase
GLUT	Transportador de glicose
HE	Hematoxilina e eosina
HOMA-IR	Modelo de homeostase para a avaliação da resistência à insulina
IA	Ingestão Alimentar

IH	Ingestão Hídrica
IL	Interleucina
MC	Massa corporal
MP	Massa do pâncreas
miRNA	MicroRNA
PAS	Pressão arterial sistólica
Plin	Perilipina
P _p	Pontos parciais
PPAr	Receptores nucleares ativados por proliferadores de peroxissomos
P _T	Pontos totais
PTH	Paratormônio
QUICKi	Quantitativo de verificação de sensibilidade à insulina
SBEM	Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia
SM	Síndrome metabólica
SREBP	Fator de transcrição de ligação ao elemento regulador de esterol
TAG	Triacilglicerol
TITI	Teste intraperitoneal de tolerância à insulina
TNF	Fator de necrose tumoral
TOTG	Teste oral de tolerância à glicose
UVb	Radiação Ultravioleta do tipo B
VDR	Receptor de vitamina D
VDR-RXR	Complexo receptor da vitamina D
VDRE	Elemento responsivo a vitamina D
Vitamina D ₂	Ergocalciferol
Vitamina D ₃	Colecalciferol
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa
V _{v[esteatose]}	Densidade de volume da esteatose

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
μg	Micrograma
μm	Micrometro
cm	Centímetro
dL	Decilitro
g	Grama
kg	Kilograma
L	Litro
M	Molar
mL	Mililitro
nm	Nanometro
nmol	Nanomol
UI	Unidades internacionais
XX	Vinte

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	16
1	OBJETIVOS	18
1.1	Objetivo geral	18
1.2	Objetivos específicos	18
2	REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1	Frutose	19
2.2	Vitamina D	22
2.2.1	<u>Receptor de vitamina D (VDR) e a 1α-hidroxilase (CYP27B1)</u>	26
2.2.2	<u>Deficiência de Vitamina D</u>	27
2.2.3	<u>Suplementação de Vitamina D</u>	30
2.3	Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica (DHGNA)	31
2.3.1	<u>Esteatose Hepática</u>	32
2.3.2	<u>Beta oxidação e lipogênese hepática</u>	35
2.3.3	<u>Esteato Hepatite Não-Alcoólica (EHNA) e Inflamação hepática</u>	37
2.3.4	<u>Células Estreladas Hepáticas</u>	37
2.3.5	<u>DHGNA e a Vitamina D</u>	38
3	MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1	Animais e Dieta	39
3.2	Ingestão de comida e água, massa corporal e pressão arterial	41
	Tolerância à glicose e tolerância à insulina, resistência e	
3.3	sensibilidade	42
3.4	Morte e extração de tecidos	43
3.5	Bioquímica: Fígado e Plasma	43
3.6	Estrutura Hepática	44
	<u>Esteatose Hepática e Fibras de Colágeno</u>	44
	<u>Imunoflorescência do fígado</u>	45
	Expressão gênica (reação em cadeia da polimerase em tempo real,	
	qPCR	46
	Análise Estatística dos Dados	48
	RESULTADOS	49

Ingestão de comida e água, massa corporal e pressão arterial	
sistólica	49
Glicemia em jejum, tolerância à glicose e tolerância à insulina,	
resistência e sensibilidade e níveis plasmáticos de 25(OH)D e	
insulina	52
Outras análises bioquímicas	55
Estrutura hepática	55
Expressão gênica (qPCR)	61
<u>Lipogênese e beta oxidação</u>	<u>61</u>
<u>Inflamação</u>	<u>63</u>
<u>Vitamina D</u>	<u>64</u>
Contribuição e interação da ingestão de frutose e vitamina D:	
ANOVA de dois fatores	65
DISCUSSÃO	67
CONCLUSÃO	71
REFERÊNCIAS	72
ANEXO A – Comitê de Ética	85
ANEXO B – Artigo final publicado	86

INTRODUÇÃO

A síndrome metabólica é um problema de saúde no cenário mundial e aumenta o risco de doenças humanas, como obesidade, dislipidemia, pressão arterial elevada e diabetes (Eckel *et al.*, 2005; Mendrick *et al.*, 2018)

A frutose, um monossacarídeo comum em frutas e vegetais, é adicionada para adoçar alimentos e bebidas. É a ingestão industrial, e não de frutose de frutas, que induz distúrbios metabólicos e aumenta o risco de resistência à insulina/diabetes (Macdonald, 2016). A frutose tem um alto poder lipogênico (Teff *et al.*, 2009) sem afetar significativamente a massa do tecido adiposo (Schultz *et al.*, 2013), mas aumenta o início e a progressão da doença hepática gordurosa não alcoólica (DGHNA) (Alwahsh e Gebhardt, 2017) e alterações cardiometabólicas (Taskinen *et al.*, 2017). A frutose tornou-se onipresente em nossa oferta de alimentos, com os maiores consumidores sendo adolescentes e jovens adultos (Port *et al.*, 2012).

A vitamina D foi descoberta no início do século XX e na época tinha como função curar e prevenir o raquitismo (Bouillon *et al.*, 2008). Ela regula principalmente a homeostase de cálcio e fósforo e é adquirida pela ingestão de alimentos como peixes gordurosos e ovos, e principalmente pela síntese cutânea através da exposição aos raios ultravioleta tipo B. O metabolismo da vitamina D é iniciado com a foto conversão do 7-deidrocolesterol (7-DHC) pelo UVB na pele, formando a vitamina D₃ ou absorvida pela dieta na forma de D₂. Em seguida, o CYP27B1, a principal 1 α -hidroxilase que converte a 25-hidroxivitamina D (25(OH)D) na forma hormonal 1,25-di-hidroxivitamina D (1,25(OH)₂D), e esta última é o ligante para o receptor da vitamina D (VDR) (Bikle, 2014). Já foi descrito que esse receptor está presente em vários órgãos, demonstrando uma função sistêmica dessa vitamina que agora é considerada um hormônio. Os genes alvo regulados pela vitamina D podem controlar diversas atividades biológicas, como o sistema imunológico, a função da pele e dos músculos, o crescimento celular e outros processos biológicos (Pike e Christakos, 2017). As concentrações circulantes de 25(OH)D são consideradas um indicador de *status* da vitamina D (Heaney, 2004).

Embora a associação entre a deficiência de vitamina D e o acúmulo de massa corporal ainda seja motivo de debate (Plesner *et al.*, 2018), relatos recentes reforçam a noção de um vínculo definitivo de deficiência de vitamina D com a

obesidade geral e abdominal (Ong *et al.*, 2018; Mansouri *et al.*, 2019). Além disso, estudos sobre o efeito da deficiência de vitamina D sobre os fatores de risco cardiovascular e hipertensão são conflitantes com resultados inconsistentes (Kheiri *et al.*, 2018), mas há relatos recentes de que a deficiência de vitamina D aumenta o risco de desenvolver disfunção metabólica e aumento do risco cardiovascular (Faridi *et al.*, 2017; Skaaby *et al.*, 2017; Censani *et al.*, 2018). E a suplementação de vitamina D tem sido considerada benéfica em indivíduos com doenças hepáticas crônica (Bjelakovic *et al.*, 2017), com diabetes (Bjelakovic *et al.*, 2017), hipertensão (Bjelakovic *et al.*, 2017) e alterações na função renal (Rosina *et al.*, 2017).

É digno de nota dizer que a frutose combinada com a deficiência de vitamina D, pode agravar os efeitos nocivos que cada insulto já causa (Douard *et al.*, 2010). Assim, o presente estudo foi planejado para examinar o impacto, principalmente no fígado, da deficiência e suplementação de vitamina D e o consumo simultâneo de uma dieta rica em frutose.

1. OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos, principalmente hepáticos, da deficiência e suplementação de vitamina D, com um consumo simultâneo de uma dieta com frutose em camundongos *C57Bl/6* machos adultos.

1.2 Objetivos específicos

- a) Estabelecer modelos experimentais de deficiência e suplementação crônica de vit D acrescidos a uma dieta controle ou com frutose em camundongos *C57Bl/6* machos.
- b) Avaliar os efeitos da deficiência e da suplementação de vit D sob modelo de administração de dieta rica em frutose sobre o metabolismo glicídico
- c) Avaliar e comparar os efeitos da deficiência e da suplementação de vit D concomitantes com a dieta com frutose como potencializadores e atenuantes da hipertensão arterial sistólica e a resistência à insulina.
- d) Quantificar a expressão gênica hepática das vias de:
 - Lipogênese: *Srebp1c*, *Fas* e *Ppar gama* e *Chrebp*
 - Beta Oxidação: *Ppar alfa*
 - Inflamação: *Il1* e *Il6*
 - Vitamina D: - Receptor de vitamina D (*Vdr*) e enzima ativadora da vit D (*Cyp27b1*)

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Frutose

Os açúcares incluem os monossacarídeos e dissacarídeos e dentro dos monossacarídeos mais comuns na dieta temos a frutose, a glicose e a galactose. A frutose é o açúcar que está naturalmente presente na fruta, mas também em sumos naturais ou néctares, e que é por vezes usado como adoçante, ou que pode estar adicionado a outros produtos alimentares, como refrigerantes e bolachas. O açúcar adicionado mais comum é o xarope de milho com alto conteúdo em frutose e a forma mais consumida desses açúcares são os sucos em lata e refrigerantes (Marques, 2017).

A frutose é uma ceto-hexose isômero de glicose, com um grupo cetona no carbono (Qi e Tester, 2019). Tanto a sacarose (dissacarídeo de glicose-frutose) quanto o xarope de milho com alto teor de frutose (frutose e glicose em diferentes concentrações) são fontes primárias de frutose na dieta (Chung *et al.*, 2014).

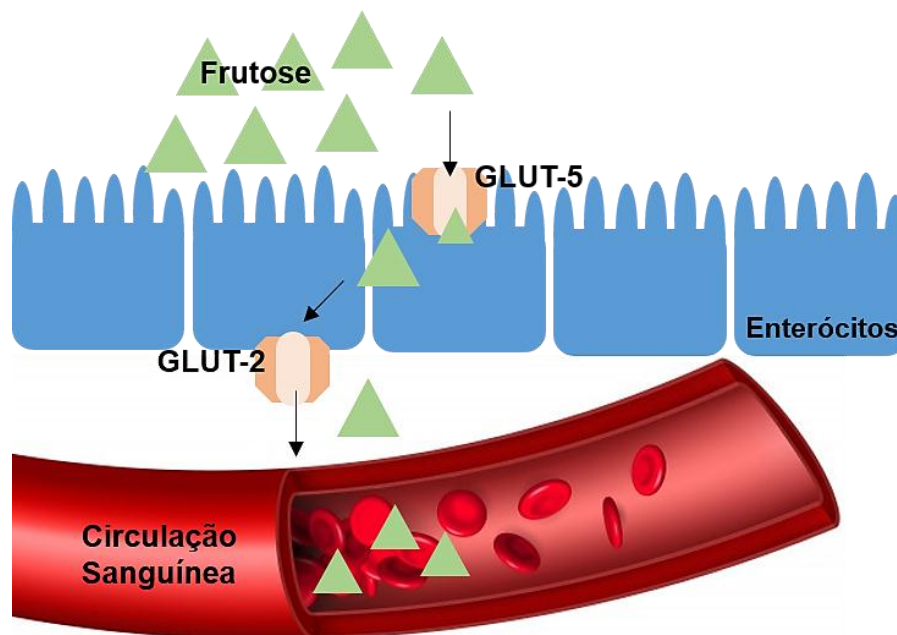
O consumo de frutose, o mais doce de todos os hidratos de carbono que ocorrem naturalmente, aumentou dramaticamente nos últimos 40 anos e hoje é comumente usado comercialmente em refrigerantes, sucos e produtos de panificação (Johnson *et al.*, 2017). Na dieta, sacarose e xarope de milho com alto teor de frutose são as principais fontes de frutose e podem ser metabolizados no intestino e transportados para a circulação sistêmica (Malik *et al.*, 2013).

Os seres humanos, assim como outras espécies, podem metabolizar e absorver diretamente a frutose de diferentes fontes. A sacarose e outros açúcares são metabolizados a glicose e frutose no intestino (Gericke *et al.*, 2017).

Em camundongos, com baixa ingestão de concentração de frutose, ela pode ser metabolizada no fígado. No entanto, a sobrecarga de frutose aumenta suas concentrações circulatórias (Jang *et al.*, 2018). Em humanos, o consumo acentuado de frutose foi demonstrado que quase 70% da frutose é diretamente metabolizado pelo fígado (Francey *et al.*, 2019), embora outros tecidos como o tecido adiposo branco possam metabolizar a quantidade restante.

Além disso, a ingestão crônica de frutose pode aumentar sua absorção, promovendo a super expressão do gene *Glut5* no intestino. Assim, após alta exposição, mais frutose entra em circulação portal e pode escapar do fígado e entrar na circulação sistêmica (Ferraris *et al.*, 2018) (Figura 1).

Figura 1. Modelo de absorção da frutose pelos receptores de glicose.



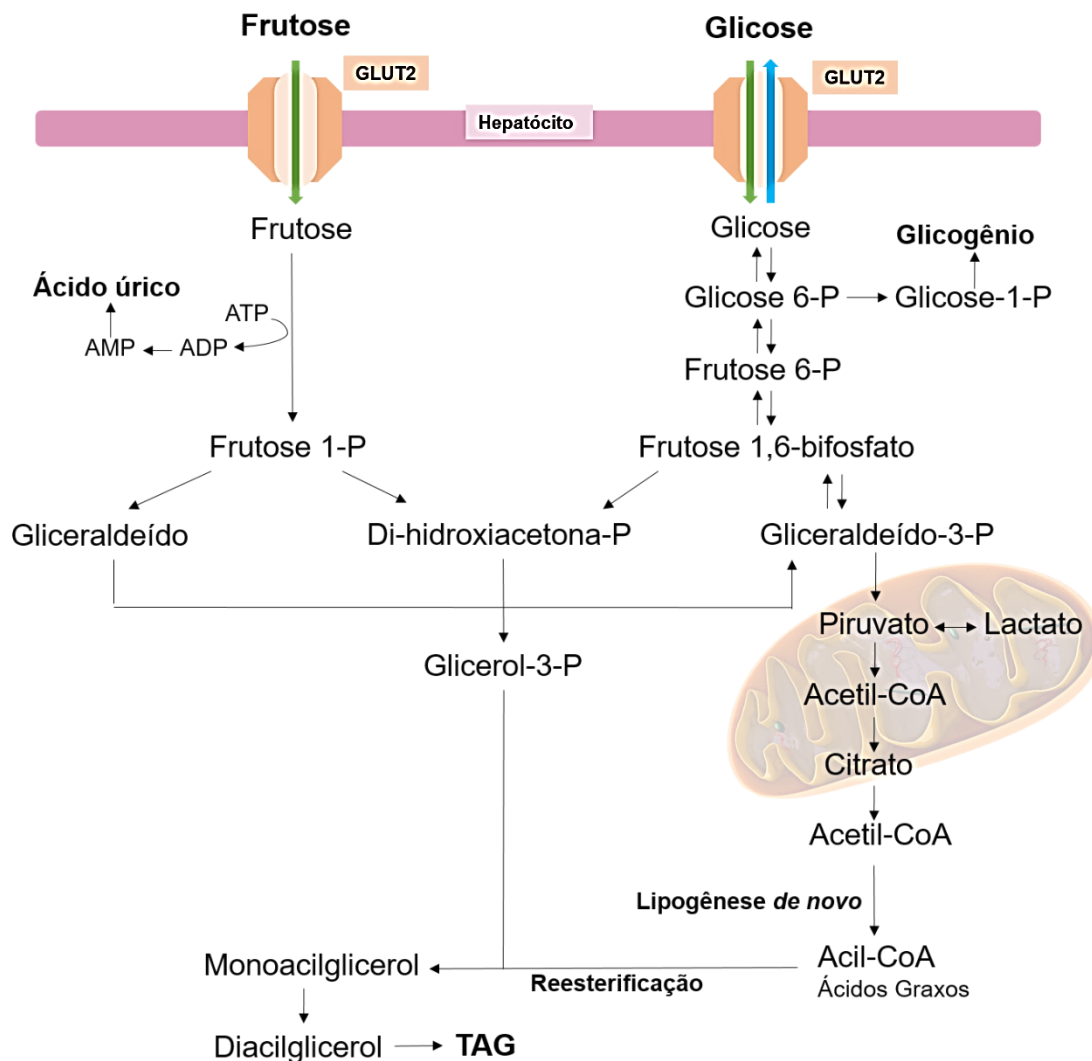
Legenda: GLUT, transportador de glicose.
Fonte: A Autora, 2019.

A frutose é um açúcar lipogênico pois aumenta a lipogênese hepática *de novo* no fígado através de várias vias metabólicas resultantes (Taskinen *et al.*, 2019). Embora frutose e glicose sejam monossacarídeos isômeros, as vias do metabolismo são divergentes nos enterócitos e nos hepatócitos (Hannou *et al.*, 2018) (Figura 2). O metabolismo hepático da frutose e glicose ocorre por vias divergentes, com consequências no metabolismo de lipídios hepáticos e na sensibilidade à insulina refletidas em doenças metabólicas (Mortera *et al.*, 2019).

A frutose é absorvida através de dois mecanismos distintos, sendo o primeiro um transporte facilitado, independente da glicose, com baixa capacidade, e, o segundo, um co-transporte, dependente da glicose e com alta capacidade (Perman, 1996). A difusão facilitada é mediada pela proteína transportador de glicose (GLUT), que no caso da frutose é a GLUT5 (também chamado SLC2A5). Esse transportador

tem alta afinidade com a frutose e pouca afinidade com a glicose. Seu papel primário é o de atuar no transporte da frutose da dieta e sua ação não depende da estimulação pela insulina (Buchs *et al.*, 1998).

Figura 2. Vias de degradação da frutose vs. glicose.



Legenda: ADP, adenosina difosfato; AMP, adenosina monofosfato; ATP, adenosina trifosfato; CoA, coenzima A; GLUT, transportador de glicose; P, fosfato, TAG, triacilglicerol.

Fonte: A Autora, 2019

A captação de frutose da circulação portal no fígado é mediada por GLUT2 via metabolismo de primeira passagem pela fosforilação de frutose em frutose-1-fosfato, que é metabolizada posteriormente em fosfato de dihidroxiacetona e gliceraldeído 3-fosfato (Softic *et al.*, 2016). Notavelmente apenas uma pequena parte

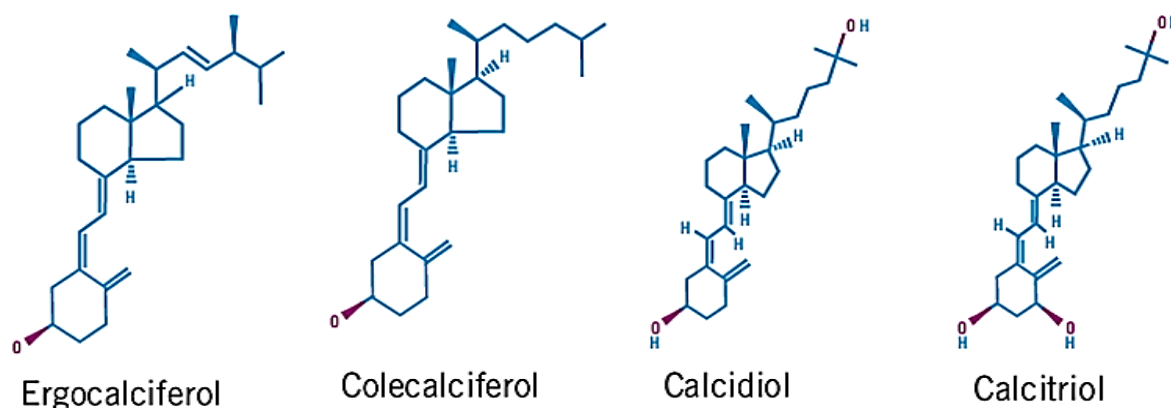
da frutose ingerida acaba na circulação em contraste com a glicose. Esses passos iniciais no metabolismo da frutose parecem não ser regulados e ignoram o controle hormonal, em contraste com a captação estritamente regulada de glicose e glicólise no fígado, onde a insulina desempenha um papel central. O gliceraldeído-3-fosfato e outros compostos de fosfato triose derivados da frutólise são direcionados à formação de piruvato e acetil-CoA e à lipogênese (Herman e Samuel, 2016). Consequentemente, a frutose tem efeitos tanto na homeostase da glicose quanto na lipogênese, a partição depende das necessidades de energia celular (Tappy, 2018).

A obesidade, a síndrome metabólica (SM), a DHGNA e o Diabetes Mellitus Tipo 2 (DMT2) são consequências dos padrões alimentares aliada a uma falta de atividade física nas últimas décadas em países industrializados e em desenvolvimento. Um grande conjunto de evidências associa o consumo de frutose e outras bebidas adoçadas com açúcar à resistência à insulina, acúmulo de lipídios intra-hepáticos e hipertrigliceridemia (Stanhope *et al.*, 2009). A longo prazo, esses fatores de risco podem contribuir para o DMT2 e doenças cardiovasculares. Frutose é absorvida no intestino delgado e metabolizada no fígado, onde estimula a produção de glicose, frutólise, glicólise e lipogênese. Isso pode resultar em hipertrigliceridemia e fígado gorduroso (Taskinen *et al.*, 2019).

2.2 Vitamina D

A vitamina D é um hormônio esteroide essencial que participa de variadas reações fisiológicas, classicamente conhecida como o regulador do metabolismo ósseo (Christakos *et al.*, 2014; Szabo *et al.*, 2015), porém atualmente lhe foi atribuída diversas outras funções nos mais variados órgãos e tecidos (Marino e Misra, 2019). Suas fontes, funções e metabolismo encontram-se extensivamente listados na literatura (Sinha *et al.*, 2013; Wacker e Holick, 2013; Halfon *et al.*, 2015). O termo vitamina D engloba um grupo de moléculas derivadas do 7-deidrocolesterol (7-DHC), dentre elas seus precursores, o pré-hormônio e forma ativa (Figura 3). Existem duas principais formas de vitamina D, os precursores, que se diferem apenas na cadeia lateral: a vitamina D₂ (ergocalciferol) e a D₃ (colecalciferol).

Figura 3. Formas químicas da Vitamina D.



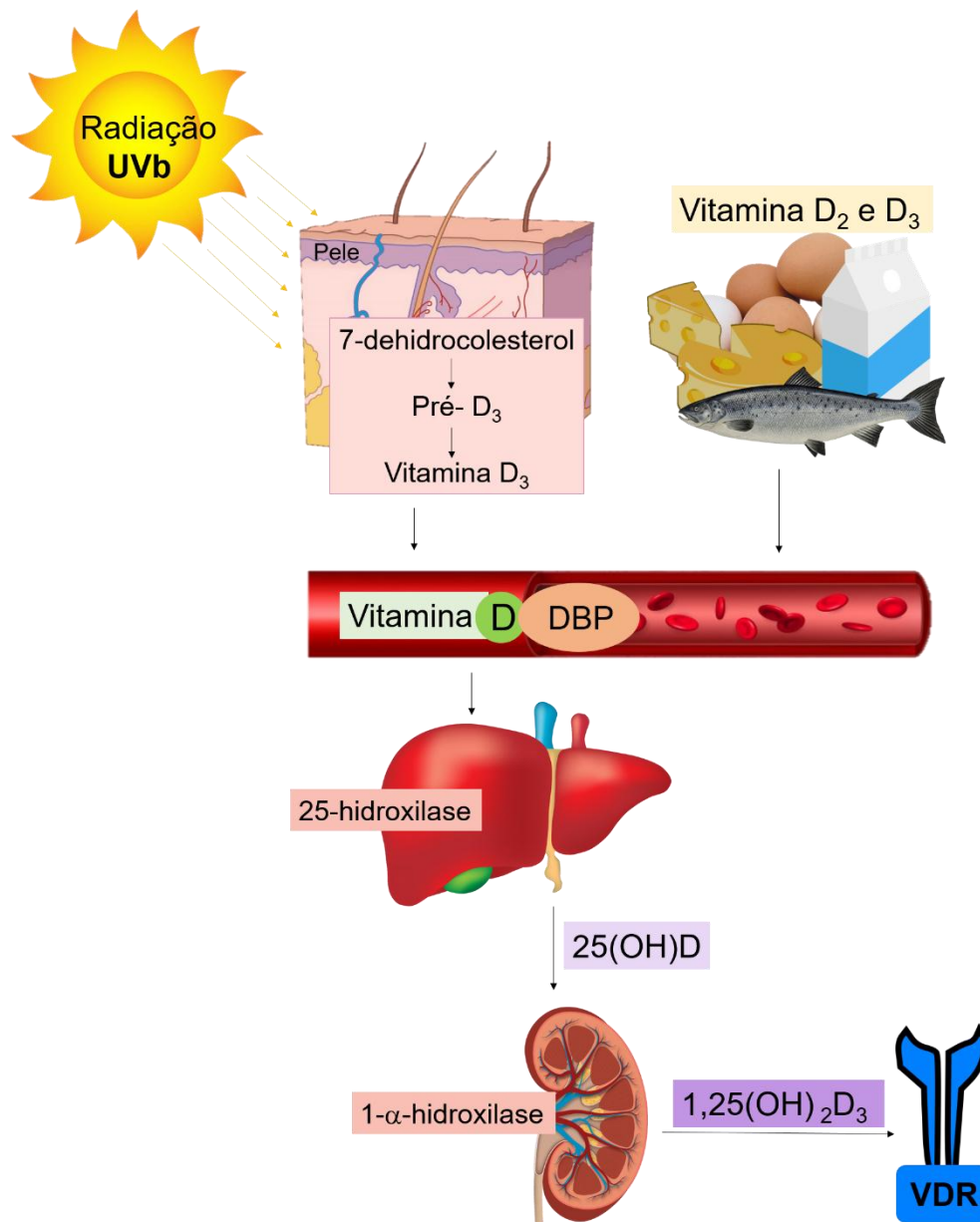
Legenda: Os diferentes compostos classificados como vitamina D: Ergocalciferol (ou ergosterol ou Vitamina D₂); Colecalciferol (ou Vitamina D₃); Calcidiol (ou 25(OH)D) e Calcitriol (1,25(OH)₂).

Fonte: Adaptado de (Uriol, 2019).

A vitamina D₂ provém de fontes vegetais, levedura e centeio, e também é disponibilizada comercialmente sob a forma de suplemento vitamínico; já a vitamina D₃ provém de fontes animais presentes na dieta, principalmente na gema de ovo, óleo de fígado de bacalhau e peixes como o salmão, atum e sardinha; mas sua maior fonte de produção é a pele (Navarro-Trivino *et al.*, 2019). As glândulas sebáceas presentes na derme atuam na conversão da pró-vitamina, a 7-deidrocolesterol em vitamina D₃ quando exposta à radiação ultravioleta b (UVb), com comprimento de onda entre 290 e 315 nm, e ao calor. Uma vez que, absorvida no intestino ou formada principalmente na pele (D₃), a vitamina D é transportada para o fígado, através da circulação sanguínea, conjugada à proteína de ligação da vitamina D (DBP), onde sofre sua primeira hidroxilação pela 25-hidroxilase, tornando-se 25(OH)D, também conhecida calcidiol, que pode se acumular nos tecidos adiposos ou permanecer circulante no sangue quando associada a DBP. No entanto, para a vitamina D exercer as funções fisiológicas nas células-alvo, a 25(OH)D precisa ser convertida em sua forma ativa, também chamada de calcitriol (1,25-dihidroxivitamina D (1,25(OH)₂D₃)), pela 1-hidroxilase, também conhecida como CYP27B1, localizada na membrana mitocondrial interna nas células do túbulo proximal dos rins, através da segunda hidroxilação ocorrida no rim sendo capaz de ativar efetivamente o VDR e regular diretamente a expressão gênica (Hamilton, 2010) (Figura 4).

A vitamina D exerce suas funções de duas maneiras: pela via de sinalização genômica e por vias não-genômicas. A primeira é ativada pela ligação hormônio/VDR em que estes receptores intracelulares específicos se ligam a sequencias regulatórias dos genes alvo, modulando a atividade transcricional da região promotora. Enquanto as vias não-genômicas são ativadas pela ligação da vitamina D a um receptor de membrana não clássico (mVDR), causando uma série de alterações intracelulares transitória e rápida (de segundos a minutos) não dependentes da síntese proteica. Esses efeitos envolvem alterações transitórias no transporte transmembranar de íons como o cálcio (Walters, 1992).

Figura 4. Metabolismo da Vitamina D, desde a obtenção, a sua forma circulante e ativa até a ligação com o VDR



Legenda: Uvb, radiação ultravioleta do tipo B; DBP, proteína de ligação da vitamina D; 25(OH)D, caldiol; 1,25(OH)₂D₃, calcitriol; VDR, receptor de vitamina D.

Fonte: A Autora, 2019.

2.2.1 Receptor de vitamina D (VDR) e a 1 α -hidroxilase (CYP27B1)

O receptor da vitamina D pertence à superfamília dos receptores nucleares dos fatores reguladores da transcrição dos hormônios esteroides, ácido retinoico, hormônio tireoideano e vitamina D. Após a ligação da vitamina D ativa, a 1,25(OH)₂D com o VDR, este interage com o receptor do ácido retinoico (RXR), formando um complexo heterodimérico (RXR-VDR) que, por sua vez, se liga a sequências específicas do DNA, conhecidas como elemento responsivo à vitamina D (VDRE) (Walters, 1992).

O VDR é um receptor nuclear ligante dependente que regula a expressão de mais de 900 genes ao longo do genoma (Kongsbak *et al.*, 2013). Já é conhecido a presença do VDR em vários sistemas biológicos e sua sensibilidade à vitamina D. Uma das principais funções biológicas desta vitamina é o de manter a homeostase do cálcio, através da reabsorção de cálcio e fosfato nos rins e intestinos. A vitamina D também é responsável pela supressão da síntese de paratormônio (PTH) devido a ligação do calcitriol ao VDR nas glândulas paratireoides (Khundmiri *et al.*, 2016). Atualmente, é crescente o número de estudos relacionando a função extra-esquelética da vitamina D devido à presença de VDR em diferentes tecidos humanos (Marino e Misra, 2019), tornando assim a maioria dos tecidos humanos e tipos de células responsivos a 1,25(OH)₂D₃ (Carlberg, 2014). A ligação da vitamina D ao seu receptor pode influenciar na pressão sanguínea, assim como genes que promovem a secreção de insulina e a proliferação e diferenciação celular (Pramono *et al.*, 2019).

A ampla distribuição de VDR em seres humanos, a influência da vitamina D em mais do que 3% do humano do genoma, e a presença extra renal de 1 α -hidroxilase são frequentemente apresentados como fatores que a vitamina D influencia na saúde e na doença (Bendik *et al.*, 2014).

A síntese de 1,25(OH)₂D₂, a partir do principal metabolito circulante, 25(OH)D, é catalisada pela enzima 1 α -hidroxilase, também conhecida CYP27B1. Embora a 1 α -hidroxilase seja expressa predominantemente no rim, a produção extra renal de 1,25(OH)₂D₃ também já foi demonstrado a em tecidos tais como linfonodos e pele. A firme regulação de 1 α -hidroxilase que ocorre em ambos os tecidos renal e periféricos torna estudos sobre a expressão e regulação desta enzima notavelmente

difícil. No entanto, a clonagem em camundongos, em ratos e em cDNAs humanos para 1 α -hidroxilase permitiu uma caracterização mais completa desta enzima. Em particular, a análise do gene da CYP1 α identificou mutações que causam o raquitismo de tipo 1 dependente de vitamina D também conhecido como raquitismo de pseudo-deficiência da vitamina D. Diversos estudos tem surgidos sobre a distribuição nos tecidos renais e extra renais, indicando que a enzima é expressa em todo o néfron, sugerindo funções endócrinas discreta e autócrinas (Hewison *et al.*, 2000).

2.2.2 Deficiência de Vitamina D

A 25(OH)D é a principal forma circulante da vitamina D, tendo meia vida circulante de 2 a 3 semanas, e representa o melhor indicador da deficiência, insuficiência e toxicidade da vitamina D, enquanto a 1,25(OH)₂D₃ tem uma meia vida circulante aproximadamente de 4 horas e circula em concentrações 1000 vezes menor que a 25(OH)D (Institute of Medicine (U.S.). Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes., 1997).

Internacionalmente, não há um consenso entre as agências pelo mundo sobre as concentrações de 25(OH)D que define deficiência, insuficiência e suficiência (Figura 5) (Bouillon, 2017). Em 2018, a Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia com a Sociedade Brasileira de Patologia Clínica atualizaram os valores de referência da vitamina D (25(OH)D) para humanos em que (Ferreira *et al.*, 2017):

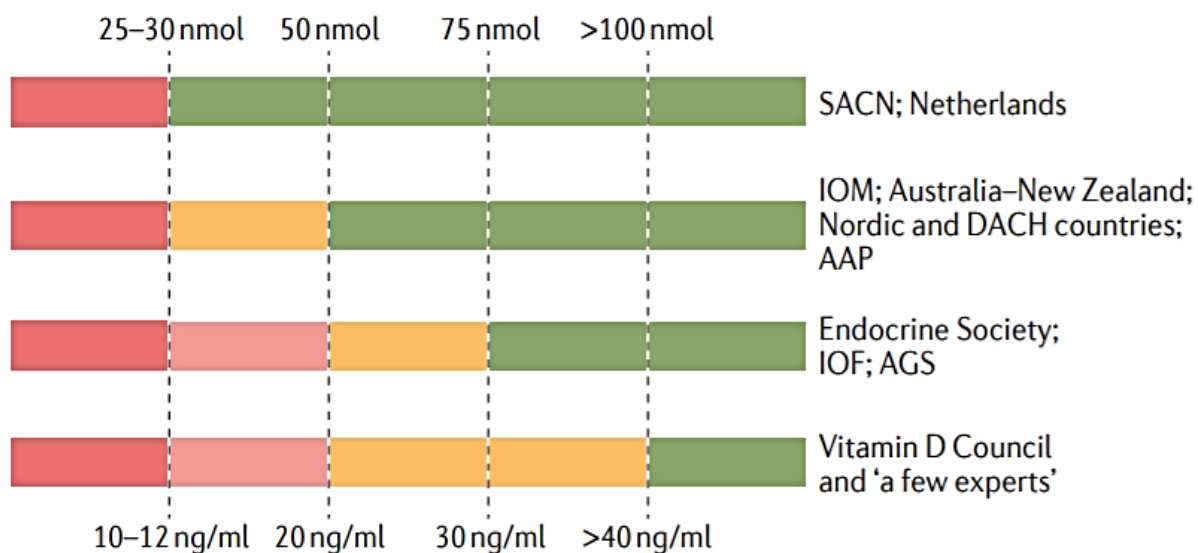
- a. Acima de 20 ng/mL (ou 50 nmol/L) é o valor desejável para a população saudável (até 60 anos);
- b. Entre 30 e 60 ng/mL (ou 75-150 nmol/L) é o valor recomendado para grupos de risco como: idosos (acima de 60 anos), indivíduos com fraturas ou quedas recorrentes, gestantes e lactantes, osteoporeose (primária e secundária), doenças osteometabólicas, tais como raquitismo, osteomalácia, hiperparatireodismo, doença renal crônica, síndromes de má-absorção, como após cirurgia bariátrica e doença inflamatória intestinal, medicações que possam interferir com a formação e degradação da vitamina D, tais como: terapia

antirretroviral, glicocorticoides e anticonvulsivantes, neoplasias malignas, sarcopenia, diabetes e obesidade;

c. Acima de 100 ng/mL (ou 250 nmol/L) é risco de toxicidade e hipercalcemia.

A deficiência severa de vitamina D, geralmente associada à concentração sorológica de 25(OH)D abaixo de 10 ng/mL (ou 25 nmol/L) em humanos e 20 ng/mL (ou 50 nmol/L) em roedores (Fleet *et al.*, 2008), pode levar a doenças metabólicas como hipertensão (Weng *et al.*, 2013) e resistência à insulina (Sung *et al.*, 2012; Prasad e Kochhar, 2015), devido a redução de 25(OH)D causado por diversos fatores, como fatores sendo o mais relevante a baixa exposição solar, ao uso excessivo de barreiras químicas, como protetores solar, pele morena, mulata ou negra, baixa ingestão de alimentos fontes de vitamina D e outras situações como insuficiência renal crônica, lúpus, doença celíaca, doença de Crohn, pedra na vesícula, insuficiência cardíaca, entre outros. Embora não exista um consenso definitivo sobre a concentração sorológica de 25(OH)D que represente a condição de insuficiência, os baixos níveis de vitamina D constituem um problema atual da população mundial (Holick, 2008; Hosseini-nezhad e Holick, 2013).

Figura 5. Recomendações para a interpretação dos níveis séricos de 25(OH)D. É mostrada uma representação esquemática de como diferentes agências e países interpretam os níveis séricos de 25-hidroxivitamina D.



Legenda: Código de cores: vermelho indica um estado de grave deficiência (perigo) que deve ser corrigido sem exceção; laranja denota um estado de deficiência leve (preocupação modesta), em que a intervenção é desejável; verde indica um estado de suprimento suficiente que não se beneficia da suplementação adicional. AAP, American Academy of Pediatrics (Academia Americana de Pediatria); AGS, American Geriatrics Society (Sociedade Americana de Geriatria); DACH, Deutschland (Alemanha), Áustria e Confoederatio Helvetica (Suíça); IOF, International Osteoporosis Foundation (Fundação Internacional de Osteoporose); IOM, Institute of Medicine (Instituto de Medicina); SACN, Scientific Advisory Committee on Nutrition (Comitê Científico Consultivo em Nutrição).

Fonte: (Bouillon, 2017)

O Departamento de Metabolismo Ósseo e Mineral da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM) está de acordo com as diretrizes publicadas pela *Endocrine Society*, que não recomenda a avaliação da 25(OH)D para a população geral considerando-se o custo dessa mensuração. Recomenda-se a avaliação laboratorial em indivíduos nos grupos de risco para a hipovitaminose D ou naqueles para cuja situação clínica seja relevante já citados acima. (Maeda *et al.*, 2014)

Diversas causas estão relacionadas a baixos níveis de 25(OH)D (Premaor e Furlanetto, 2006; Holick, 2007):

- a. Síntese cutânea reduzida de vitamina D₃ (Uso de protetor solar, uso excessivo de roupas, confinamento em locais fechados, elevada concentração de melanina, envelhecimento, elevada latitude, inverno, hora do dia, doença renal crônica)
- b. Disponibilidade reduzida de vitamina D (Má-absorção intestinal e obesidade)
- c. Catabolismo elevado de 25(OH)D (Medicamentos como anticonvulsivante e glicocorticoides e doença renal crônica)
- d. Síntese reduzida de 25(OH)D (Doença hepática grave)
- e. Perdas urinárias elevadas de 25(OH)D (Síndrome nefrótica e doença renal crônica)
- f. Doenças que reduzem a absorção intestinal da vitamina D (Doença de Crohn, fibrose cística e doença celíaca)

Considerando o importante papel da vitamina D em vários órgãos e sistemas, estudos têm demonstrado uma associação entre a hipovitaminose D e o risco de desenvolver várias enfermidades, como acidentes cardiovasculares (Afzal e Nordestgaard, 2017; Nakhil *et al.*, 2019), diabetes mellitus (Alloubani *et al.*, 2019), doenças autoimunes como artrite reumatoide (Cecchetti *et al.*, 2016), doença de Alzheimer (Keeney e Butterfield, 2015), lúpus eritematoso sistêmico e tireoidite autoimune (Abaza *et al.*, 2016), doenças inflamatórias (Liu e Li, 2019), como infecções agudas, tuberculose (Nouri-Vaskeh *et al.*, 2019), doença inflamatória intestinal (Karaahmet *et al.*, 2014), hepática gordurosa não alcoólica (Yodoshi *et al.*, 2019) e asma (Salas *et al.*, 2014), bem como o aumento do risco de mortalidade na população geral.

2.2.3 Suplementação de Vitamina D

Para a resolução do estado da vitamina D da população mundial, uma maior exposição à luz solar ou UVb não é uma opção viável para a maioria dos indivíduos, devido à fototoxicidade da UVb (Taylor *et al.*, 2008; Norman e Bouillon, 2010). Atualmente, a irradiação UV é a principal causa para o incremento da incidência do cancro de pele melanocítico e não-melanocítico, em muitos países (Taylor *et al.*, 2008). Além disso, não existem alimentos naturalmente ricos em vitamina D suficientes para corrigir esta insuficiência mundial. Deste modo, as opções passam pela suplementação direta ou indireta (enriquecimento de alimentos) de vitamina D₃ (Norman e Bouillon, 2010).

A suplementação de vitamina D, sob a forma de ergocalciferol ou colecalciferol é segura e barata. Estudos sugerem que as duas formas são equivalentes, aumentando os níveis séricos de 25(OH)D de forma semelhante (Kennel *et al.*, 2010). A União Europeia definiu o nível sanguíneo de 200nmol/L (80 ng/mL), correspondendo a uma dose diária de 100µg (4000 UI) de vitamina D, como o limite superior da gama de concentrações em que não se observam efeitos deletérios (Zeeb e Greinert, 2010).

Bjelakovic e colaboradores demonstraram evidências de que a suplementação de vitamina D pode ter um efeito benéfico nos distúrbios ósseos em pessoas com doenças hepáticas crônicas (Bjelakovic *et al.*, 2017). No entanto, recentemente, a deficiência de vitamina D tem sido citada como uma das causas da infecção crônica pela hepatite B (Parfieniuk-Kowerda *et al.*, 2019) e em contrapartida a suplementação de vitamina D tem sido sugerida como um potencial medicamento terapêutico (Hoan *et al.*, 2018)

2.3 Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica (DHGNA)

O fígado desempenha papel central no controle da homeostase da glicemia e está sujeito a uma regulação complexa por substratos, insulina e outros hormônios. Em roedores, é fundamental para a sensibilidade a insulina, pois desde que a ação

hepática da insulina seja preservada, a espécie fica protegida contra o DM2. Ademais, roedores estocam quantidades proporcionalmente superior de glicogênio quando comparados a humanos e observa-se forte relação entre a hiperglicemia de jejum e a resistência hepática a insulina, corroborando assim com a importância do fígado na progressão do DM2 nesses animais (NANDI 2004). O fígado também é fundamental no metabolismo lipídico, na importação e fabricação de ácidos graxos livre (AGL), armazenamento e exportação de lipídios, sendo considerado um órgão central do metabolismo e o desequilíbrio em qualquer um destes processos pode levar ao desenvolvimento de doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) (Berlanga *et al.*, 2014).

2.3.1 Esteatose Hepática

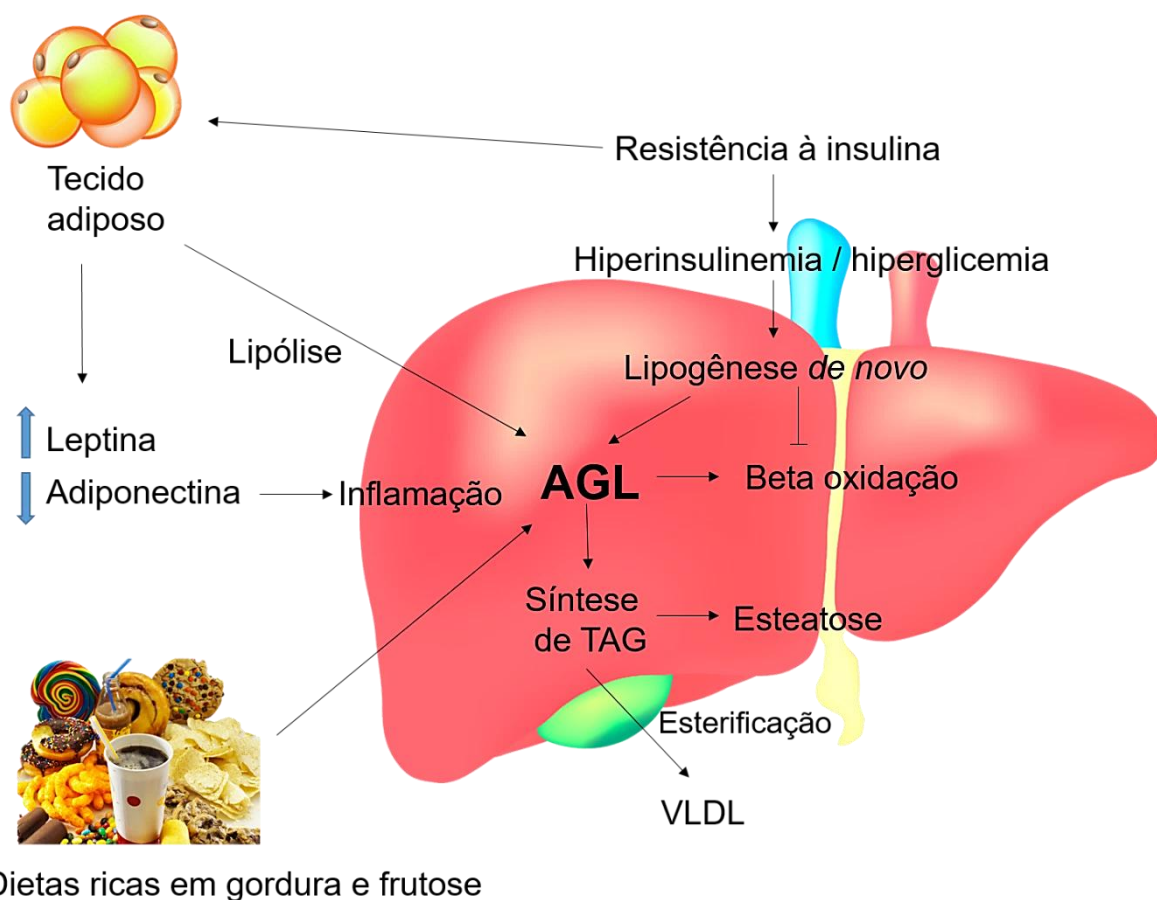
Dieta hiperlipídica aumenta a deposição de gordura no organismo. O excesso de tecido adiposo branco aumenta as taxas de lipólise e ocorre uma maior captação de ácidos graxos livres por órgão como fígado, pâncreas e músculo. O caminho comum do excesso desses ácidos graxos livres é a beta-oxidação na mitocôndria gerando Acetil-CoA. Porém, com o quadro de resistência à insulina instalado, a carga excessiva de AGL é direcionada a lipogênese, causando um maior acúmulo de triacilglicerol (TAG) no interior desses órgãos, configurando uma condição patológica conhecida como esteatose (Figura 6).

A esteatose hepática ou DHGNA é uma alteração clínica patológica caracterizada pelo acúmulo da deposição ectópica de TAG nos hepatócitos (Adams *et al.*, 2005). Essa está ligada à resistência periférica a insulina e aumento da lipólise no tecido adiposo branco abdominal. Esses processos desencadeiam uma maior lipogênese hepática e prejudicam a beta oxidação hepática (Angulo, 2005). A DHGNA é caracterizada pelo acúmulo de triacilglicerol, os quais são formados a partir da esterificação de AGL e glicerol no hepatócito. Os AGL surgem de três fontes: lipólise do tecido adiposo branco (hidrólise de TAG em glicerol e AGL), fontes alimentares e lipogênese *de novo* (Gambino *et al.*, 2016). A diminuição da beta oxidação também é um fator importante na progressão desta patologia, visto que os com a diminuição deste processo, os AGL passam a serem reesterificados dos TAG

e armazenados como gotículas lipídicas ou reesterificadas e exportadas como lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL). Desta forma, o acúmulo de gordura hepática pode ocorrer como um resultado do aumento da síntese, da entrada e da diminuição na exportação e oxidação da gordura (Abel, 2010) (Figura 6).

A esteatose vem sendo apontada como uma manifestação hepática da síndrome metabólica acometendo cerca de 25% da população mundial, e a esteatohepatite não alcoólica (EHNA) entre 3 e 4% (Samji *et al.*, 2019). Embora inicialmente seja considerada assintomática e possua característica benigna, a esteatose hepática representa o ponto de partida para o desenvolvimento de doenças mais graves EHNA, cirrose hepática e hepatocarcinoma (Figura 7). Neste processo, a ativação de células estreladas hepática (CEh) e o aumento da síntese de colágeno causam fibrose hepática (Solis-Herruzo *et al.*, 2003; Li e Jia, 2014).

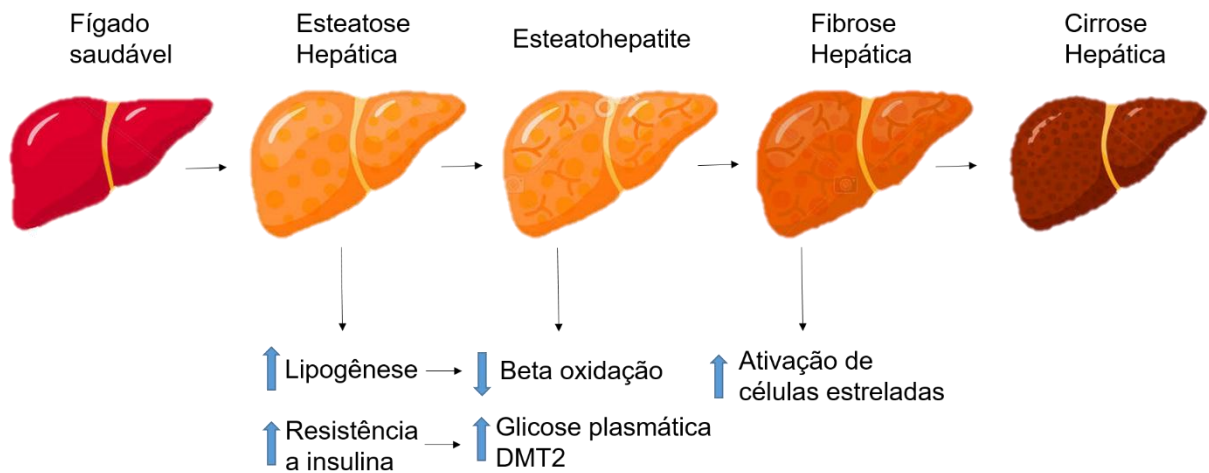
Figura 6. Metabolismo de acúmulo de gordura hepática.



Legenda: Diferentes fontes de ácidos graxos contribuem para o desenvolvimento do fígado gorduroso. Sob condições de resistência à insulina, a lipólise no tecido adiposo branco não é suprimida. Portanto, as gorduras periféricas armazenadas no tecido adiposo fluem para o fígado. Os ácidos graxos da dieta também são absorvidos pelo fígado através da captação de quilomícrons derivados do intestino. Além disso, a combinação de glicose plasmática elevada (hiperglicemia) e concentrações de insulina (hiperinsulinemia) promove a lipogênese *de novo* de ácidos graxos e prejudica a β -oxidação, contribuindo assim para o desenvolvimento de esteatose hepática. Após a etapa de esterificação (conversão de AGL em TAG), o TAG pode ser armazenado como gotículas lipídicas nos hepatócitos ou secretado no sangue como VLDL. Embora se acredite amplamente que o acúmulo hepático de lipídios resulta em resistência à insulina, permanece incerto se existe uma relação causal. Vários estudos recentes mostraram até uma clara dissociação entre esteatose hepática e resistência à insulina. AGL, ácidos graxos livres; TAG, triacilglicerol; VLDL, lipoproteína de densidade muito baixa.

Fonte: A Autora, 2019.

Figura 7. Progressão das doenças hepáticas.



Fonte: A Autora, 2019

2.3.2 Beta oxidação e lipogênese hepática

Alterações funcionais e estruturais de mitocôndrias hepáticas afetam a beta oxidação dos ácidos graxos nas mitocôndrias, aumentando a peroxidação lipídica em peroxissomos e microssomos gerando um aumento do estresse oxidativo, como já relatado na literatura em animais que possuíam esteatose microvesicular (Diao *et al.*, 2018). Já a relação da esteatose hepática com a resistência à insulina é causada pelo acúmulo da proteína de ligação ao elemento regulador do estero tipo 1 (Srebp1c), que é elevado em resposta aos altos níveis circulantes de insulina. A homeostase lipídica em células hepáticas é regulada por Srebp1c e seu aumento promove acréscimo da transcrição de genes de enzimas relacionadas a síntese dos AGL, entre elas a acetil CoA carboxilase (converte a acetil CoA em malonil CoA) e a ácido graxo sintase (FAS, que converte malonil CoA em palmitato) (Sakakura *et al.*, 2001).

A família de fatores de transcrição de receptores nucleares ativados por proliferadores de peroxissomos (Ppar) atuam como sensores de ácidos graxos no controle de genes envolvidos na homeostase energética e da glicose, diferenciação de adipócitos, inflamação, metabolismo de lipoproteínas e oxidação de ácidos graxos. Os Ppars possuem três formas, alfa, beta e gama, e estão expressos nos

diferentes tecidos (Berger e Moller, 2002; Dana *et al.*, 2019). Todas as isoformas participam da homeostase de lipídeos e regulação da glicose (balanço energético) (Sertznig *et al.*, 2007).

O Ppar alfa é muito expresso em tecidos metabolicamente ativos, como fígado, coração, músculo esquelético, mucosa intestinal e tecido adiposo marrom. Este receptor está implicado no metabolismo dos ácidos graxos e sua ativação diminui os níveis lipídicos. O Ppar gama é expresso no tecido adiposo branco e marrom, no intestino grosso e no baço. No entanto, sua expressão é mais alta nos adipócitos e desempenha um papel fundamental na regulação da adipogênese, balanço energético e biossíntese lipídica. Este receptor também participa do metabolismo das lipoproteínas e da sensibilidade à insulina. Já o Ppar beta é expresso em praticamente todos os tecidos; no entanto, é particularmente abundante no fígado, intestino, rim, tecido adiposo abdominal e músculo esquelético, todos envolvidos no metabolismo lipídico. Participa da oxidação de ácidos graxos, principalmente nos músculos esqueléticos e cardíacos, regula as concentrações de colesterol no sangue e os níveis de glicose (Grygiel-Gorniak, 2014). Resumidamente, Ppar alfa e Ppar beta facilitam principalmente a combustão de energia, enquanto o Ppar gama contribui para o armazenamento de energia, aprimorando a adipogênese (Rao *et al.*, 2002).

Associado a estes mecanismos, algumas citocinas inflamatórias estão envolvidas na progressão da DGHNA para EHNA. O fator de necrose tumoral alfa (Tnf alfa) encontra-se presente em todas as fases dos danos hepáticos ocorridos na EHNA, inclusive na patogênese da disfunção mitocondrial. Essa adipocina atua inibindo a expressão do Ppar alfa, estimulando a lipogênese no fígado e aumentando a liberação do AGL do tecido adiposo para o fígado, além de induzir a apoptose nos hepatócitos e influenciar a atividade das células envolvidas no processo inflamatório (Polyzos *et al.*, 2009).

2.3.3 Esteato hepatite não-alcóolica e Inflamação hepática

A IL-1 está envolvida em processos de doenças como resistência à insulina, inflamação do tecido adiposo e do fígado, fibrose, aterosclerose e alterações metabólicas, todos características comuns do DGHNA (Tilg *et al.*, 2016).

A IL-6 é secretada principalmente pelo tecido adiposo e é reconhecida como mediadora inflamatória. Tratamento de obesos camundongos com anticorpos anti-IL-6 levam ao aumento da sensibilidade à insulina, indicando que esta citocina está envolvida a patogênese da RI hepática. A IL-6 inibe lipólise mediada por insulina no tecido adiposo branco aumenta a entrega de AGL ao fígado (Chen *et al.*, 2017).

2.3.4 Células Estreladas Hepáticas

As CEh tem um papel fundamental na progressão da DHGNA para EHNA, um estágio mais crítico da doença hepática devido a lipotoxicidade causada pela maior secreção de citocinas agravando o estado inflamatório acrescido ao aumento do estresse oxidativo (Gupta *et al.*, 2018). As CEh também são conhecidas como células de “Ito”, perisinusoidais e células de armazenamento de gordura e se encontram quiescentes no espaço de Disse (localizado entre os hepatócitos e os sinusoides) armazenando vitamina A em gotículas lipídicas (Wake, 1971). Após a lesão hepática, as CEh são ativadas e aumentam sua taxa proliferativa e a secreção de matriz extracelular. A vitamina A armazenada é perdida e ocorre um aumento da expressão de alfa-actina de músculo liso (Friedman, 2008)

2.3.5 DHGNA e a Vitamina D

A deficiência de vitamina D é altamente prevalente entre os pacientes com DHGNA e essa deficiência está relacionada ao grau de insuficiência da função hepática e fibrose (Ebrahimpour-Koujan *et al.*, 2019). Foi sugerido que deficiência de

vitamina D pode ser usada como índice prognóstico e uma ferramenta de diagnóstico na EHNA (Kim *et al.*, 2017). Já demonstrado que a vitamina D e seus receptores podem desempenhar um papel importante na resposta do fígado a danos crônicos (Barchetta, 2012). Existe uma forte associação entre baixa concentração sérica de vitamina D e a incidência de DHGNA na ausência de qualquer sinal de lesão hepática grave. Essa associação é independente do diabetes, dos níveis de perfil lipídico e da resistência a insulina (Barchetta *et al.*, 2011). Além disso, existe uma estreita relação entre a diminuição dos níveis de vitamina D e as características histopatológicas da DHGNA (Targher *et al.*, 2007) e um efeito dependente da dose no acúmulo de gordura nos hepatócitos foi sugerido (Barchetta *et al.*, 2011).

Além da associação direta entre vitamina D e DHGNA, uma associação indireta também pode ser considerada devido à sua associação com a síndrome metabólica (Barchetta *et al.*, 2013), que é conhecido como fator de risco para DHGNA. Portanto, é razoável postular que a suplementação de vitamina D possa ter um efeito favorável no tratamento da DHGNA, melhorando a dislipidemia, a resistência à insulina e as anormalidades das enzimas hepáticas, especialmente alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e c-glutamilttransferase (GGT) (Eliades e Spyrou, 2015).

Vários ensaios clínicos foram realizados para verificar a eficácia da suplementação de vitamina D no tratamento da DHGNA; no entanto, essas investigações relatam resultados conflitantes (Mansour-Ghanaei *et al.*, 2019).

1 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e dieta

O estudo foi submetido e aprovado pelo comitê de ética local (protocolo número CEUA/36/2016) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro e os protocolos seguiram os padrões atuais de experimentação animal (National Institutes of Health Publication No. 85-23, revisado em 1996).

A linhagem utilizada foi proveniente do Núcleo de Animais de Laboratório, da Universidade Federal Fluminense – UFF, Niterói, RJ. Sessenta camundongos machos da linhagem C57BL/6, com 12 semanas de idade, foram mantidos em gaiolas ventiladas (sistema NexGen, Allentown Inc., PA, EUA, 12 h / 12 h ciclo escuro / claro, $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ de temperatura) e tiveram livre acesso a comida e água. Eles foram alocados aleatoriamente em seis grupos ($n=10/\text{grupo}$) de acordo com a dieta oferecida (detalhes na Tabela 1). As formulações seguiram as recomendações do AIN93M para macro e micronutrientes (Reeves *et al.*, 1993) e foram produzidas pela PragSoluções (Jaú, São Paulo, Brasil, www.pragsolucoes.com.br).

A vitamina D, contida no mix de vitamina foi alterado de acordo com a dieta experimental, nos grupos C e F, continham concentrações indicadas pela AIN93M, os grupos CDD e FDD não possuíam nenhum tipo de vitamina D acrescentadas a dieta e os grupos CDS e FDS continham 10x o teor recomendado pela AIN93M.

Os grupos foram divididos de acordo com as dietas experimentais que foram mantidas por dez semanas (Figura 8):

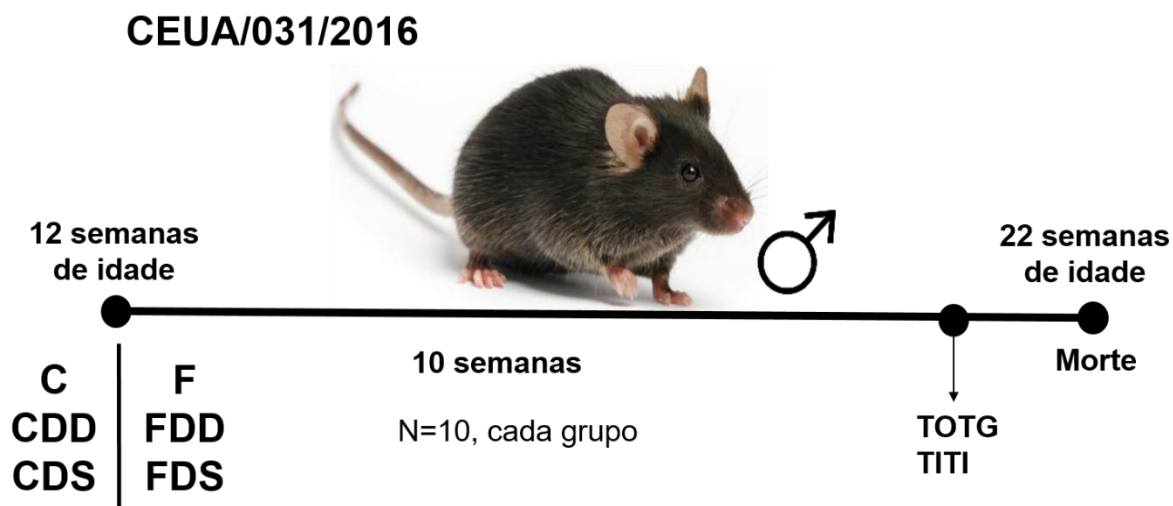
- a) **C** (dieta controle, incluindo 1000 UI/kg de vitamina D3);
- b) **CDD** (dieta controle sem vitamina D3);
- c) **CDS** (dieta controle suplementada com vitamina D 10000 UI/kg de vitamina D3);
- d) **F** (dieta de frutose, 474,3 g/kg de frutose, incluindo 1000 UI/kg de vitamina D3);
- e) **FDD** (dieta de frutose sem vitamina D3);
- f) **FDS** (dieta de frutose suplementada com vitamina D 10000 UI/kg de vitamina D3).

Tabela 1. Composição das dietas experimentais. Todos os nutrientes correspondem às recomendações do AIN-93M para roedores

Nutriente (g/kg)	Dietas Controle			Dietas Rica em Frutose		
	C	CDD	CDS	F	FDD	FDS
Amido de milho	620,70	620,70	620,70	146,40	146,40	146,40
Caseína	140,00	140,00	140,00	140,00	140,00	140,00
Sacarose	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
Frutose	-	-	-	474,3	474,3	474,3
Óleo de soja	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
Fibra	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00
L-cistina	1,80	1,80	1,80	1,80	1,80	1,80
Colina	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50
Mix de minerais	35,00	35,00	35,00	35,00	35,00	35,00
Carbonato de calico	357,00	357,00	357,00	357,00	357,00	357,00
Mix de vitaminas	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
Vitamina D₃ – (g/kg mix)	0,25	-	2,5	0,25	-	2,5
Energia (Kcal/Kg)	3802,80	3802,80	3802,80	3802,80	3802,80	3802,80
Hidratos de Carbono (%)	76,00	76,00	76,00	76,00	76,00	76,00
Amido de milho (%)	(66,00)	(66,00)	(66,00)	(16,00)	(16,00)	(16,00)
Sacarose (%)	(10,00)	(10,00)	(10,00)	(10,00)	(10,00)	(10,00)
Frutose (%)	(-)	(-)	(-)	(50,00)	(50,00)	(50,00)
Proteínas (%)	14,00	14,00	14,00	14,00	14,00	14,00
Lipídios (%)	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00

Abreviaturas: C, dieta controle com níveis normais de vitamina D; CDD, dieta controle com deficiência de vitamina D; CDS, dieta controle com suplementação de 10x de vitamina D; F, dieta rica com frutose com níveis normais de vitamina D; FDD, dieta rica em frutose com deficiência de vitamina D; FDS, dieta rica em frutose com suplementação de 10x de vitamina D. A dosagem da vitamina D é de 400.000UI/kg de dieta. Fonte: (Reeves *et al.*, 1993).

Figura 8. Linha do tempo do experimento, demonstrando o período de administração das dietas e seus experimentos



Legenda: Camundongos *C57Bl/6* machos, aos 3 meses de idade. C, dieta controle com níveis normais de vitamina D; CDD, dieta controle com deficiência de vitamina D; CDS, dieta controle com suplementação de 10x de vitamina D; F, dieta rica com frutose com níveis normais de vitamina D; FDD, dieta rica em frutose com deficiência de vitamina D; FDS, dieta rica em frutose com suplementação de 10x de vitamina D; TOTG, teste oral de tolerância a glicose; TITI, teste intraperitoneal de tolerância a insulina.

Fonte: A Autora, 2019

3.2 Ingestão de comida e água, massa corporal e pressão arterial

A ingestão alimentar (IA) e a ingestão hídrica (IH) foram mensuradas diariamente através do resto-ingestão, ou seja, a diferença entre a quantidade ofertada e a quantidade deixada após as 24h. A massa corporal (MC, segunda-feira, 11h) e pressão arterial sistólica (PAS, sexta, 11h) foram avaliadas semanalmente. A MC foi aferida em balança digital para a determinação do ganho de peso e acompanhamento de possíveis alterações no crescimento (n=10, cada grupo), desde a décima segunda semana de vida, quando foram divididas nos grupos e foi iniciada a administração das dietas até a eutanásia. A PAS foi obtida com pletismografia de manguito de cauda (medidor de pressão de armazenamento modelo LE 5002, Panlab Harvard Apparatus, Barcelona, Espanha) para avaliar possíveis alterações cardiovasculares através da aferição da pressão arterial

sistólica causadas pelos insultos dietéticos. Foi realizada a partir da décima semana de vida, sendo considerada as primeiras duas semanas aclimação com o ambiente.

3.3 Tolerância à glicose e tolerância à insulina, resistência e sensibilidade

Uma semana antes da morte, os animais foram colocados em jejum de seis horas (das 7h da manhã às 13h da tarde) para determinação da glicemia de jejum e a realização do Teste Oral de Tolerância a Glicose (TOTG). Uma pequena incisão na cauda do animal foi realizada para aferição da glicose sérica pelo glicômetro (Accu-check Performa, Roche, Mannheim, Alemanha). O TOTG foi realizado através da administração oral da solução de glicose 25% dose de 1,0g/Kg através da introdução de uma cânula orogástrica e todo o volume introduzido na cavidade gástrica, sem que houvesse perda de líquido para avaliar a tolerância à glicose. Para a avaliação do Teste Intraperitoneal de Tolerância a Insulina (TITI), três dias após o TOTG, os animais permaneceram em jejum pelo período de 4h (das 9h da manhã às 13h da tarde). A insulina foi injetada intraperitonealmente (0,5 U/kg) para estimar a tolerância à insulina. Em ambas as ocasiões, a glicemia foi mensurada em zero, 15, 30, 60 e 120 min e a área sob a curva (ASC) foi calculada com a regra trapezoidal (Tai, 1994) (GraphPad Prism versão 8.0 para Windows, GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA). Além disso, estimou-se o modelo de homeostase para a avaliação da resistência à insulina (HOMA-IR) (Matthews *et al.*, 1985): $HOMA-IR = \text{glicemia de jejum (mmol / L)} \times \text{insulina sérica em jejum (UI / mL)} / 22,5$; e o quantitativo de verificação de sensibilidade à insulina (QUICKi) (Katz *et al.*, 2000): $QUICKi = [1 / \log (\text{insulina de jejum } \mu\text{U / mL}) + \log (\text{glicemia de jejum mg / dL})]$.

3.4 Morte e extração de tecidos

Os animais jejuaram durante seis horas, foram anestesiados (pentobarbital sódico, 150 mg) e mortos por exsanguinação (corte dos vasos cervicais). A coleta de

sangue ocorreu, em temperatura ambiente de 21°C, através de punção cardíaca no átrio direito e o sangue foi armazenado em tubos de ensaio para posterior centrifugação (1200g / 15 min).

Além disso, o fígado foi dissecado, e fragmentos de todos os lobos foram retirados e preparados para microscopia de luz (n=5, fixados por imersão em fixador fresco 4% p/v, 0,1M formaldeído, pH 7,2 por 48 h, então incluídos em Paraplast Plus (Sigma-Aldrich Co., St.Louis, MO, EUA), ou congelados a -80 °C para análise molecular.

3.5 Bioquímica: Fígado e Plasma

A coleta do plasma foi obtida através da centrifugação (120 g/15 minutos) do sangue coletado, em temperatura ambiente para posterior armazenamento em temperatura de -20° C. Com o uso de kits comerciais (Sistema Bioclin II, Quibasa, MG, Brasil) medimos glicemia de jejum (código K082), colesterol total hepático e plasmático (CT, código K0823) e triacilglicerol (TAG, código K117-2). Estas análises foram através do método cinético-colorimétrico do manual de instruções da Bioclin® (Bioclin System II, Quibasa, Belo Horizonte – MG, Brasil).

Para determinação do *status* de vitamina D circulante utilizamos os kits de ensaio imunoenzimático (ELISA) e medimos em duplicata (TP-Reader ELX800, BioTek Instruments Winooski, VT, EUA) as concentrações plasmáticas de 25(OH)D (25-hidroxi vitamina D EIA, AC-57F1, Immunodiagnostic Systems Limited, Boldon, Reino Unido) e com kits Millipore (Darmstadt, Alemanha): Insulina (# EZRMI-13K), Adiponectina (#EZMADP-60K) e Leptina (#EZML-82K).

3.6 Estrutura Hepática

No momento da eutanásia, o fígado foi cuidadosamente dissecado e totalmente incluído em solução (1,27 mol/L de formaldeído em 0,1M de tampão fosfato, pH 7,2) durante 48 horas em temperatura ambiente. Após a fixação,

fragmentos de todos os lobos foram processados para técnicas histológicas, incluído em Paraplast plus (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos da América), foram feitos cortes com cinco µm de espessura e corados com hematoxilina e eosina (HE) e *Sirius red* para microscopia de luz (microscópio Nikon modelo 80i e câmera digital DS-Ri1, Nikon Instruments, Inc., Nova York , EUA), ou imunofluorescência e microscopia confocal de varredura a laser.

3.6.1 Esteatose Hepática e Fibras de Colágeno

As secções coradas com HE foram utilizadas para avaliar a esteatose hepática por contagem de pontos. Foram obtidas as imagens digitais com um microscópio Leica DMRBE (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha) e uma câmera Infinity 1-5C (Luminera Co., Ottawa, ON, Canadá) de pelo menos dez seções não consecutivas por animal em campos escolhidos de forma aleatória. Um sistema teste composto por 36 pontos e linhas permitidas e proibidas, confeccionado pelo Software STEPanizer (www.stepanizer.com) (Tschanz *et al.*, 2011) foi utilizado para estimar a densidade volumétrica da esteatose hepática (Vv) a partir da contagem de pontos que tocavam gotículas de gordura nos hepatócito:

$$V_{v[\text{esteatose}]} = P_p [\text{Pontos na gordura}] / P_T [\text{Pontos totais}]$$

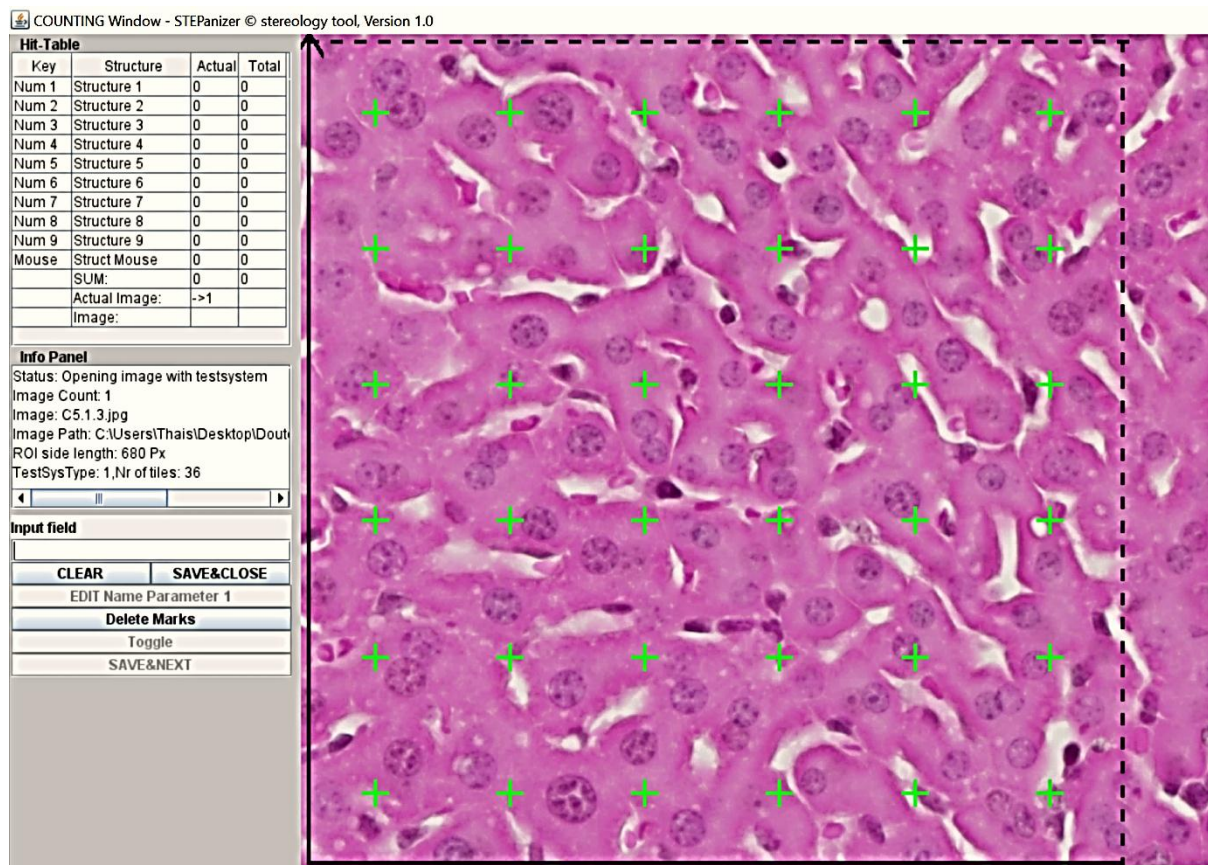
onde Pp é o número de pontos que atingem as gotas de gordura nos hepatócitos e Pt os pontos totais sistema (Catta-Preta *et al.*, 2011; Mandarin-de-Lacerda e Del Sol, 2017), conforme demonstrado na Figura 9.

Em vermelho observa-se a distribuição de fibras colágenas no interstício do fígado (campo claro, colágeno aparece em vermelho sobre fundo amarelo pálido) (Marinho *et al.*, 2017).

3.6.2 Imunofluorescência do fígado

Após o a desparafinação dos cortes histológicos, foi realizada a recuperação antigênica com tampão citrato (60 °C, pH 6,0) por 20 min, em seguida foi realizado o bloqueio com glicina a 2%, seguido de bloqueio com solução de PBS/BSA a 5% e incubamos com albumina de soro bovino (BSA) em solução salina tamponada com fosfato. Em seguida, os anticorpos foram diluídos 1:100 em tampão de bloqueio (PBS/BSA a 1%) e incubados durante a noite a 4 °C. As secções foram incubadas com anti-perilipina (Plin) 2 (CDSB-PA920084, Cusabio), uma proteína lipídica lipoplasmática citoplasmática ligada à DHGNA (Libby *et al.*, 2016) e anti-Relina (AB78540, Abcam), uma glicoproteína de matriz extracelular secretada de grande dimensão em células estreladas hepáticas ativadas (CEh) (Kobold *et al.*, 2002). As amostras foram incubadas por uma hora com ação anti-IgG-Alexa 488 para Plin2 e anti-IgG-Alexa 546 para anti-Relina (Invitrogen, Molecular Probes, Carlsbad, CA, EUA), ambas diluídas 1:100 em PBS/BSA 1%. As lâminas foram montadas com Slow Fade (Invitrogen, Molecular Probes, Carlsbad, CA, EUA) para manter a fluorescência. As imagens de imunofluorescência indireta foram analisadas por microscópio confocal de varredura (C2, Nikon Inc., Tóquio, Japão).

Figura 9. Análise estereológica de estatose hepática pelo software STEPanizer (www.stepanizer.com) (Tschanz et al., 2011).



Legenda: Uma imagem digital do fígado foi adquirida e através da contagem de pontos é possível obter a densidade volumétrica da esteatose hepática.

Fonte: A Autora, 2019

3.7 Expressão gênica (reação em cadeia da polimerase em tempo real, qPCR)

O RNA total do fígado foi extraído com o reagente Trizol (Invitrogen, CA, EUA). A espectroscopia *nanovue* (GE Life Sciences) foi usada para determinar a quantidade de RNA. Em seguida, 1 µg de RNA foi tratado com DNase I (Invitrogen, CA, EUA). Posteriormente, os iniciadores Oligo (dT) para mRNA e transcriptase reversa Superscript III (ambos Invitrogen, CA, EUA) foram aplicados na síntese do cDNA da primeira cadeia; O qPCR utilizou um termociclador Biorad CFX96 e a

mistura SYBR Green (Invitrogen, CA, EUA). Utilizamos o software online Primer3 para projetar os iniciadores, conforme descrito na Tabela 2. Investigamos os genes associados à lipogênese, beta oxidação, inflamação e vitamina D:

- a) Perilipina, *Plin2*;
- b) Fator de transcrição 1c, de ligação ao elemento regulador de esterol, *Srebp1c*;
- c) Proteína de ligação a elementos responsivos a carboidratos, *Chrebp*;
- d) Ácidos graxos sintase, *Fas*;
- e) Receptores nucleares ativados por proliferadores de peroxissomos gama, *Ppar gama*;
- f) Receptores nucleares ativados por proliferadores de peroxissomos alfa, *Ppar alfa*;
- g) Interleucina 1, *Il1*;
- h) Interleucina 6, *Il6*;
- i) Fator de necrose tumoral, *Tnf alfa*;
- j) Receptor de vitamina D, *Vdr*
- k) Enzima ativadora, *Cyp27b1*.

A β -actina endógena foi usada para normalizar a expressão dos genes selecionados. Após o programa de pré-desnaturação e ativação da polimerase (4 min a 95 °C), 44 ciclos de 95 °C (10 s) e 60 °C (15 s) foram seguidos por um programa de curva de fusão (60 a 95 °C, taxa de aquecimento 0,1 °C / s). Os controles negativos consistiram em poços nos quais o cDNA foi substituído por água deionizada. A razão de expressão relativa do mRNA foi calculada usando a equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$, na qual $-\Delta Ct$ representa a razão entre o número de ciclos (CT) dos genes alvo com o controle endógeno.

Tabela 2. Primers para o qPCR

Primers	5'-3' - FW	5'-3' - RV
<i>Beta-actina</i>	TGAGACCTTCAACACCCCAGCCA	CGTAGTGGGCACAGTGTGGGTG
<i>Chrebp</i>	CACTCAGGGAATACACGCCTAC	ATCTTGGTCTTAGGGTCTTCAG
<i>Cyp27b1</i>	CAAATGGCTTTGTCCCAGAT	GGTCATGGGCTTGATAGGAA
<i>Fas</i>	TCGAGGAAGGCACTACACCT	CACCCACTGGAAGCTGGTAT
<i>Il1</i>	ACGGATTCCATGGTGAAGTC	CTCACAAGCAGAGCACAAGC
<i>Il6</i>	AGTTGCCTTCTTGGGAGTGA	ACAGGTCTGTTGGGAGTGGT
<i>Plin2</i>	AATATGCACAGTGCCAACCA	CGATGCTTCTCTTCCACTCC
<i>Ppar alfa</i>	CAAGGCCTCAGGGTACCACTAC	GCCGAATAGTTCGCCGAAA
<i>Ppar gama</i>	CACAATGCCATCAGGTTTGG	GCTGGTCGATATCACTGGAGAT
<i>Srebp1c</i>	AGCAGCCCCTAGAACAAACA	TCTGCCTTGATGAAGTGTGG
<i>Tnf alfa</i>	TCAGCCGATTTGCTATCTCA	TGGAAGACTCCTCCCAGGTA
<i>Vdr</i>	AGCTGATCGAACCCTCATA	GCAGCACATGTTCTTCCTCA

Legendas: *Cyp27b1*, 1 α -hidroxilase; *Chrebp*, proteína de ligação ao elemento responsivo a carboidrato; *Fas*, ácido graxo sintase; *Il*, Interleucina; *Plin*, Perilipin; *Ppar*, receptor ativador de proliferação perioxossomal; *Srebp1c*, fator de transcrição de ligação a elementos reguladores de esterol; *Tnf*, fator de necrose tumoral; *Vdr*, receptor de vitamina D.

Fonte: A Autora, 2019

3.8 Análise estatística

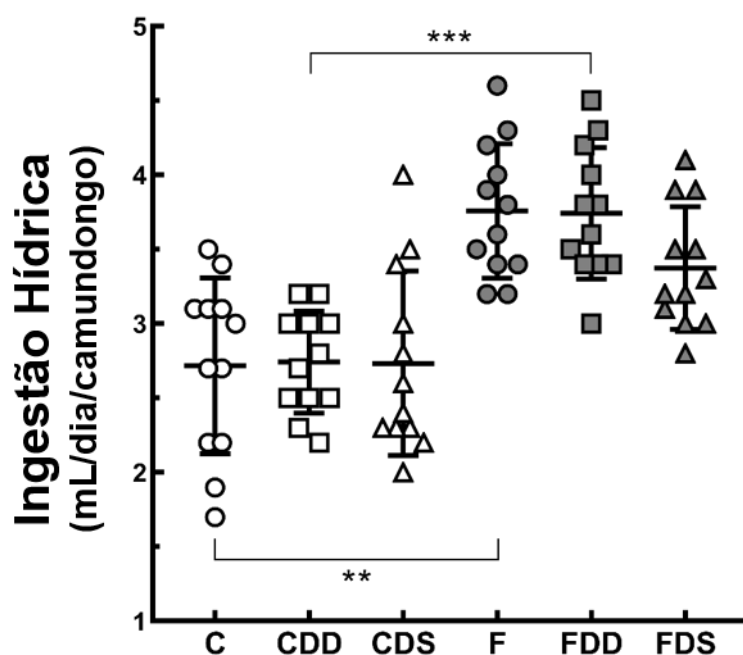
Os dados foram apresentados como média e desvio padrão (DP). Não assumimos DP igual entre os grupos por causa do tamanho da amostra e, portanto, usamos a análise de variância de Brown-Forsythe e Welch (ANOVA) e o teste de comparação múltipla T2 do Tamhane (recomendado para amostras pequenas). Além disso, uma ANOVA de dois fatores foi usada para avaliar a contribuição e a interação com os resultados dos dois fatores, ingestão de frutose e concentração de vitamina D. Os valores de $P < 0,05$ foram consistentes com um nível estatisticamente significativo (GraphPad Prism v. 8.02 para Windows, GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 Ingestão de comida e água, massa corporal e pressão arterial sistólica

Os animais terminaram o estudo sem sinais de doença (analisando a textura do pelo, a produção de fezes e urina e o comportamento). As dietas eram isoenergéticas e a ingestão de alimentos não foi diferente entre os grupos (Tabela 3). Houve uma maior ingestão de água nos grupos frutose em comparação aos grupos controle pareados F vs. C (+38%) e FDD vs. CDD (+37%) (Figura 10).

Figura 10. Ingestão de água.

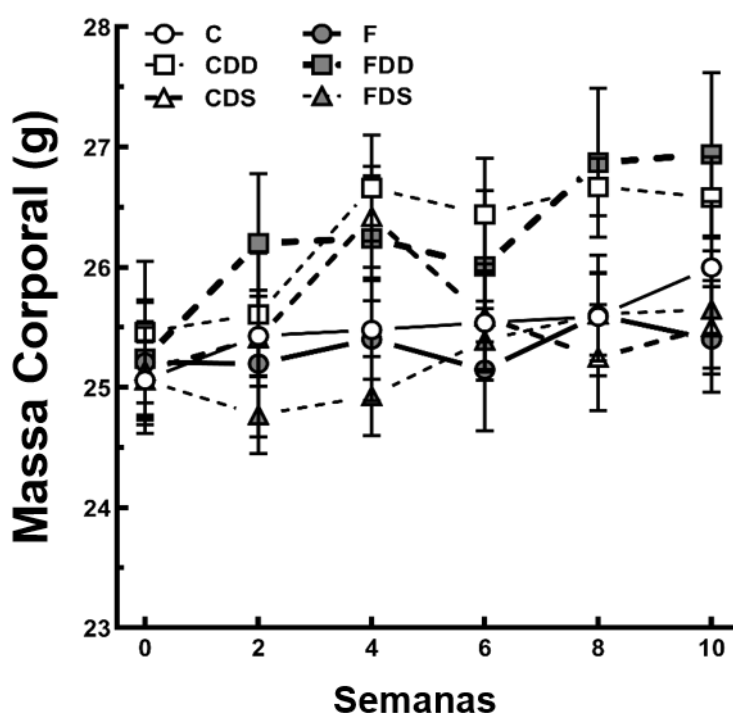


Legenda: Os valores estão expressos como a média $\pm$ DP (n=5/grupo), Brown-Forsythe e Welch ANOVA e os testes de comparação múltipla T2 do Tamhane: ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. Grupos: C, controle; DD, deficiência de vitamina D; DS, suplementação de vitamina D; F, frutose.

Fonte: A Autora, 2019

A MC não diferiu entre os grupos (Figura 11), mas a PAS foi elevada no grupo controle com deficiência de vitamina D e reduzida quando a vitamina D foi suplementada. Além disso, a PAS aumentou no grupo da frutose em comparação com o grupo controle, mas diminuiu no grupo da frutose suplementado com vitamina D (Figura 12)

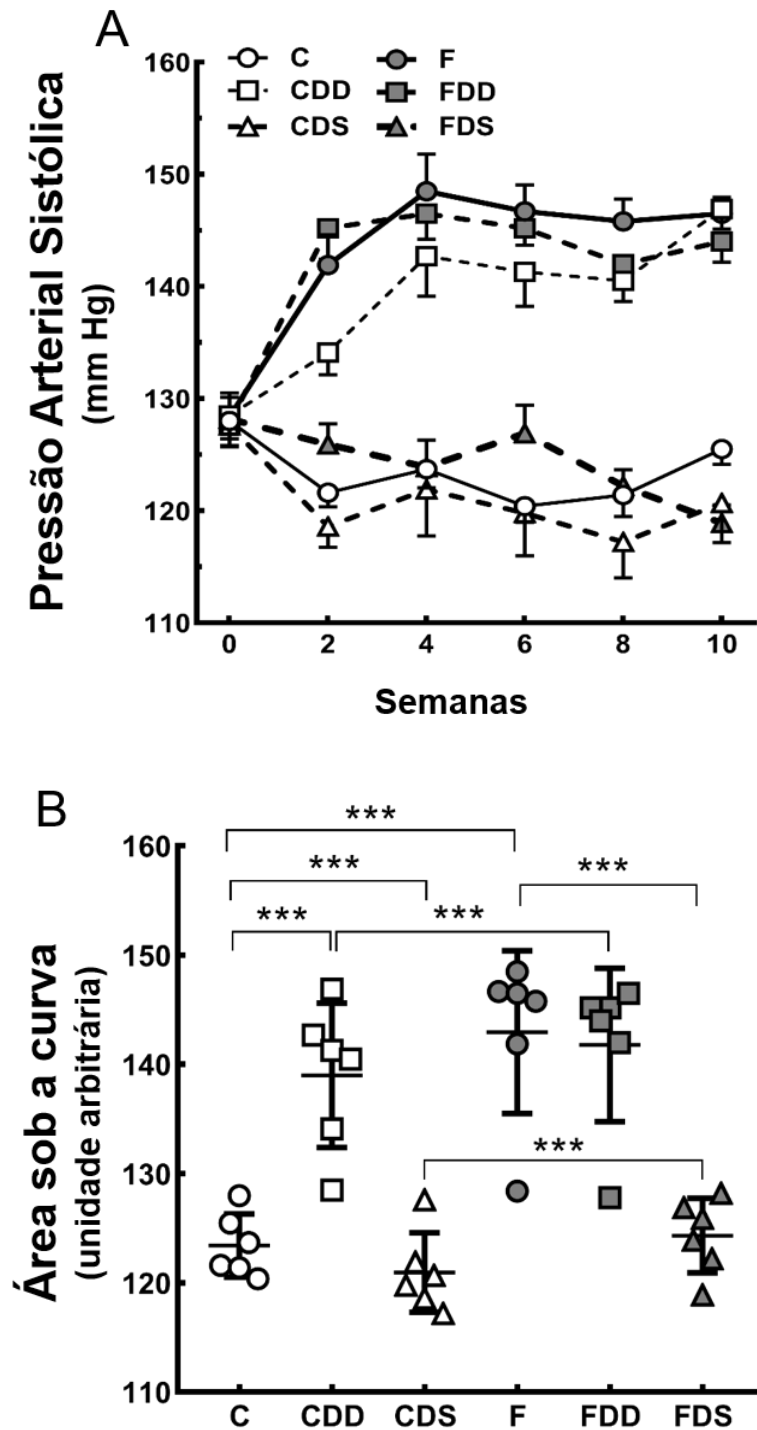
Figura 11. Massa corporal.



Legenda: Os valores são expressos como a média $\pm$ DP (n=5 / grupo), Brown-Forsythe e Welch ANOVA e os testes de comparação múltipla T2 do Tamhane. Grupos: C, controle; DD, deficiência de vitamina D; DS, suplementação de vitamina D; F, frutose.

Fonte: A Autora, 2019

Figura 12. Pressão Arterial



Legenda: **(A)** Pressão arterial e **(B)** Área sob as curvas da pressão arterial com significância estatística. Os valores são expressos como a média $\pm$ DP ($n=5$ /grupo), Brown-Forsythe e Welch ANOVA e os testes de comparação múltipla T2 do Tamhane: ** $P<0,01$; *** $P<0,001$. Grupos: C, controle; DD, deficiência de vitamina D; DS, suplementação de vitamina D; F, frutose.

Fonte: A Autora, 2019

4.2 Glicemia de jejum, tolerância à glicose e tolerância à insulina, resistência e sensibilidade e níveis plasmáticos de 25(OH)D e insulina

Verificamos o metabolismo da glicose e insulina. A glicemia de jejum aumentou nos grupos controle com deficiência de vitamina D (Tabela 3). Não observamos intolerância à glicose (Figura 13A-B), mas intolerância à insulina (Figura 13C-D) e resistência à insulina (Tabela 3, HOMA-IR) agravadas pela combinação de deficiência de frutose e vitamina D e melhoradas pela vitamina D suplementação. A deficiência de vitamina D diminuiu a sensibilidade à insulina (Tabela 3, QUICKi).

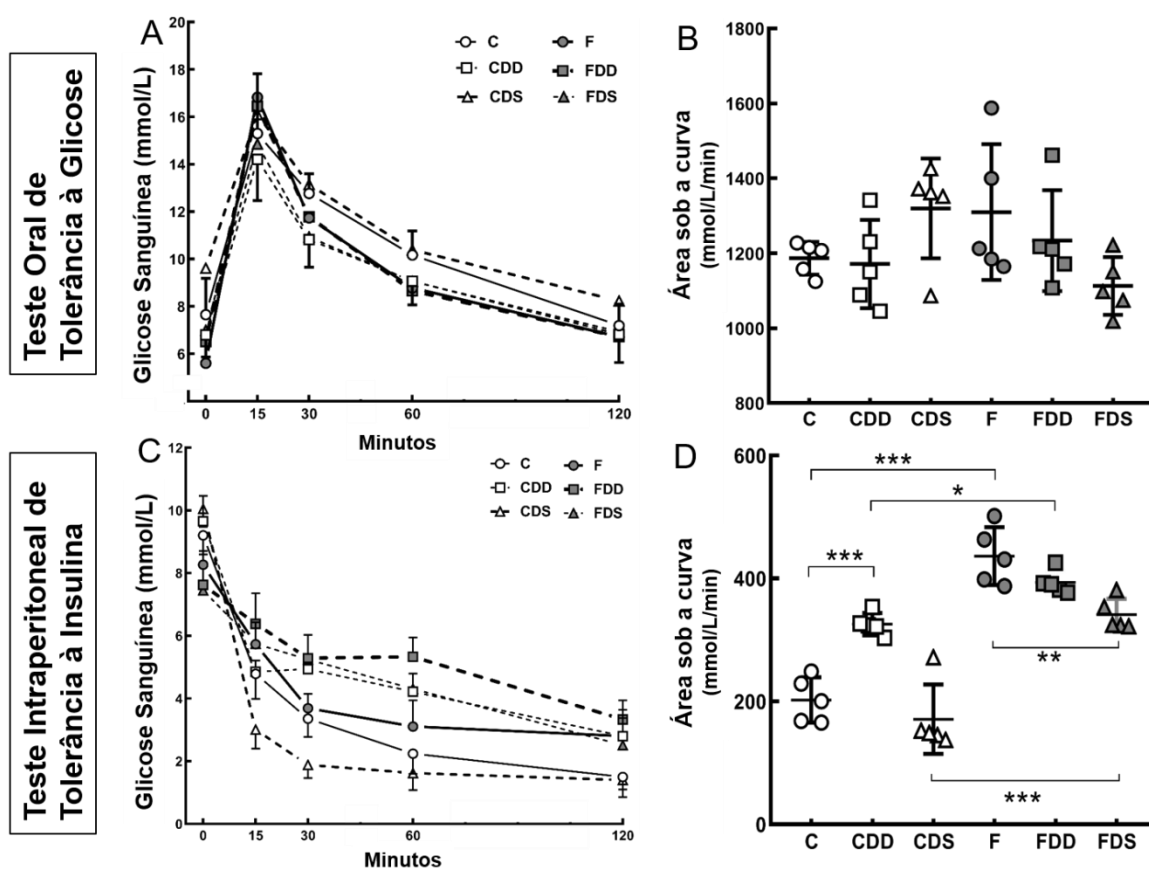
A restrição dietética de vitamina D reduziu os níveis plasmáticos de 25(OH)D para uma concentração quase indetectável, enquanto a suplementação dietética de vitamina D foi eficaz para manter os níveis de 25(OH)D altos (Figura 14A). O grupo controle suplementado com vitamina D apresentou baixos níveis de insulina. Na frutose com grupo com deficiência de vitamina D, as concentrações de insulina foram altas em comparação com o grupo controle correspondente (Tabela 3)

Tabela 3. Ingestão alimentar, bioquímica, resistência à insulina e sensibilidade à insulina. Os valores são expressos como a média $\pm$ DP (n=5/grupo), Brown-Forsythe e Welch ANOVA e os testes de comparação múltipla T2 do Tamhane: $P < 0,05$ quando: * $\neq$ C; † $\neq$ CDD; ‡ $\neq$ F.

Dados	C	CDD	CDS	F	FDD	FDS
Glicemia de jejum (mmol/L)	7,40 $\pm$ 0,96	10,53 $\pm$ 0,45*	6,28 $\pm$ 1,80	9,40 $\pm$ 2,86	12,78 $\pm$ 2,34	9,00 $\pm$ 2,46
IA (g/dia)	2,67 $\pm$ 0,31	2,54 $\pm$ 0,15	2,63 $\pm$ 0,22	2,71 $\pm$ 0,20	2,85 $\pm$ 0,19	2,72 $\pm$ 0,21
Insulina (pmol/L)	695,0 $\pm$ 129,0	515,0 $\pm$ 111,0	319,0 $\pm$ 55,5*	745,0 $\pm$ 142,0	926,0 $\pm$ 122,0†	900,0 $\pm$ 279,0
HOMA-IR	8,43 $\pm$ 0,75	11,06 $\pm$ 0,98	8,23 $\pm$ 0,82	9,54 $\pm$ 0,57	1,43 $\pm$ 2,19†	8,24 $\pm$ 0,64‡
TAG hepático (g/L)	1,22 $\pm$ 0,20	1,03 $\pm$ 0,30	1,24 $\pm$ 0,09	2,94 $\pm$ 1,29	1,88 $\pm$ 0,38	0,93 $\pm$ 0,15
CT hepático (mmol/L)	1,55 $\pm$ 0,03	1,83 $\pm$ 0,14	1,68 $\pm$ 0,06	2,30 $\pm$ 0,08*	1,78 $\pm$ 0,09‡	1,61 $\pm$ 0,05‡
TAG plasmático (g/L)	0,79 $\pm$ 0,09	0,83 $\pm$ 0,01	0,78 $\pm$ 0,06	0,88 $\pm$ 0,12	1,05 $\pm$ 0,13	0,87 $\pm$ 0,08
CT plasmático (mmol/L)	2,79 $\pm$ 0,58	3,69 $\pm$ 0,09	3,39 $\pm$ 0,24	4,43 $\pm$ 0,24*	4,40 $\pm$ 0,56	3,66 $\pm$ 0,14‡
QUICKi	0,293 $\pm$ 0,006	0,270 $\pm$ 0,008*	0,294 $\pm$ 0,016	0,271 $\pm$ 0,019	0,252 $\pm$ 0,007†	0,290 $\pm$ 0,006

Legenda: C, grupo controle; CDD, grupo controle com deficiência de vitamina D; CDS, grupo controle com suplementação de vitamina D; CT, colesterol total; F, grupo frutose; FDD, grupo frutose com deficiência de vitamina D; FDS, grupo frutose com suplementação de vitamina D; HOMA-IR, homeostasis model for the evaluation of insulin resistance, modelo de homeostase para avaliação da resistência à insulina; IA, ingestão alimentar; QUICKi, quantitative insulin-sensitivity check index, índice quantitativo de verificação da sensibilidade a insulina; TAG, triacilglicerol.

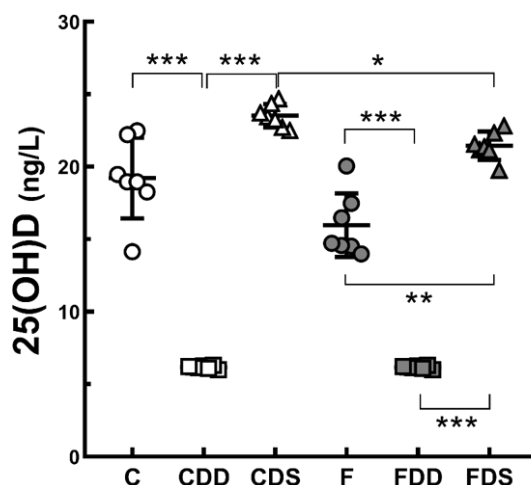
Figura 13. Glicose e insulina.



Legenda: **(A)** Teste oral de tolerância à glicose; e **(B)** Área sob as curvas do teste oral de tolerância à glicose; **(C)** Teste intraperitoneal de tolerância à insulina; e **(D)** Área sob as curvas do teste de tolerância à insulina intraperitoneal com significância estatística. Os valores são expressos como a média $\pm$ DP ($n=5$ /grupo), Brown-Forsythe e Welch ANOVA e os testes de comparação múltipla T2 do Tamhane: * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$. Grupos: C, controle; DD, deficiência de vitamina D; DS, suplementação de vitamina D; F, frutose.

Fonte: A Autora, 2019

Figura 14. Bioquímica



Legenda: Análise plasmática de 25(OH)D, 25-hidroxivitamina D. Os valores são expressos como a média $\pm$ DP (n=5/grupo), Brown-Forsythe e Welch ANOVA e os testes de comparação múltipla T2 do Tamhane: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. Grupos: C, controle; DD, deficiência de vitamina D; DS, suplementação de vitamina D; F, frutose.

Fonte: A Autora, 2019

4.3 Outras análises bioquímicas

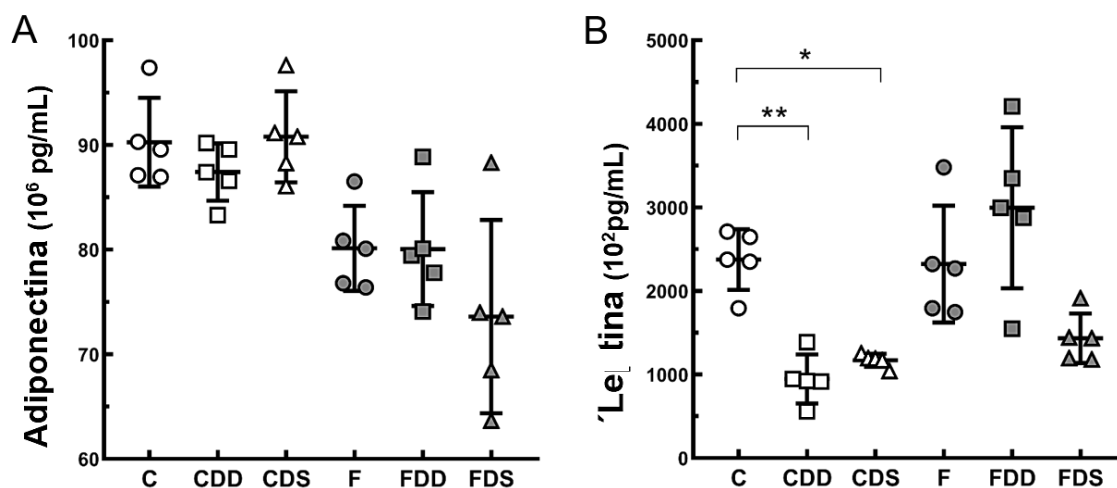
O TAG no fígado e plasma e o CT foram pouco influenciados pela frutose e vitamina D no período em que este estudo durou (Tabela 3). Além disso, não observamos diferença nos níveis de adiponectina (Figura 15A), mas as concentrações de leptina foram menores no grupo controle com deficiência de vitamina D (Figura 15B).

4.4 Estrutura hepática

A deficiência de vitamina D e a ingestão crônica de frutose são dois insultos aditivos capazes de modificar a estrutura do fígado. A fibrose intersticial foi intensa e generalizada no grupo controle com deficiência de vitamina D, grupo frutose e grupo

frutose com deficiência de vitamina D. No entanto, a suplementação de vitamina D foi benéfica na restauração da estrutura hepática, mesmo com a persistência da ingestão de frutose (Figura 16). A ativação do CEh (identificada pela expressão de Relina, Figura 17) foi observada no grupo da frutose e no grupo da frutose com deficiência de vitamina D e pode ser uma explicação razoável para a fibrose intersticial observada.

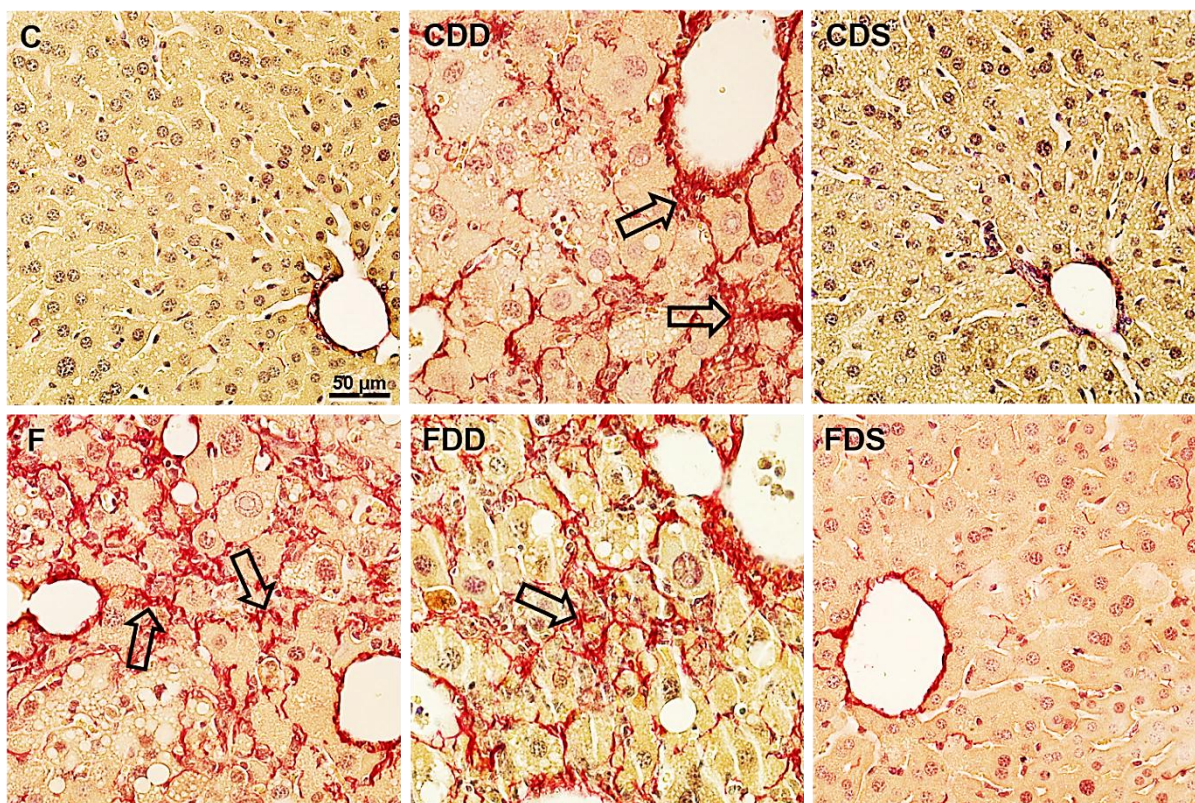
Figura 15. Bioquímica.



Legenda: **(A)** Análise plasmática de adiponectina; **(B)** Análise plasmática de leptina. Os valores são expressos como a média $\pm$ DP ($n=5$ / grupo), Brown-Forsythe e Welch ANOVA e os testes de comparação múltipla T2 do Tamhane: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. Grupos: C, controle; DD, deficiência de vitamina D; DS, suplementação de vitamina D; F, frutose.

Fonte: A Autora, 2019

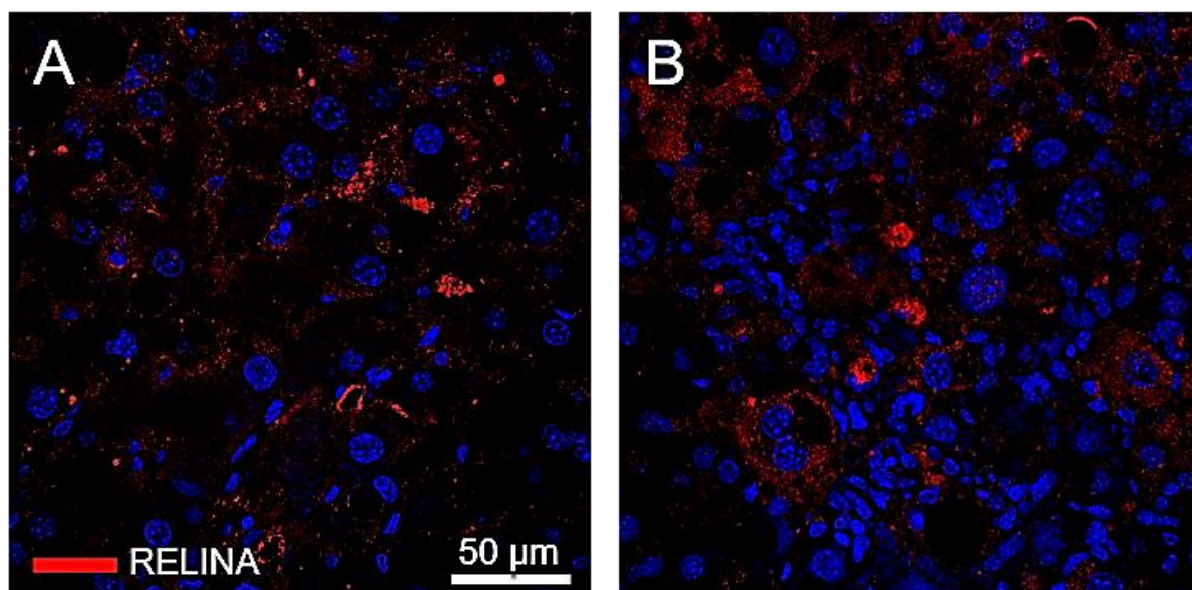
Figura 16. Fibrose hepática.



Legenda: Fotomicrografias representativas do tecido hepático coradas com vermelho Sirius (mesma ampliação em todas as fotomicrografias). A identificação dos grupos é indicada no canto superior esquerdo da fotomicrografia. Há fibrose intersticial (vermelho, setas abertas) na CDD e mais pronunciada em F e FDD. A suplementação de vitamina D restaurou a estrutura do fígado (CDS e FDS). Grupos: C, controle; DD, deficiência de vitamina D; DS, suplementação de vitamina D; F, frutose

Fonte: A Autora, 2019

Figura 17. Células estreladas hepáticas ativadas.

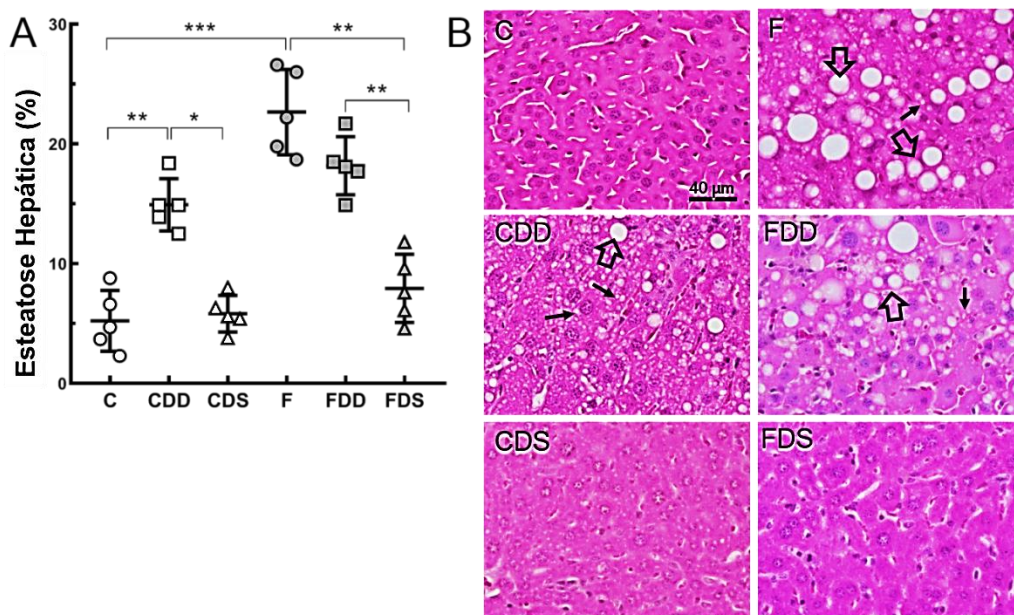


Legenda: **(A)** frutose (grupo F); **(B)** Frutose com deficiência de vitamina D (grupo FDD). Os outros grupos não foram mostrados devido à falta de coloração anti-Relina (indicando que as células estreladas hepáticas não foram ativadas nesses grupos). Seções representativas do tecido hepático preparadas para imunofluorescência com o anticorpo anti-Relina (microscopia a laser confocal de varredura a vermelho para identificar as células estreladas hepáticas, mesma ampliação em todas as fotomicrografias).

Fonte: A Autora, 2019

A esteatose hepática foi quantificada (Figura 18A) e ilustrada (Figura 18B). O grupo controle com deficiência de vitamina D, grupo frutose e grupo frutose com deficiência de vitamina D mostrou esteatose significativa. No entanto, a suplementação de vitamina D mostrou-se benéfica na redução da esteatose. Nós sugerimos a associação da esteatose com a expressão de Plin2 nos hepatócitos, sabendo que o Plin2 está envolvido na formação de gotículas lipídicas no fígado e nos tecidos periféricos. Detectamos um aumento da expressão de Plin2 no grupo controle com deficiência de vitamina D, grupo frutose e grupo frutose com deficiência de vitamina D. Mais uma vez, a suplementação de vitamina D reduziu a expressão de Plin2 no grupo controle e no grupo frutose (Figuras 19 e 20).

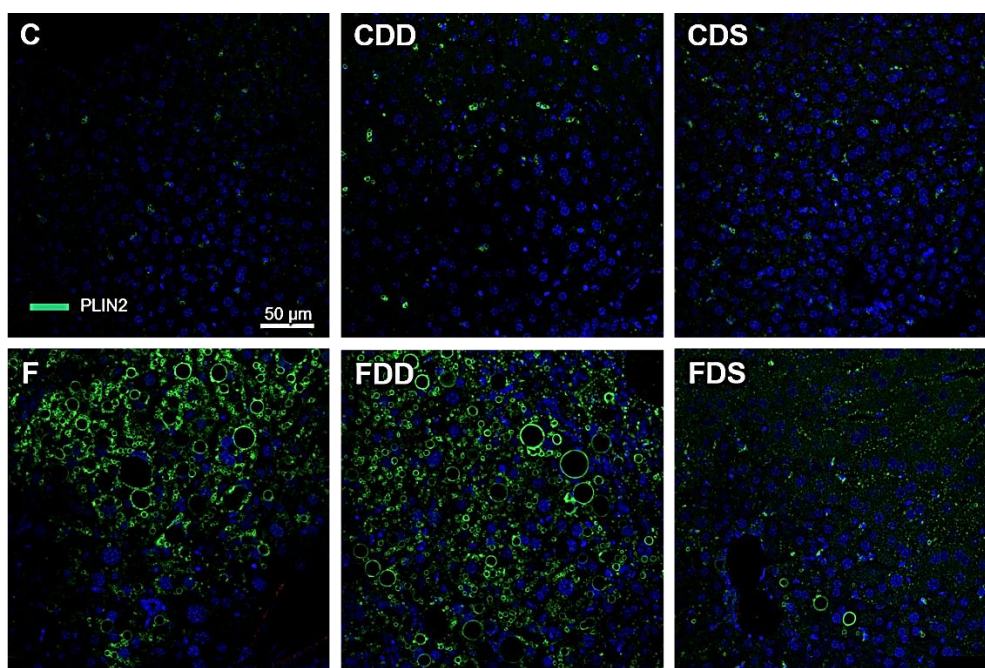
Figura 18. Esteatose hepática.



Legenda: **(A)** densidade de volume da esteatose hepática quantificada com estereologia; **(B)** seções representativas do fígado coradas com HE (mesma ampliação em todas as fotomicrografias). Os valores são a média $\pm$ DP (n=5 / grupo), Brown-Forsythe e Welch ANOVA e os testes de comparação múltipla T2 do Tamhane: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. A identificação dos grupos é indicada no canto superior esquerdo. A esteatose micro- (seta) e macrovesicular (seta aberta) foram identificadas na CDD, e a estrutura do fígado foi restaurada na CDS. Esteatose acentuada foi observada em F e FDD, e a estrutura do fígado foi renovada em FDS. Grupos: C, controle; DD, deficiência de vitamina D; DS, suplementação de vitamina D; F, frutose.

Fonte: A Autora, 2019

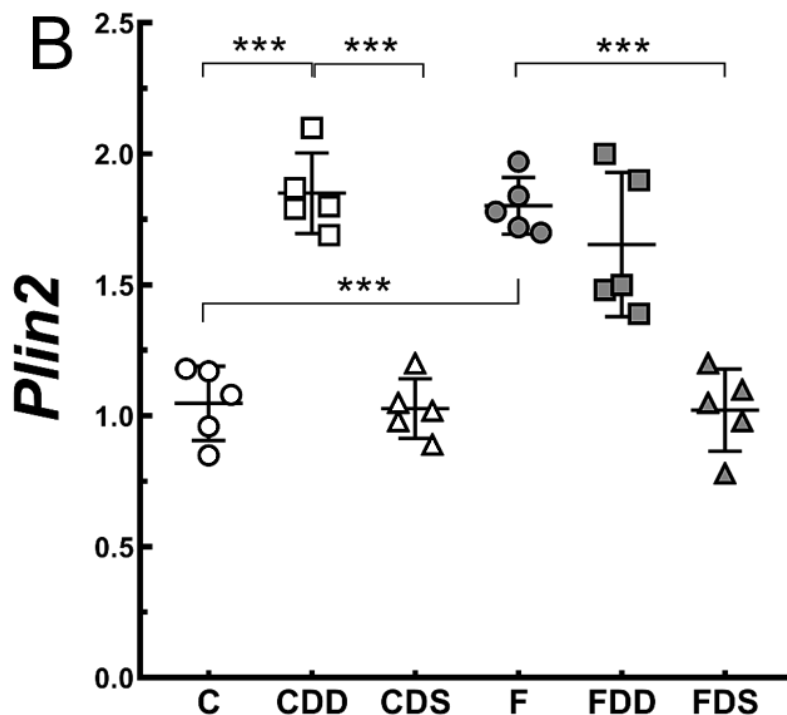
Figura 19. Imunofluorescência de Perilipina 2 (Plin2).



Legenda: Seções representativas do fígado preparadas para imunofluorescência com anti-Plin2 (microscopia a laser confocal de varredura verde para identificar uma proteína de revestimento de gotículas lipídicas citoplasmáticas constitutivamente associada, mesma ampliação em todas as fotomicrografias). A identificação dos grupos é indicada no canto superior esquerdo. Houve aumento da mancha de Plin2 no CDD e ainda mais pronunciado no F e no FDD. No CDS e no FDS, a estrutura do fígado foi restaurada. Grupos: C, controle; DD, deficiência de vitamina D; DS, suplementação de vitamina D; F, frutose.

Fonte: A Autora, 2019

Figura 20. Expressão gênica hepática de Perilipina 2 (Plin2).



Legenda: Os valores são a média $\pm$ DP (n=5 / grupo), Brown-Forsythe e Welch ANOVA e os testes de comparação múltipla T2 do Tamhane: * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001. Grupos: C, controle; DD, deficiência de vitamina D; DS, suplementação de vitamina D; F, frutose.

Fonte: A Autora, 2019

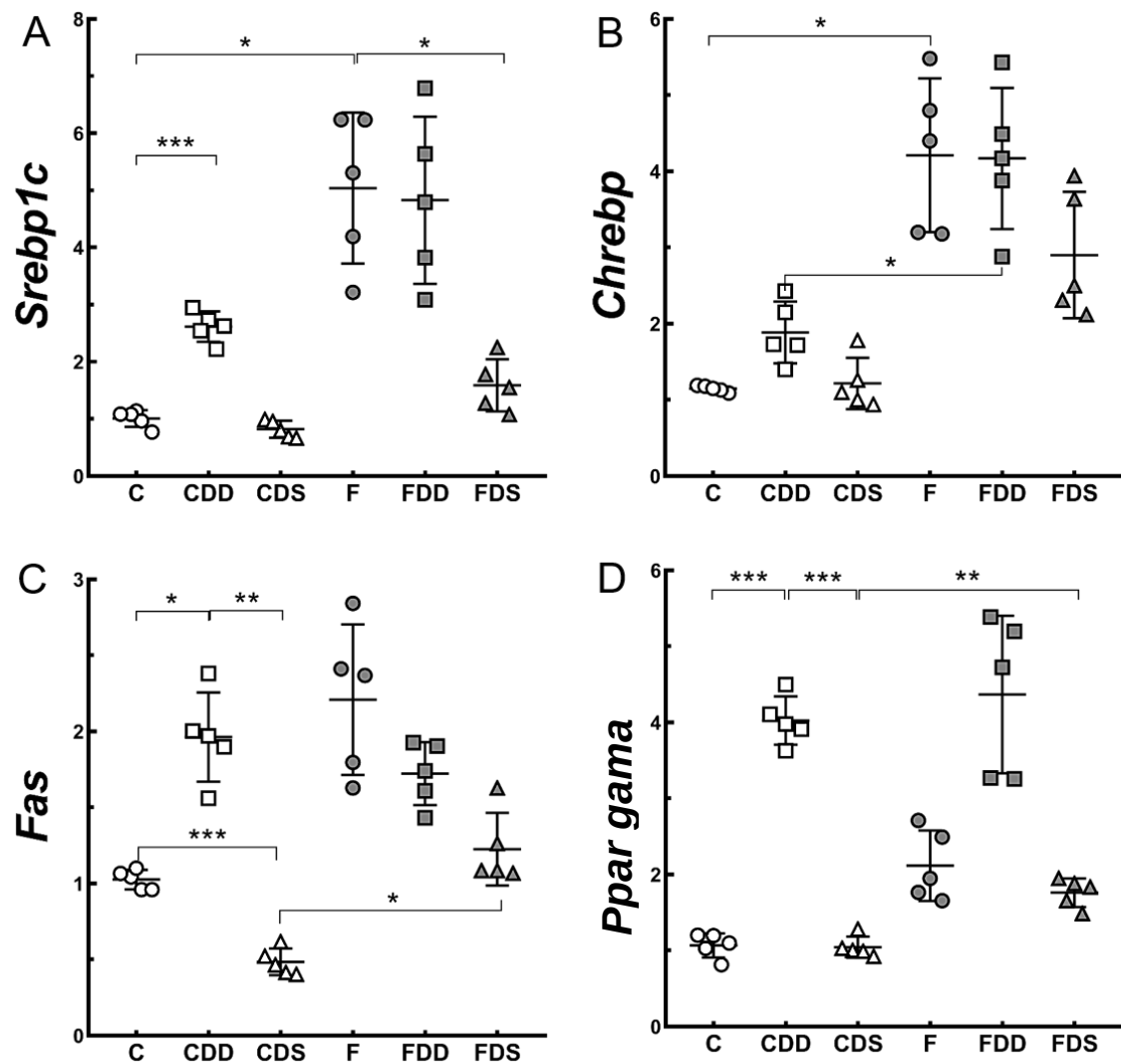
4.5 Expressão gênica (qPCR)

4.5.1 Lipogênese e beta oxidação

Analizamos a expressão de genes relacionados à lipogênese no fígado (Figura 21). Em geral, tanto a deficiência de vitamina D quanto a ingestão de frutose são insultos que elevam a expressão desses genes. No entanto, a suplementação de vitamina D pode diminuir o *Srebp1c*, *Fas* e *Ppar*, exceto *Chrebp* (que é mais influenciado pela ingestão de frutose). A expressão gênica de *Ppar alfa* está ligada à

beta oxidação (Figura 22A) e, como a lipogênese, foi aumentada pela deficiência de vitamina D e frutose, mas diminuiu pela suplementação de vitamina D.

Figura 21. Expressão gênica hepática.



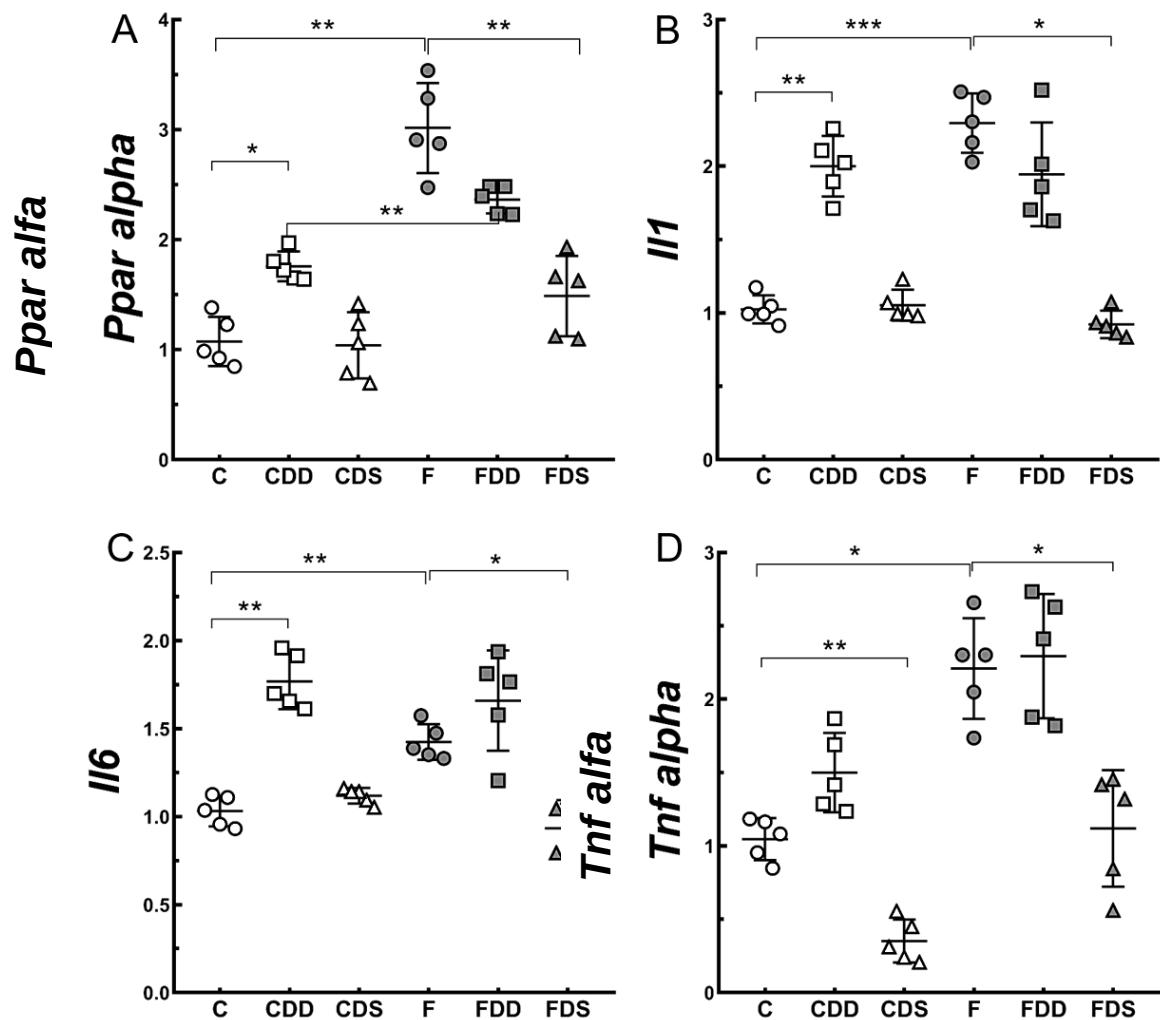
Legenda: **(A)** *Srebp1c*, fator de transcrição 1c de ligação ao elemento regulador de esterol; **(B)** *Chrebp*, proteína de ligação a elementos responsivos a carboidratos; **(C)** *Fas*, ácido graxo sintase; **(D)** *Ppar gamma*, gama peroxissomo-proliferador-ativador-receptor. Os valores são a média $\pm$ DP (n = 5 / grupo), Brown-Forsythe e Welch ANOVA e os testes de comparação múltipla T2 do Tamhane: * P <0,05; ** P <0,01; *** P <0,001. Grupos: C, controle; DD, deficiência de vitamina D; DS, suplementação de vitamina D; F, frutose.

Fonte: A Autora, 2019

4.5.2 Inflamação

Alguns genes pró-inflamatórios foram mais expressos devido à deficiência de vitamina D e à ingestão de frutose (*Il1* e *Il6*, Figura 22B-C), enquanto a *Tnf alfa* aumentou notavelmente devido à ingestão de frutose (Figura 22D). Em todos os casos, a suplementação de vitamina D teve um efeito benéfico na redução da expressão desses genes.

Figura 22. Expressão gênica hepática.



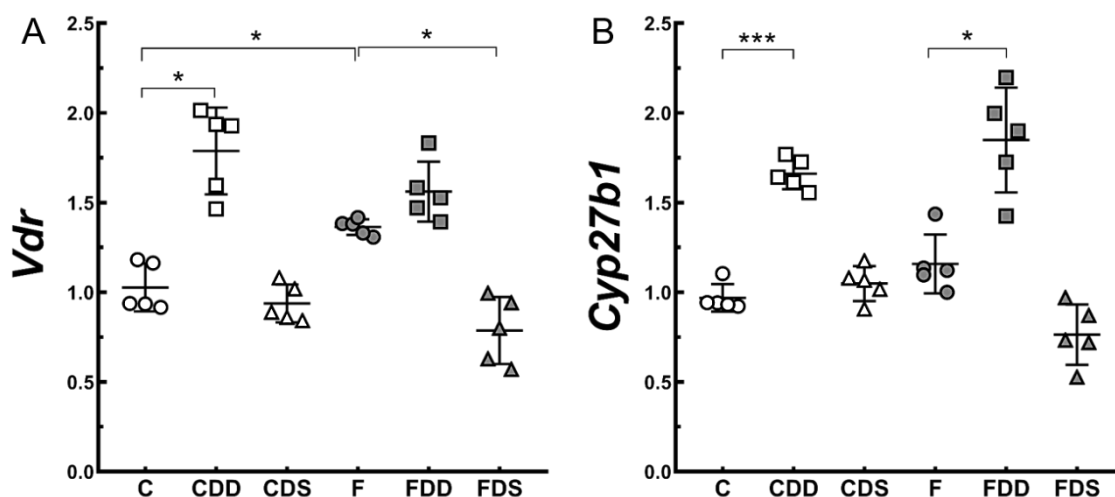
Legenda: **(A)** *Ppar alfa*, peroxissomo-proliferador-ativador-receptor alfa; **(B)** *Il1*, interleucina 1; **(C)** *Il6*, interleucina 6; **(D)** *Tnf alfa*, fator de necrose tumoral alfa. Os valores são a média $\pm$ DP (n = 5 / grupo), Brown-Forsythe e Welch ANOVA e os testes de comparação múltipla T2 do Tamhane: * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001. Grupos: C, controle; DD, deficiência de vitamina D; DS, suplementação de vitamina D; F, frutose.

Fonte: A Autora, 2019

4.5.3 Vitamina D

Confirmamos o estado de ativação da vitamina D medindo a expressão gênica de *Vdr* e *Cyp27b1*. Como esperado, a deficiência de vitamina D aumentou a expressão de *Vdr* (principalmente nos grupos controle, Figura 23A), mas reduziu a suplementação de vitamina D. O *Cyp27b1*, um ligante para *Vdr* que transforma 25(OH)D na forma hormonal 1,25(OH)2D, foi aprimorado nos grupos submetidos à deficiência de vitamina D (Figura 23B).

Figura 23. Expressão gênica hepática.



Legenda: **(A)** *Vdr*, receptor de vitamina D; **(B)** *Cyp27b1*, enzima de ativação de *Vdr*. Os valores são a média $\pm$ DP (n=5 / grupo), Brown-Forsythe e Welch ANOVA e os testes de comparação múltipla T2 do Tamhane: * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001. Grupos: C, controle; DD, deficiência de vitamina D; DS, suplementação de vitamina D; F, frutose.

Fonte: A Autora, 2019

4.6 Contribuição e interação da ingestão de frutose e vitamina D: ANOVA de dois fatores

A análise está resumida na Tabela 4. Estudamos três conjuntos de dados vinculados à biometria (sete análises), bioquímica (oito análises) e expressão gênica (onze genes).

a) Biometria

A vitamina D foi significativa na modificação de seis dos sete itens estudados (exceto ingestão de água) e frutose (exceto MC), correspondendo a 86% das análises. Frutose e vitamina D interagiram em cinco dos sete dados (71%), indicando uma forte influência desses dois fatores nos resultados.

b) Bioquímica

A frutose afetou todos os dados bioquímicos analisados (100%) e a vitamina D alterou sete dados (88%). Frutose e vitamina D interagiram em cinco dos oito dados (63%), indicando também uma forte influência desses dois fatores nos resultados.

c) Expressão gênica

A frutose foi responsável por alterar oito genes (73%), enquanto a vitamina D alterou todos os genes analisados (100%). Frutose e vitamina D interagiram modificando oito genes (73%), reforçando novamente a interpretação de que esses dois fatores podem afetar a expressão gênica nesse modelo.

Tabela 4. Análise de variância (ANOVA) de dois fatores: frutose ingerida vs. concentração de vitamina D.

ANOVA de dois fatores	% de variância e teste de significância					
	Interação		Frutose		Vitamina D	
	%	P	%	P	%	P
Biometria						
PAS	17,40	<0,0001	13,65	<0,0001	50,06	<0,0001
Massa Corporal	3,10	ns	2,17	ns	57,60	<0,0001
HOMA-IR	12,41	0,0096	13,78	0,0016	47,56	<0,0001
IA	5,91	0,0043	61,87	<0,0001	21,96	<0,0001
IH	1,96	ns	48,90	<0,0001	1,79	ns
QUICKi	33,14	<0,0001	10,47	0,0020	35,47	<0,0001
Esteatose	13,57	0,0484	20,32	0,0037	18,84	0,0179
Bioquímica						
25(OH)D	0,94	ns	1,74	0,0033	93,40	<0,0001
Adiponectina	12,02	ns	31,16	0,0009	4,14	ns
Insulina	36,63	<0,0001	21,87	<0,0001	41,40	<0,0001
Leptina	25,2	0,0017	16,68	0,0028	22,02	0,0033
TAG hepático	23,03	0,0023	19,04	0,0014	22,85	0,0024
TAG plasmático	6,52	ns	28,46	0,0010	16,69	0,0284
CT hepático	54,85	<0,0001	16,96	<0,0001	19,86	<0,0001
CT plasmático	18,93	0,0010	44,63	<0,0001	12,02	0,0082
Expressões Genicas						
<i>Chrebp</i>	4,70	ns	65,37	<0,0001	6,86	0,0440
<i>Cyp27b1</i>	7,31	0,0044	0,14	ns	79,76	<0,0001
<i>Fas</i>	21,85	<0,0001	19,48	<0,0001	44,13	<0,0001
<i>Il1</i>	30,72	<0,0001	9,74	<0,0001	50,11	<0,0001
<i>Il6</i>	13,65	0,0008	0,22	ns	68,32	<0,0001
<i>Plin 2</i>	26,37	<0,0001	5,57	0,0012	58,09	<0,0001
<i>Ppar alfa</i>	19,91	<0,0001	44,32	<0,0001	24,53	<0,0001
<i>Ppar gama</i>	1,06	ns	6,28	0,0007	82,70	<0,0001
<i>Srebp1c</i>	12,73	0,0009	39,01	<0,0001	32,21	<0,0001
<i>Tnf alfa</i>	1,52	ns	38,44	<0,0001	45,88	<0,0001
<i>Vdr</i>	10,62	0,0011	0,03	ns	75,55	<0,0001

Legenda: 25(OH)D, 25-Hidroxivitamina D; CT, Colesterol total; Cyp27b1, 1-alfa-hidroxilase; Fas, Ácidos graxos sintase; HOMA-IR, modelo de homeostase para avaliação da resistência à insulina; IA, ingestão alimentar; IH, ingestão hídrica; Il, Interleucina; PAS, pressão arterial sistólica; Plin, Perilipina; Ppar, Receptor ativador de proliferador de peroxissomo; QUICKi, verificação quantitativa do índice de sensibilidade à insulina; Srebp, Fator de transcrição de ligação ao elemento regulador de esterol; TAG, triacilglicerol; Tnf, fator de necrose tumoral; Vdr, veceptor de Vitamina D.

Fonte: A Autora, 2019

5 DISCUSSÃO

A vitamina D é depletada em roedores após algumas semanas de restrição alimentar, e também afetada quando os animais são alimentados com uma dieta rica em gordura (Borges *et al.*, 2016) ou com uma dieta rica em frutose (Douard *et al.*, 2014). O modelo murino tem sido usado para estudar os efeitos da deficiência de vitamina D (Borges *et al.*, 2018) e suplementação (Lee *et al.*, 2018), que podem ser consideradas translacionais para seres humanos (Bonnet *et al.*, 2019). Além disso, o fígado e o tecido adiposo são locais essenciais que concentram mais a vitamina D do que outros tecidos do corpo (Heaney *et al.*, 2009). Além disso, como demonstrado recentemente, o tecido adiposo é o local de armazenamento mais crítico para a vitamina D no organismo (Abbas, 2017). No presente estudo, após dez semanas de restrição alimentar, os níveis circulantes de 25(OH)D diminuíram significativamente em comparação com os animais que não se submeteram à restrição alimentar em vitamina D.

Os animais não apresentam diferença significativa na MC concordando com a literatura sobre deficiência de vitamina D, suplementação (Benetti *et al.*, 2018) e ingestão de frutose (Schultz *et al.*, 2013; Schultz *et al.*, 2015), embora a ingestão de água tenha sido maior nos grupos alimentados com a dieta de frutose, que podem estar ligados com a PAS alta detectada nesses animais. Além disso, ambos os insultos, frutose e deficiência de vitamina D, estão relacionados a um aumento da pressão arterial devido a um efeito direto no eixo renina-angiotensina-aldosterona (Sundersingh *et al.*, 2015).

No presente estudo, a deficiência de vitamina D afetou a tolerância e a sensibilidade à insulina, de acordo com um estudo recente (a suplementação de vitamina D pode restaurar a sinalização de insulina muscular prejudicada) (Benetti *et al.*, 2018) e nosso estudo anterior de animais obesos (Borges *et al.*, 2016). No entanto, outros não observaram um efeito da suplementação de vitamina D na glicemia de jejum, insulina, HOMA-IR, lipídios plasmáticos, enzimas hepáticas e MC (Tabrizi *et al.*, 2017). Nossos animais não mostraram diferença na concentração de adiponectina, o que é compatível com o MC normal que vimos, enquanto os níveis de leptina foram alterados com a deficiência de vitamina D.

A ingestão de frutose causa diminuição na sensibilidade à insulina e promove dislipidemia (Stanhope *et al.*, 2009), aumenta a lipogênese *de novo*, reduz as defesas antioxidantes e diminui a biogênese mitocondrial (Karise *et al.*, 2017). A frutose pode regular positivamente o Chrebp, aumentando o fluxo glicolítico, afetando a homeostase da glicose (Kim *et al.*, 2016) e levando à resistência à insulina e hiperinsulinemia, uma vez que a insulina ativa a transcrição e a ativação proteolítica de Srebp1c (Horton *et al.*, 2002) e Chrebp (Kim *et al.*, 2016). Em nossas descobertas, a suplementação de vitamina D poderia reduzir a gama Srebp1c, Fas e Ppar, enquanto o Chrebp estava conectado à frutose. Além disso, o Ppar alfa aumentou em animais com deficiência de vitamina D e alimentou uma dieta rica em frutose e diminuiu com a suplementação de vitamina D. Em outro estudo do nosso grupo, a combinação de deficiência de vitamina D e dieta rica em gordura causou um efeito aditivo fígado, com lipogênese aumentada e beta-oxidação reduzida (Borges *et al.*, 2018). No entanto, a suplementação de vitamina D em roedores pode atenuar a esteatose hepática, modulando o metabolismo lipídico através da regulação negativa do Srebp1c e de seus genes-alvo (Yin *et al.*, 2012).

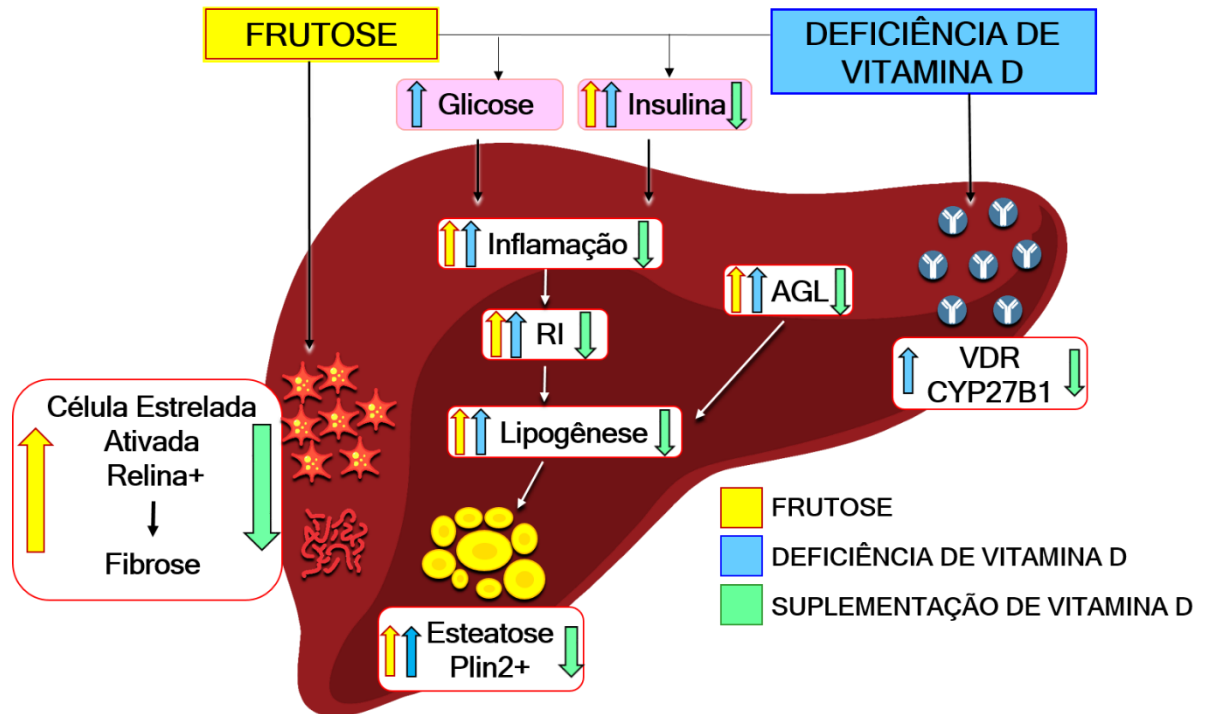
A associação entre os níveis de vitamina D e a DHGNA tem sido cada vez mais reconhecida (Kwok *et al.*, 2013). Aqui, demonstramos que o grupo controle com deficiência de vitamina D, o grupo frutose e o grupo frutose com deficiência de vitamina D melhoraram a esteatose no fígado. O Plin2 é candidato a um marcador molecular de acumulação lipídica prolongada, pois é uma proteína vital associada a gotículas lipídicas no fígado normal e esteatótico (Hoang *et al.*, 2018). Plin2 foi aumentado no grupo controle com deficiência de vitamina D e também no grupo frutose. A literatura recente relatou aumento do acúmulo de gotículas lipídicas nas fibras musculares devido à deficiência de vitamina D, enquanto sua suplementação evita o acúmulo lipídico e regula a expressão de Plin2 *in vivo* e *in vitro* (Li *et al.*, 2018).

Além disso, a deficiência de vitamina D pode aumentar a expressão de citocinas pró-inflamatórias, enquanto sua suplementação pode atenuar os efeitos adversos da obesidade induzida pela dieta e a inflamação associada (Chang e Kim, 2017; Wallbaum *et al.*, 2018). Além disso, combinada com o insulto pós-menopausa, a deficiência de vitamina D é um indutor de citocinas inflamatórias no fígado (Borges *et al.*, 2018). No presente estudo, embora a expressão dos genes Il1 e Il6 tenha aumentado nos grupos com deficiência de vitamina D e a expressão do gene Tnf

alfa tenha sido mais afetada pela ingestão de frutose, todos os grupos tiveram efeitos benéficos nessas expressões gênicas quando a vitamina D foi suplementado.

A fibrose hepática frequentemente acompanha todos os tipos de doenças hepáticas crônicas devido ao aumento substancial na síntese da matriz extracelular pela CEh, excedendo a capacidade de degradação hepática (Ding *et al.*, 2014). HSC, células hepáticas positivas para Relina (Kobold *et al.*, 2002), são a fonte primária de proteínas extracelulares durante a fibrogênese (Thompson *et al.*, 2015) e desempenham papéis críticos no desenvolvimento hepático com regeneração, regulação imune hepática e fibrogênese em resposta a lesão hepática (Ramachandran *et al.*, 2015). Quando ocorre fibrose hepática, as CEh no estado de repouso são ativadas (Atzori *et al.*, 2009). A frutose pode induzir esteatose hepática e, em seguida, fibrose hepática em *Macaca fascicularis* (Cydylo *et al.*, 2017). Além disso, a fibrose hepática pode ser modulada pela vitamina D (1,25-di-hidroxivitamina D) através da ligação ao seu receptor (Vdr), interrompendo muitas vias fibróticas (Wahsh *et al.*, 2016). Nossa observação da ativação do CHE, que ocorreu principalmente no grupo da frutose e no grupo da frutose com deficiência de vitamina D, é um resultado original essencial deste estudo, principalmente devido à suplementação de vitamina D que mostrou benefícios pela diminuição da fibrose intersticial no fígado.

Figura 24. Resumo gráfico do trabalho apresentado.



Legenda: CYP27B1, 1-alfa-hidroxilase, altera 25 (OH) D para 1,25 (OH) 2D e é o ligante do receptor de vitamina D; AGL, ácidos graxos livres; IR, resistência à insulina; Plin2, perilipina 2; VDR, receptor de vitamina D.

Fonte: A Autora, 2019.

CONCLUSÃO

Em conclusão, nosso estudo mostrou que os animais suplementados com vitamina D mantêm a níveis controles sua pressão sanguínea e melhoram a resistência à insulina. Além disso, nossa observação experimental demonstrou os efeitos adversos da deficiência de vitamina D no metabolismo, esteatose hepática e, combinada com a ingestão de frutose, fibrose intersticial hepática com ativação de células estreladas hepáticas e alteração da lipogênese, beta oxidação e inflamação hepática. Todos esses dados melhoraram quando a vitamina D foi suplementada nos animais.

REFERÊNCIAS

- Abaza NM, El-Mallah RM, Shaaban A, Mobasher SA, Al-Hassanein KF, Abdel Zaher AA et al. Vitamin D Deficiency in Egyptian Systemic Lupus Erythematosus Patients: How Prevalent and Does It Impact Disease Activity? *Integr Med Insights* 2016; 11: 27-33.
- Abbas MA. Physiological functions of Vitamin D in adipose tissue. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2017; 165: 369-381.
- Abel ED. Free fatty acid oxidation in insulin resistance and obesity. *Heart Metab* 2010; 48: 5-10.
- Adams LA, Angulo P, Lindor KD. Nonalcoholic fatty liver disease. *CMAJ* 2005; 172: 899-905.
- Afzal S, Nordestgaard BG. Vitamin D and Risk of Cardiovascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2017; 37: 1981-1982.
- Alloubani A, Akhu-Zaheya L, Samara R, Abdulhafiz I, Saleh A, Altowijri A. Relationship between Vitamin D Deficiency, Diabetes, and Obesity. *Diabetes Metab Syndr* 2019; 13: 1457-1461.
- Alwahsh SM, Gebhardt R. Dietary fructose as a risk factor for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Arch Toxicol* 2017; 91: 1545-1563.
- Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *Rev Gastroenterol Mex* 2005; 70 Suppl 3: 52-56.
- Atzori L, Poli G, Perra A. Hepatic stellate cell: a star cell in the liver. *Int J Biochem Cell Biol* 2009; 41: 1639-1642.
- Barchetta I. Could vitamin d supplementation benefit patients with chronic liver disease? *Gastroenterol Hepatol (N Y)* 2012; 8: 755-757.
- Barchetta I, Angelico F, Del Ben M, Baroni MG, Pozzilli P, Morini S et al. Strong association between non alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and low 25(OH) vitamin D levels in an adult population with normal serum liver enzymes. *BMC Med* 2011; 9: 85.
- Barchetta I, De Bernardinis M, Capoccia D, Baroni MG, Fontana M, Fraioli A et al. Hypovitaminosis D is independently associated with metabolic syndrome in obese patients. *PLoS One* 2013; 8: e68689.
- Bendik I, Friedel A, Roos FF, Weber P, Eggersdorfer M. Vitamin D: a critical and essential micronutrient for human health. *Front Physiol* 2014; 5: 248.

Benetti E, Mastrocola R, Chiazza F, Nigro D, D'Antona G, Bordano V et al. Effects of vitamin D on insulin resistance and myosteatosis in diet-induced obese mice. *PLoS One* 2018; 13: e0189707.

Berger J, Moller DE. The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med* 2002; 53: 409-435.

Berlanga A, Guiu-Jurado E, Porras JA, Auguet T. Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Exp Gastroenterol* 2014; 7: 221-239.

Bikle DD. Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications. *Chem Biol* 2014; 21: 319-329.

Bjelakovic G, Nikolova D, Bjelakovic M, Gluud C. Vitamin D supplementation for chronic liver diseases in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2017; 11: CD011564.

Bonnet L, Hachemi MA, Karkeni E, Couturier C, Astier J, Defoort C et al. Diet induced obesity modifies vitamin D metabolism and adipose tissue storage in mice. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2019; 185: 39-46.

Borges CC, Bringhenti I, Mandarin-de-Lacerda CA, Aguila MB. Vitamin D deficiency aggravates the liver metabolism and inflammation in ovariectomized mice. *Biomed Pharmacother* 2018; 107: 878-888.

Borges CC, Salles AF, Bringhenti I, Souza-Mello V, Mandarin-de-Lacerda CA, Aguila MB. Adverse effects of vitamin D deficiency on the Pi3k/Akt pathway and pancreatic islet morphology in diet-induced obese mice. *Mol Nutr Food Res* 2016; 60: 346-357.

Bouillon R. Comparative analysis of nutritional guidelines for vitamin D. *Nat Rev Endocrinol* 2017; 13: 466-479.

Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, van Etten E, Verstuyf A, Luderer HF et al. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocr Rev* 2008; 29: 726-776.

Buchs AE, Sasson S, Joost HG, Cerasi E. Characterization of GLUT5 domains responsible for fructose transport. *Endocrinology* 1998; 139: 827-831.

Carlberg C. Genome-wide (over)view on the actions of vitamin D. *Front Physiol* 2014; 5: 167.

Catta-Preta M, Mendonca LS, Fraulob-Aquino J, Aguila MB, Mandarin-de-Lacerda CA. A critical analysis of three quantitative methods of assessment of hepatic steatosis in liver biopsies. *Virchows Arch* 2011; 459: 477-485.

Cecchetti S, Tatar Z, Galan P, Pereira B, Lambert C, Mouterde G et al. Prevalence of vitamin D deficiency in rheumatoid arthritis and association with disease activity and cardiovascular risk factors: data from the COMEDRA study. *Clin Exp Rheumatol* 2016; 34: 984-990.

Censani M, Hammad HT, Christos PJ, Schumaker T. Vitamin D Deficiency Associated With Markers of Cardiovascular Disease in Children With Obesity. *Glob Pediatr Health* 2018; 5: 2333794X17751773.

Chang E, Kim Y. Vitamin D Insufficiency Exacerbates Adipose Tissue Macrophage Infiltration and Decreases AMPK/SIRT1 Activity in Obese Rats. *Nutrients* 2017; 9.

Chen Z, Yu R, Xiong Y, Du F, Zhu S. A vicious circle between insulin resistance and inflammation in nonalcoholic fatty liver disease. *Lipids Health Dis* 2017; 16: 203.

Christakos S, Lieben L, Masuyama R, Carmeliet G. Vitamin D endocrine system and the intestine. *Bonekey Rep* 2014; 3: 496.

Chung M, Ma J, Patel K, Berger S, Lau J, Lichtenstein AH. Fructose, high-fructose corn syrup, sucrose, and nonalcoholic fatty liver disease or indexes of liver health: a systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 2014; 100: 833-849.

Cydylo MA, Davis AT, Kavanagh K. Fatty liver promotes fibrosis in monkeys consuming high fructose. *Obesity (Silver Spring)* 2017; 25: 290-293.

Dana N, Vaseghi G, Haghjooy Javanmard S. Crosstalk between Peroxisome Proliferator-Activated Receptors and Toll-Like Receptors: A Systematic Review. *Adv Pharm Bull* 2019; 9: 12-21.

Diao L, Auger C, Konoeda H, Sadri AR, Amini-Nik S, Jeschke MG. Hepatic steatosis associated with decreased beta-oxidation and mitochondrial function contributes to cell damage in obese mice after thermal injury. *Cell Death Dis* 2018; 9: 530.

Ding BS, Cao Z, Lis R, Nolan DJ, Guo P, Simons M et al. Divergent angiocrine signals from vascular niche balance liver regeneration and fibrosis. *Nature* 2014; 505: 97-102.

Douard V, Asgerally A, Sabbagh Y, Sugiura S, Shapses SA, Casirola D et al. Dietary fructose inhibits intestinal calcium absorption and induces vitamin D insufficiency in CKD. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21: 261-271.

Douard V, Patel C, Lee J, Tharabenjasin P, Williams E, Fritton JC et al. Chronic high fructose intake reduces serum 1,25 (OH)₂D₃ levels in calcium-sufficient rodents. *PLoS One* 2014; 9: e93611.

Ebrahimpour-Koujan S, Sohrabpour AA, Foroughi F, Alvandi E, Esmailzadeh A. Effects of vitamin D supplementation on liver fibrogenic factors in non-alcoholic fatty liver patients with steatohepatitis: study protocol for a randomized clinical trial. *Trials* 2019; 20: 153.

Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet* 2005; 365: 1415-1428.

Eliades M, Spyrou E. Vitamin D: a new player in non-alcoholic fatty liver disease? *World J Gastroenterol* 2015; 21: 1718-1727.

Faridi KF, Lupton JR, Martin SS, Banach M, Quispe R, Kulkarni K et al. Vitamin D deficiency and non-lipid biomarkers of cardiovascular risk. *Arch Med Sci* 2017; 13: 732-737.

Ferraris RP, Choe JY, Patel CR. Intestinal Absorption of Fructose. *Annu Rev Nutr* 2018; 38: 41-67.

Ferreira CES, Maeda SS, Batista MC, Lazaretti-Castro M, Vasconcellos LS, Madeira M et al. Consensus - reference ranges of vitamin D [25(OH)D] from the Brazilian medical societies. Brazilian Society of Clinical Pathology/Laboratory Medicine (SBPC/ML) and Brazilian Society of Endocrinology and Metabolism (SBEM). *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 2017; 53: 377-381.

Fleet JC, Gliniak C, Zhang Z, Xue Y, Smith KB, McCreedy R et al. Serum metabolite profiles and target tissue gene expression define the effect of cholecalciferol intake on calcium metabolism in rats and mice. *J Nutr* 2008; 138: 1114-1120.

Francey C, Cros J, Rosset R, Creze C, Rey V, Stefanoni N et al. The extra-splanchnic fructose escape after ingestion of a fructose-glucose drink: An exploratory study in healthy humans using a dual fructose isotope method. *Clin Nutr ESPEN* 2019; 29: 125-132.

Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* 2008; 134: 1655-1669.

Gambino R, Bugianesi E, Rosso C, Mezzabotta L, Pinach S, Alemanno N et al. Different Serum Free Fatty Acid Profiles in NAFLD Subjects and Healthy Controls after Oral Fat Load. *Int J Mol Sci* 2016; 17: 479.

Gericke B, Schecker N, Amiri M, Naim HY. Structure-function analysis of human sucrase-isomaltase identifies key residues required for catalytic activity. *J Biol Chem* 2017; 292: 11070-11078.

Grygiel-Gorniak B. Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications--a review. *Nutr J* 2014; 13: 17.

Gupta G, Khadem F, Uzonna JE. Role of hepatic stellate cell (HSC)-derived cytokines in hepatic inflammation and immunity. *Cytokine* 2018; (em impressão, doi: 10.1016/j.cyto.2018.09.004).

Halfon M, Phan O, Teta D. Vitamin D: A Review on Its Effects on Muscle Strength, the Risk of Fall, and Frailty. *Biomed Res Int* 2015; 2015: 953241.

Hamilton B. Vitamin D and human skeletal muscle. *Scand J Med Sci Sports* 2010; 20: 182-190.

Hannou SA, Haslam DE, McKeown NM, Herman MA. Fructose metabolism and metabolic disease. *J Clin Invest* 2018; 128: 545-555.

Heaney RP. Functional indices of vitamin D status and ramifications of vitamin D deficiency. *Am J Clin Nutr* 2004; 80: 1706S-1709S.

Heaney RP, Horst RL, Cullen DM, Armas LA. Vitamin D3 distribution and status in the body. *J Am Coll Nutr* 2009; 28: 252-256.

Herman MA, Samuel VT. The Sweet Path to Metabolic Demise: Fructose and Lipid Synthesis. *Trends Endocrinol Metab* 2016; 27: 719-730.

Hewison M, Zehnder D, Bland R, Stewart PM. 1 α -Hydroxylase and the action of vitamin D. *J Mol Endocrinol* 2000; 25: 141-148.

Hoan NX, Tong HV, Song LH, Meyer CG, Velavan TP. Vitamin D deficiency and hepatitis viruses-associated liver diseases: A literature review. *World J Gastroenterol* 2018; 24: 445-460.

Hoang NA, Richter F, Schubert M, Lorkowski S, Klotz LO, Steinbrenner H. Differential capability of metabolic substrates to promote hepatocellular lipid accumulation. *Eur J Nutr* 2018; (em impressão, doi: 10.1007/s00394-018-1847-2).

Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007; 357: 266-281.

Holick MF. The vitamin D deficiency pandemic and consequences for nonskeletal health: mechanisms of action. *Mol Aspects Med* 2008; 29: 361-368.

Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest* 2002; 109: 1125-1131.

Hosseini-nezhad A, Holick MF. Vitamin D for health: a global perspective. *Mayo Clin Proc* 2013; 88: 720-755.

Institute of Medicine (U.S.). Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes. *Dietary reference intakes : for calcium, phosphorus, magnesium, vitamin D, and fluoride*. Washington, D.C.: National Academy Press, 1997: xv, 432 p. p.

Jang C, Hui S, Lu W, Cowan AJ, Morscher RJ, Lee G et al. The Small Intestine Converts Dietary Fructose into Glucose and Organic Acids. *Cell Metab* 2018; 27: 351-361 e353.

Johnson RJ, Sanchez-Lozada LG, Andrews P, Lanaspa MA. Perspective: A Historical and Scientific Perspective of Sugar and Its Relation with Obesity and Diabetes. *Adv Nutr* 2017; 8: 412-422.

Karaahmet OZ, Unlu E, Karaahmet F, Gurcay E, Cakci A. Myopathy related to vitamin D deficiency in patient with celiac disease. *Muscle Nerve* 2014; 50: 147-148.

Karise I, Ornellas F, Barbosa-da-Silva S, Matsuura C, Del Sol M, Aguila MB et al. Liver and Metformin: Lessons of a fructose diet in mice. *Biochim Open* 2017; 4: 19-30.

Katz A, Nambi SS, Mather K, Baron AD, Follmann DA, Sullivan G et al. Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for

assessing insulin sensitivity in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 2402-2410.

Keeney JT, Butterfield DA. Vitamin D deficiency and Alzheimer disease: Common links. *Neurobiol Dis* 2015; 84: 84-98.

Kennel KA, Drake MT, Hurley DL. Vitamin D deficiency in adults: when to test and how to treat. *Mayo Clin Proc* 2010; 85: 752-757; quiz 757-758.

Kheiri B, Abdalla A, Osman M, Ahmed S, Hassan M, Bachuwa G. Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular diseases: a narrative review. *Clin Hypertens* 2018; 24: 9.

Khundmiri SJ, Murray RD, Lederer E. PTH and Vitamin D. *Compr Physiol* 2016; 6: 561-601.

Kim HS, Rotundo L, Kothari N, Kim SH, Pyrsopoulos N. Vitamin D Is Associated with Severity and Mortality of Non-alcoholic Fatty Liver Disease: A US Population-based Study. *J Clin Transl Hepatol* 2017; 5: 185-192.

Kim MS, Krawczyk SA, Doridot L, Fowler AJ, Wang JX, Trauger SA et al. ChREBP regulates fructose-induced glucose production independently of insulin signaling. *J Clin Invest* 2016; 126: 4372-4386.

Kobold D, Grundmann A, Piscaglia F, Eisenbach C, Neubauer K, Steffgen J et al. Expression of reelin in hepatic stellate cells and during hepatic tissue repair: a novel marker for the differentiation of HSC from other liver myofibroblasts. *J Hepatol* 2002; 36: 607-613.

Kongsbak M, Levring TB, Geisler C, von Essen MR. The vitamin d receptor and T cell function. *Front Immunol* 2013; 4: 148.

Kwok RM, Torres DM, Harrison SA. Vitamin D and nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD): is it more than just an association? *Hepatology* 2013; 58: 1166-1174.

Lee GY, Park CY, Cha KS, Lee SE, Pae M, Han SN. Differential effect of dietary vitamin D supplementation on natural killer cell activity in lean and obese mice. *J Nutr Biochem* 2018; 55: 178-184.

Li J, Mihalcioiu M, Li L, Zakikhani M, Camirand A, Kremer R. Vitamin D prevents lipid accumulation in murine muscle through regulation of PPARgamma and perilipin-2 expression. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2018; 177: 116-124.

Li SB, Jia YJ. [Interactions between ECM and HSC cells in hepatic fibrosis]. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan* 2014; 45: 462-464.

Libby AE, Bales E, Orlicky DJ, McManaman JL. Perilipin-2 Deletion Impairs Hepatic Lipid Accumulation by Interfering with Sterol Regulatory Element-binding Protein (SREBP) Activation and Altering the Hepatic Lipidome. *J Biol Chem* 2016; 291: 24231-24246.

Liu C, Li H. Correlation of the severity of chronic kidney disease with serum inflammation, osteoporosis and vitamin D deficiency. *Exp Ther Med* 2019; 17: 368-372.

Macdonald IA. A review of recent evidence relating to sugars, insulin resistance and diabetes. *Eur J Nutr* 2016; 55: 17-23.

Maeda SS, Borba VZ, Camargo MB, Silva DM, Borges JL, Bandeira F et al. Recommendations of the Brazilian Society of Endocrinology and Metabology (SBEM) for the diagnosis and treatment of hypovitaminosis D. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2014; 58: 411-433.

Malik VS, Pan A, Willett WC, Hu FB. Sugar-sweetened beverages and weight gain in children and adults: a systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 2013; 98: 1084-1102.

Mandarim-de-Lacerda CA, Del Sol M. Tips for studies with quantitative morphology (morphometry and stereology). *Int J Morphol* 2017; 35: 1482-1494.

Mansour-Ghanaei F, Pourmasoumi M, Hadi A, Ramezani-Jolfaie N, Joukar F. The Efficacy of Vitamin D Supplementation against Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Meta-Analysis. *J Diet Suppl* 2019; (em impressão, doi: 10.1080/19390211.2019.1624671): 1-19.

Mansouri M, Miri A, Varmaghani M, Abbasi R, Taha P, Ramezani S et al. Vitamin D deficiency in relation to general and abdominal obesity among high educated adults. *Eat Weight Disord* 2019; 24: 83-90.

Marinho TS, Kawasaki A, Bryntesson M, Souza-Mello V, Barbosa-da-Silva S, Aguila MB et al. Rosuvastatin limits the activation of hepatic stellate cells in diet-induced obese mice. *Hepatol Res* 2017; 47: 928-940.

Marino R, Misra M. Extra-Skeletal Effects of Vitamin D. *Nutrients* 2019; 11.

Marques C. Fructose consumption and its impact on human health: Diet and risk of cardiovascular disease. *Rev Port Cardiol* 2017; 36: 943-944.

Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28: 412-419.

Mendrick DL, Diehl AM, Topor LS, Dietert RR, Will Y, La Merrill MA et al. Metabolic Syndrome and Associated Diseases: From the Bench to the Clinic. *Toxicol Sci* 2018; 162: 36-42.

Mortera RR, Bains Y, Gugliucci A. Fructose at the crossroads of the metabolic syndrome and obesity epidemics. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2019; 24: 186-211.

Nakhl S, Sleilaty G, El Samad S, Saliba Y, Chahine R, Fares N. Association between vitamin D deficiency and lipid and non-lipid markers of cardiovascular diseases in the middle east region. *Eur J Clin Nutr* 2019; 73: 850-858.

Navarro-Trivino FJ, Arias-Santiago S, Gilaberte-Calzada Y. Vitamin D and the Skin: A Review for Dermatologists. *Actas Dermosifiliogr* 2019; 110: 262-272.

Norman AW, Bouillon R. Vitamin D nutritional policy needs a vision for the future. *Exp Biol Med (Maywood)* 2010; 235: 1034-1045.

Nouri-Vaskeh M, Sadeghifard S, Saleh P, Farhadi J, Amraii M, Ansarin K. Vitamin D Deficiency among Patients with Tuberculosis: a Cross-Sectional Study in Iranian-Azari Population. *Tanaffos* 2019; 18: 11-17.

Ong MW, Tan CH, Cheng AKS. Prevalence and Determinants of Vitamin D Deficiency Among the Overweight and Obese Singaporeans Seeking Weight Management Including Bariatric Surgery: a Relationship with Bone Health. *Obes Surg* 2018; 28: 2305-2312.

Parfieniuk-Kowerda A, Swiderska M, Rogalska M, Maciaszek M, Jaroszewicz J, Flisiak R. Chronic hepatitis B virus infection is associated with decreased serum 25(OH)D concentration in non-cirrhotic patients. *Clin Exp Hepatol* 2019; 5: 75-80.

Perman JA. Digestion and absorption of fruit juice carbohydrates. *J Am Coll Nutr* 1996; 15: 12S-17S.

Pike JW, Christakos S. Biology and Mechanisms of Action of the Vitamin D Hormone. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2017; 46: 815-843.

Plesner JL, Dahl M, Fonvig CE, Nielsen TRH, Kloppenborg JT, Pedersen O et al. Obesity is associated with vitamin D deficiency in Danish children and adolescents. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2018; 31: 53-61.

Polyzos SA, Kountouras J, Zavos C. Nonalcoholic fatty liver disease: the pathogenetic roles of insulin resistance and adipocytokines. *Curr Mol Med* 2009; 9: 299-314.

Port AM, Ruth MR, Istfan NW. Fructose consumption and cancer: is there a connection? *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2012; 19: 367-374.

Pramono A, Jocken JWE, Essers YPG, Goossens GH, Blaak EE. Vitamin D and Tissue-Specific Insulin Sensitivity in Humans With Overweight/Obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2019; 104: 49-56.

Prasad P, Kochhar A. Interplay of vitamin D and metabolic syndrome: A review. *Diabetes Metab Syndr* 2015; (em impressão, doi: 10.1016/j.dsx.2015.02.014).

Premaor MO, Furlanetto TW. [Vitamin D deficiency in adults: to better understand a new presentation of an old disease]. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2006; 50: 25-37.

Qi X, Tester RF. Fructose, galactose and glucose - In health and disease. *Clin Nutr ESPEN* 2019; 33: 18-28.

Ramachandran P, Iredale JP, Fallowfield JA. Resolution of liver fibrosis: basic mechanisms and clinical relevance. *Semin Liver Dis* 2015; 35: 119-131.

- Rao MS, Papreddy K, Musunuri S, Okonkwo A. Prevention/reversal of choline deficiency-induced steatohepatitis by a peroxisome proliferator-activated receptor alpha ligand in rats. *In Vivo* 2002; 16: 145-152.
- Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. 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* 1993; 123: 1939-1951.
- Rosina KTC, Menna Barreto APM, Pontes KSS, Martins CJM, Souza E, Bregman R et al. Vitamin D status in renal transplant recipients living in a low-latitude city: association with body fat, cardiovascular risk factors, estimated glomerular filtration rate and proteinuria. *Br J Nutr* 2017; 117: 1279-1290.
- Sakakura Y, Shimano H, Sone H, Takahashi A, Inoue N, Toyoshima H et al. Sterol regulatory element-binding proteins induce an entire pathway of cholesterol synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 286: 176-183.
- Salas NM, Luo L, Harkins MS. Vitamin D deficiency and adult asthma exacerbations. *J Asthma* 2014; 51: 950-955.
- Samji NS, Verma R, Satapathy SK. Magnitude of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Western Perspective. *J Clin Exp Hepatol* 2019; 9: 497-505.
- Schultz A, Barbosa-da-Silva S, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Differences and similarities in hepatic lipogenesis, gluconeogenesis and oxidative imbalance in mice fed diets rich in fructose or sucrose. *Food Funct* 2015; 6: 1684-1691.
- Schultz A, Neil D, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Hepatic adverse effects of fructose consumption independent of overweight/obesity. *Int J Mol Sci* 2013; 14: 21873-21886.
- Sertznig P, Seifert M, Tilgen W, Reichrath J. Present concepts and future outlook: function of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) for pathogenesis, progression, and therapy of cancer. *J Cell Physiol* 2007; 212: 1-12.
- Sinha A, Cheetham TD, Pearce SH. Prevention and treatment of vitamin D deficiency. *Calcif Tissue Int* 2013; 92: 207-215.
- Skaaby T, Thuesen BH, Linneberg A. Vitamin D, Cardiovascular Disease and Risk Factors. *Adv Exp Med Biol* 2017; 996: 221-230.
- Softic S, Cohen DE, Kahn CR. Role of Dietary Fructose and Hepatic De Novo Lipogenesis in Fatty Liver Disease. *Dig Dis Sci* 2016; 61: 1282-1293.
- Solis-Herruzo JA, de la Torre P, Munoz-Yague MT. Hepatic stellate cells (HSC): architects of hepatic fibrosis. *Rev Esp Enferm Dig* 2003; 95: 438-439, 436-437.
- Stanhope KL, Schwarz JM, Keim NL, Griffen SC, Bremer AA, Graham JL et al. Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. *J Clin Invest* 2009; 119: 1322-1334.

Sundersingh F, Plum LA, DeLuca HF. Vitamin D deficiency independent of hypocalcemia elevates blood pressure in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; 461: 589-591.

Sung CC, Liao MT, Lu KC, Wu CC. Role of vitamin D in insulin resistance. *J Biomed Biotechnol* 2012; 2012: 634195.

Szabo D, Hosszu E, Arato A, Muller KE, Beres N, Lakatos PL et al. Seasonal variability of vitamin D and bone metabolism in infliximab-treated paediatric Crohn's disease. *Dig Liver Dis* 2015; (em impressão, doi: 10.1016/j.dld.2015.05.006).

Tabrizi R, Moosazadeh M, Lankarani KB, Akbari M, Heydari ST, Kolaheidoz F et al. The effects of vitamin D supplementation on metabolic profiles and liver function in patients with non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Diabetes Metab Syndr* 2017; 11 Suppl 2: S975-S982.

Tai MM. A mathematical model for the determination of total area under glucose tolerance and other metabolic curves. *Diabetes Care* 1994; 17: 152-154.

Tappy L. Fructose-containing caloric sweeteners as a cause of obesity and metabolic disorders. *J Exp Biol* 2018; 221.

Targher G, Bertolini L, Scala L, Cigolini M, Zenari L, Falezza G et al. Associations between serum 25-hydroxyvitamin D₃ concentrations and liver histology in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 2007; 17: 517-524.

Taskinen MR, Packard CJ, Boren J. Dietary Fructose and the Metabolic Syndrome. *Nutrients* 2019; 11.

Taskinen MR, Soderlund S, Bogl LH, Hakkarainen A, Matikainen N, Pietilainen KH et al. Adverse effects of fructose on cardiometabolic risk factors and hepatic lipid metabolism in subjects with abdominal obesity. *J Intern Med* 2017; 282: 187-201.

Taylor SN, Wagner CL, Hollis BW. Vitamin D supplementation during lactation to support infant and mother. *J Am Coll Nutr* 2008; 27: 690-701.

Teff KL, Grudziak J, Townsend RR, Dunn TN, Grant RW, Adams SH et al. Endocrine and metabolic effects of consuming fructose- and glucose-sweetened beverages with meals in obese men and women: influence of insulin resistance on plasma triglyceride responses. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94: 1562-1569.

Thompson AI, Conroy KP, Henderson NC. Hepatic stellate cells: central modulators of hepatic carcinogenesis. *BMC Gastroenterol* 2015; 15: 63.

Tilg H, Moschen AR, Szabo G. Interleukin-1 and inflammasomes in alcoholic liver disease/acute alcoholic hepatitis and nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2016; 64: 955-965.

Tschanz SA, Burri PH, Weibel ER. A simple tool for stereological assessment of digital images: the STEPanizer. *J Microsc* 2011; 243: 47-59.

Uriol M. 2019. *Parathyroid hormone. When and how to measure it. Determination of the parathyroid hormone. Current guidelines recommendations*. In. p 68-79.

Wacker M, Holick MF. Sunlight and Vitamin D: A global perspective for health. *Dermatoendocrinol* 2013; 5: 51-108.

Wahsh E, Abu-Elsaad N, El-Karef A, Ibrahim T. The vitamin D receptor agonist, calcipotriol, modulates fibrogenic pathways mitigating liver fibrosis in-vivo: An experimental study. *Eur J Pharmacol* 2016; 789: 362-369.

Wake K. "Sternzellen" in the liver: perisinusoidal cells with special reference to storage of vitamin A. *Am J Anat* 1971; 132: 429-462.

Wallbaum P, Rohde S, Ehlers L, Lange F, Hohn A, Bergner C et al. Antifibrogenic effects of vitamin D derivatives on mouse pancreatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2018; 24: 170-178.

Walters MR. Newly identified actions of the vitamin D endocrine system. *Endocr Rev* 1992; 13: 719-764.

Weng S, Sprague JE, Oh J, Riek AE, Chin K, Garcia M et al. Vitamin D deficiency induces high blood pressure and accelerates atherosclerosis in mice. *PLoS One* 2013; 8: e54625.

Yin Y, Yu Z, Xia M, Luo X, Lu X, Ling W. Vitamin D attenuates high fat diet-induced hepatic steatosis in rats by modulating lipid metabolism. *Eur J Clin Invest* 2012; 42: 1189-1196.

Yodoshi T, Orkin S, Arce-Clachar AC, Bramlage K, Liu C, Fei L et al. Vitamin D deficiency: prevalence and association with liver disease severity in pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *Eur J Clin Nutr* 2019; (em impressão, doi: 10.1038/s41430-019-0493-y).

Zeeb H, Greinert R. The role of vitamin D in cancer prevention: does UV protection conflict with the need to raise low levels of vitamin D? *Dtsch Arztebl Int* 2010; 107: 638-643.

ANEXO A – Comitê de Ética



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO
DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA)



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Vitamina D: Restrição e suplementação em camundongos alimentados com dieta rica em frutose", registrada com o nº 31/2016, sob a responsabilidade de Carlos Alberto Mandarin de Lacerda - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA) do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ, em reunião de 26/07/2016.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	26/07/2020
Espécie/linhagem/raça	Camundongos C57BL/6
Nº de animais	50
Peso/Idade	0,25 g / 90 dias
Sexo	Macho
Origem	Biotério setorial

Rio de Janeiro, 26 de Julho de 2016.

Prof. Dr. Alex C. Manhães
Coordenador
CEUA/IBRAG/UERJ

Prof. Dra. Patricia C. Lisboa
Vice-Coordenadora
CEUA/IBRAG/UERJ

ANEXO B – Artigo final publicado

Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 192 (2019) 105399



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology

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

The deficiency and the supplementation of vitamin D and liver: Lessons of chronic fructose-rich diet in mice

Thais C. Maia-Ceciliano, Rafaela R. Dutra, Marcia B. Aguilu, Carlos A. Mandarim-De-Lacerda^{a,*}

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

ARTICLE INFO

Keywords:

Vitamin D
Liver steatosis
Plin2
Liver fibrosis
Hepatic stellate cells
Insulin resistance

ABSTRACT

The fructose added to soft drinks and processed food, as well as frequent detection of vitamin D deficiency in the body, are two insults increasingly considered to cause lesions in target organs. We studied the liver after a chronic high-fructose diet deficient and supplemented with vitamin D. Sixty C57BL/6 mature male mice were allocated into six groups ($n = 10$) for ten weeks: control (C), control deficient in vitamin D (CDD), control supplemented with vitamin D (CDS), fructose (F), fructose deficient in vitamin D (FDD), and fructose supplemented with vitamin D (FDS). The gene expressions of vitamin D receptor and CYP27B1 and 25 hydroxyvitamin D plasma level ensured that the diets caused vitamin D deficiency or supplementation. Body mass did not change, but blood pressure (BP) increased in CDD, F, and FDD, whereas BP was controlled in FDS. Insulinemia, insulin tolerance and resistance were seen in both vitamin D deficiency and fructose groups but improved with vitamin D supplementation. The steatosis and fibrosis were observed in the CDD, F and FDD groups. Also, F and FDD showed activation of stellate cells (HSC). Lipogenesis and inflammation gene expressions were enhanced in the CDD, F and FDD groups, but diminished with vitamin D supplementation. In conclusion, we demonstrated the adverse effects of vitamin D deficiency on metabolism, liver steatosis and, combined with fructose intake, liver interstitial fibrosis with hepatic stellate cell activation, and alteration of the lipogenesis, beta-oxidation, and liver inflammation. All these data improved when vitamin D was supplemented in the animals.

1. Introduction

Fructose, a monosaccharide common in fruits and vegetables, is added to sweeten food and beverages. It is the industrial, not fruit fructose intake that induces metabolic disorders and increased risk of insulin resistance/diabetes [1]. Fructose has a high lipogenic power [2] without significantly affecting adipose tissue mass [3] but enhancing the start and progression of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) [4] and cardiometabolic alterations [5]. Fructose has become ubiquitous in our food supply, with the highest consumers being teens and young adults [6].

Vitamin D primarily regulates the homeostasis of calcium and phosphorus and is acquired by eating foods such as fatty fish and eggs, and chiefly by cutaneous synthesis through exposure to ultraviolet rays type B. The CYP27B1, the key 1 α -hydroxylase that changes 25 hydroxyvitamin D (25 (OH) D) to the hormonal form 1,25-di-hydroxyvitamin D (1,25 (OH) $2D$), is the ligand for the vitamin D receptor (VDR) [7]. The target genes regulated by vitamin D might control a crowd of biological activities such as the immune system, skin and muscle function, cellular growth, and other biological processes [8].

Although the association between vitamin D deficiency and body mass accumulation is still a matter of debate [9], recent reports re-

Abbreviations: 125 (OH) D, 1,25-di-hydroxyvitamin D; 25 (OH) D, 25-hydroxyvitamin D; AUC, area under the curve; BM, body mass; BP, blood pressure; Chrebp, carbohydrate-responsive element-binding protein; CYP27B1, 1- α -hydroxylase; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; Fas, fatty acid synthase; FFA, free fatty acids; HE, hematoxylin and eosin; HOMA, homeostatic model assessment; HSC, hepatic stellate cells; IL, interleukin; IR, insulin resistance; NAFLD, nonalcoholic fatty liver disease; Plin, perilipin; Ppar, peroxisome-proliferator-activator-receptor; qPCR, real-time polymerase chain reaction; QUICKI, quantitative insulin-sensitivity check index; Srebp, sterol regulatory element-binding transcription factor; TAG, triacylglycerol; TC, total cholesterol; Tnf, tumor necrosis factor; VDR, vitamin D receptor

* Corresponding author at: Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia, Laboratório de Morfometria, Metabolismo e Doença Cardiovascular. Av 28 de Setembro 87 fds. 20551-030, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

E-mail addresses: tceciliano@gmail.com (T.C. Maia-Ceciliano), rafaela.dutra@gmail.com (R.R. Dutra), mbaguila@uerj.br (M.B. Aguilu), mandarim@uerj.br (C.A. Mandarim-De-Lacerda).

<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.105399>

Received 1 December 2018; Received in revised form 25 March 2019; Accepted 5 June 2019

Available online 05 June 2019

0960-0760/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.