

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÁREA DE ATENÇÃO INTERDISCIPLINAR EM SAÚDE

MAIARA MIKUSKA CORDEIRO

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE VITAMINA D₃ ASSOCIADA AO EXERCÍCIO
FÍSICO NA OBESIDADE EM ANIMAIS SUBMETIDOS A UMA DIETA
HIPERCALÓRICA

PONTA GROSSA
2019

MAIARA MIKUSKA CORDEIRO

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE VITAMINA D₃ ASSOCIADA AO EXERCÍCIO
FÍSICO NA OBESIDADE EM ANIMAIS SUBMETIDOS A UMA DIETA
HIPERCALÓRICA

Dissertação de mestrado apresentada para
obtenção do título de Mestre na Universidade
Estadual de Ponta Grossa, área de atenção
interdisciplinar em saúde.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Dionízia Xavier Scomparin.

Co-orientador: Prof. Dr. Gilson César Nobre Franco

PONTA GROSSA
2019

C794 Cordeiro, Maiara Mikuska
Efeito da suplementação de vitamina D₃ : associada ao exercício físico na
obesidade em animais submetidos a uma hipercalórica / Maiara Mikuska
Cordeiro. Ponta Grossa, 2019.
80 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde - Área de Concentração:
Atenção Interdisciplinar em Saúde), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Profa. Dra. Dionízia Xavier Scomparin.
Coorientador: Prof. Dr. Gilson César Nobre Franco.

1. Obesidade. 2. Dieta hipercalórica. 3. Vitamina D. 4. Colecalciferol. 5.
Exercício físico. I. Scomparin, Dionízia Xavier. II. Franco, Gilson César Nobre. III.
Universidade Estadual de Ponta Grossa. Atenção Interdisciplinar em Saúde. IV.T.

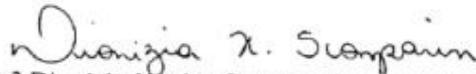
CDD: 613.25

MAIARA MIKUSKA CORDEIRO

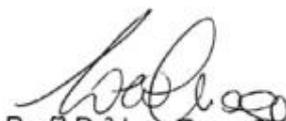
EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE VITAMINA D3 ASSOCIADA AO
EXERCÍCIO FÍSICO NA OBESIDADE EM ANIMAIS SUBMETIDOS A UMA
DIETA HIPERCALÓRICA

Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre na Universidade
Estadual de Ponta Grossa, Área de atenção interdisciplinar em saúde.

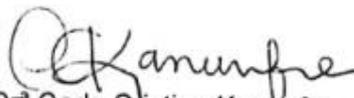
Ponta Grossa, 06 de maio de 2019.



Profª Drª Dionizia Xavier Scomparin – Orientador
Doutora em Ciências Biológicas
Universidade Estadual de Maringá



Profª Drª Lea Rosa Chiocha Ferro
Doutora em Farmacologia
Universidade Federal do Paraná



Profª Drª Carla Cristine Kanunfre
Doutora em Fisiologia Humana
Universidade de São Paulo

Dedico aos meus pais e minha amada irmã!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter abençoado a minha vida em todos até mesmo durante os momentos difíceis, diante destes problemas me possibilitaram me tornar mais forte.

Agradeço ao universo pelas oportunidades maravilhosas proporcionadas a mim.

Aos meus pais, que me ajudaram a chegar até aqui, pela educação que tenho. Os privilégios que tive, devo tudo à vocês. Por todos os dias difíceis que enfrentamos, chegamos até aqui. Esse momento é de vocês também.

À minha querida, amada, zeloso, briguenta e carinhosa irmã, Vanessa, sempre estive ao meu lado, agradecimentos nunca serão suficientes para demonstrar o quanto te amo, quão importante você é em minha vida.

Aos meus professores orientadores, Dionizia Xavier Scomparin e Gilson César Nobre Franco, obrigado pelo aceite, comprometimento e paciência. Os momentos compartilhados, dentre eles histórias de laboratório e brincadeiras levarei com maior apreço em minha vida. Ambos são inspirações como profissionais. Tenho orgulho de dizer que fui orientanda de vocês.

Aos meus colegas e amigos de iniciação científica, Catherine Copas Pontes, Jessica Amanda Marcondes, Felipe Oliveira Mendonça, Paulo Roberto Ribeiro e João Lucas de Paula Xavier que fizeram parte do início dessa jornada acadêmica e que proporcionaram a melhor amizade e momentos felizes que certamente sempre irei guardar em minhas memórias.

Agradeço em especial minhas amigas Jéssica A. Marcondes e Catherine Copas Pontes, pois mesmo com a distância continuam a me ajudar em meio às dificuldades com seu apoio ou presença de amor e carinho de ambas. Sou imensamente grata por ter conhecido vocês.

Aos meus grandes amigos que o mestrado me proporcionou Guilherme da Silva Safraider, Janaini Brunoski e Patrícia Biscaia Bubana, sem vocês não poderia chegar até esse momento.

À minha querida amiga Livia Ribeiro nossos cafés sempre foram repletos de afetos e reflexões e talvez só talvez um pouco de reclamações, sem sua presença essa jornada seria mais fatigante.

Ao meu amigo Cassiano Sepanski que me auxiliou em vários momentos durante a experimentação sua ajuda e colaboração foram muito importantes.

Aos professores do programa, que de alguma forma me ajudaram no decorrer do mestrado.

Às técnicas do biotério, Marilene e Jô, pelo auxílio com os animais.

A todos que de alguma forma fizeram com que o projeto se concretizasse!

“Mera mudança não é crescimento. Crescimento é a síntese de mudança e continuidade, e onde não há continuidade não há crescimento.”

C. S. Lewis

RESUMO

CORDEIRO, Maiara Mikuska. **Efeito da suplementação de vitamina D₃ associada ao exercício físico na obesidade em animais submetidos a uma dieta hipercalórica.** Estudo *in vivo*. 2019. 80 páginas. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa, 2019.

Introdução: A obesidade caracteriza-se pelo acúmulo excessivo de tecido adiposo decorrente de vários fatores, dentre eles temos, a inatividade e o excesso de alimentos ricos em carboidratos simples, lipídios e açúcares. O estado de obeso está relacionado com os baixos níveis de vitamina D. **Objetivo:** Avaliação do efeito da associação entre suplementação de vitamina D₃ e a prática regular de atividade física em ratos obesos obtidos pela ingestão de dieta de cafeteria. **Materiais e Métodos:** Aos 21 dias de vida ratos da linhagem wistar foram cedidos pelo Biotério central e dispostos em caixas em um número de 3 animais em cada gaiola. Sendo assim, separados aleatoriamente em 8 grupos. Um grupo foi designado como CONTROLE recebeu ração comercial apenas, outro grupo designado como OBESO recebeu dieta hipercalórica (refrigerante de cola, salgadinhos, bolachas entre outros). A dieta ofertada foi disposta de maneira *ad libitum* durante todo o tempo de vida dos animais que foi 90 dias de vida. Os animais foram subdivididos em animais sedentários e exercitados. Animais do grupo EXE realizaram exercício físico desde os 21 dias até os 90 dias, os demais animais do grupo SED não participaram dessa intervenção terapêutica. O exercício físico foi aeróbico de natação em aquário de concreto, realizada 3 vezes na semana por 15 minutos. Ainda esses grupos foram subdivididos em outros dois grupos: Animais que receberam suplementação com Vitamina D₃, (VIT D3 +) e não suplementados (VIT D3 -) por meio do método de gavagem dos 60 dias até os 90 dias de vida dos animais. Aos 91 dias o sangue foi coletado e analisado a fim de averiguação de parâmetros bioquímicos, além de análises complementares como cálcio, leptina e TNF- α . **Resultados:** Verifica-se no estudo que a vitamina D₃, possivelmente possui ações no metabolismo dos animais obesos. O grupo obeso sedentário obteve melhoras nos parâmetros morfométricos, sendo estes, redução do peso corporal final, índice de Lee e estoques de gordura. No quadro metabólico também ocorreu melhora de forma que houve redução nos parâmetros de glicemia, triglicérides e colesterol nos animais tratados com suplementação de vitamina D₃ quanto em animais submetidos ao exercício físico. Constatou-se no grupo exercitado associado à suplementação de vitamina D₃, redução do perfil inflamatório e lipídico, elucidando a atuação da vitamina D₃. **Conclusão:** Por meio deste estudo compreendemos que de fato a vitamina D₃, possui um importante papel durante o estado de instalação e progressão da obesidade. Animais que obtiveram a suplementação demonstraram resultados de estagnação da doença, decorrente em melhoras no perfil metabólico e inflamatório. O exercício, quando combinado com a vitamina D₃ indica um efeito sinérgico, caracterizando um importante achado na literatura.

Palavras-chave: Obesidade. Dieta hipercalórica. Vitamina D. Colecalciferol. Exercício físico.

ABSTRACT

CORDEIRO, Maiara Mikuska. **Effect of vitamin D3 supplementation associated with physical exercise in obesity in animals submitted to a hyperercoral diet.** In vivo study. 2019. 80 pages. Dissertation (Masters in Interdisciplinary Health Care) – State University of Ponta Grossa. Ponta Grossa, 2019.

Introduction: Obesity is characterized by the excessive accumulation of adipose tissue due to several factors, such as inactivity and excess of foods rich in simple carbohydrates, lipids and sugars. In addition, obesity is related to low levels of vitamin D **OBJECTIVE:** To evaluate the effect of the association between vitamin D3 supplementation and the regular practice of physical activity in obese rats obtained by eating a cafeteria diet. **Materials and methods:** At 21 days of age, rats of the Wistar lineage were assigned by the Central Biotério and placed in boxes in a number of 3 animals in each cage. Thus, they were randomly divided into 8 groups. One group was designated as CONTROL these animals received commercial feed, another group was designated as obese throughout the experimental period received hypercaloric diet (cola, snacks, crackers and others). The diet offered was arranged ad libitum during the whole life of the animals that was 90 days of life. The animals were separated in sedentary and exercised animals. Animals of the EXE group performed physical exercise from 21 days to 90 days, the other animals of the SED group did not participate in this therapeutic intervention. Physical exercise was aerobic swimming in concrete aquarium, performed 3 times a week for 15 minutes. Still, these groups were subdivided into two other groups: Animals that received supplementation with Vitamin D (VIT D3 +) and not supplemented (VIT D3 -) by means of the gavage method from 60 days to 90 days of life of the animals. At 91 days of age the animals were euthanized, the blood collected was analyzed in order to investigate biochemical parameters, as well as complementary analyzes such as calcium, leptin and TNF- α . **Results:** It is verified in the study that the vitamin has actions in the metabolism of obese animals. The sedentary obese group obtained improvements in the morphometric parameters, being these, reduction of the final body weight, Lee index and fat stocks. In the metabolic table, improvement was also observed in the glycemia, triglycerides and cholesterol parameters in the animals treated with vitamin D3 supplementation, as well as in animals submitted to physical exercise. It was found in the exercise group associated with vitamin D3 supplementation, reduction of the inflammatory and lipid profile, elucidating the performance of vitamin D3. **Conclusion:** Through this study we understand that in fact vitamin D has an important role during the state of installation and progression of obesity. Animals that obtained supplementation showed results of stagnation of the disease, resulting in improvements in the metabolic and inflammatory profile. The exercise when combined with vitamin D3 indicates a synergistic effect, characterizing an important finding in the literature.

Keywords: Obesity, High Fat Diet. Vitamin D. Cholecalciferol. Physical Exercise

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|--------------|---|----|
| Figura 2.1 - | Tipos de macrófagos no tecido adiposo e citocinas anti-inflamatórias e pró-inflamatórias..... | 20 |
| Figura 2.2 - | Recrutadores inflamatórios relacionados ao sistema imune inata e adaptativa envolvidos na obesidade..... | 21 |
| Figura 2.3 - | Modificações adipócitos normais e alterados..... | 22 |
| Figura 2.4 - | Fontes e metabolismo da vitamina D..... | 24 |
| Figure 5.1 - | Effect of supplementation with Vitamin D3 on animals fed on a hypercaloric diet..... | 41 |
| Figure 5.2 - | Effect of vitamin D supplementation on the amount of food ingested..... | 42 |
| Figure 5.3 - | Effect of Vitamin D supplementation on WAT and BAT fat stocks..... | 43 |
| Figure 5.4 - | Effect of vitamin D supplementation on the biochemical parameters in control and obese rats..... | 45 |
| Figure 5.5 - | Effect of vitamin D supplementation on the lipid profile in control and obese rats..... | 46 |
| Figure 5.6 - | Effect of vitamin D supplementation on inflammatory marker in animals obese e controls..... | 47 |
| Figure 5.7 - | Effect of vitamin D supplementation on inflammatory marker in animals obese e controls..... | 48 |
| Figure 5.8 - | The Association between Food Patterns and the Metabolic Syndrome Using Principal Components Analysis (PCA)..... | 49 |
| Figura 6.1 - | Efeito da associação de exercício mais suplementação de vitamina D3..... | 62 |
| Figura 6.2 - | Efeito da suplementação com vitamina D na ingestão alimentar..... | 64 |
| Figura 6.3 - | Efeito da associação de vitamina D e exercício físico nos estoques de gorduras TAB e TAM..... | 66 |

| | | |
|--------------|--|----|
| Figura 6.4 - | Avaliação sobre o perfil metabólico e lipídico de animais exercitados associados a vitamina D3 | 68 |
| Figura 6.5 - | Mensuração de perfil inflamatório em diferentes intervenções terapêuticas..... | 70 |
| Figura 6.6 - | Mensuração dos níveis séricos de leptina..... | 71 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|--------------|--|----|
| Table 5.1 - | Menu of supply of hypercaloric foods..... | 37 |
| Tabela 6.1 - | Alimentos ofertados durante indução à obesidade..... | 60 |

SUMÁRIO

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 1. | INTRODUÇÃO..... | 14 |
| 2. | REFERENCIAL TEÓRICO..... | 17 |
| 2.1 | OBESIDADE..... | 17 |
| 2.1.1 | <i>Inflamação crônica.....</i> | <i>19</i> |
| 2.2 | VITAMINA D E OBESIDADE..... | 23 |
| 2.2.1 | <i>Vitamina D e atividade extra-óssea.....</i> | <i>26</i> |
| 3. | OBJETIVOS..... | 29 |
| 3.1 | OBJETIVO GERAL..... | 29 |
| 3.2 | OBJETIVOS ESPECIFICOS..... | 29 |
| 4. | REFÊNCIAS..... | 30 |
| 5. | ARTIGO CIENTÍFICO 1..... | 35 |
| 5.1 | INTRODUCTION..... | 36 |
| 5.2 | MATERIALS AND METHODS..... | 37 |
| 5.2.1 | <i>Experimental animals and ethical approvals.....</i> | <i>37</i> |
| 5.2.2 | <i>Experimental design.....</i> | <i>37</i> |
| 5.2.3 | <i>Standard diet.....</i> | <i>38</i> |
| 5.2.4 | <i>Cafeteria diet.....</i> | <i>38</i> |
| 5.2.5 | <i>Vitamin D₃ administration.....</i> | <i>39</i> |
| 5.2.6 | <i>Obesity and euthanasia.....</i> | <i>39</i> |
| 5.2.7 | <i>Biometric parameters.....</i> | <i>39</i> |
| 5.2.8 | <i>Serum analysis.....</i> | <i>40</i> |
| 5.2.9 | <i>Statistical analysis.....</i> | <i>40</i> |
| 5.3 | RESULTS..... | 40 |
| 5.3.1 | <i>Morphological analysis.....</i> | <i>40</i> |
| 5.3.2 | <i>Food consumption in animals.....</i> | <i>41</i> |
| 5.3.3 | <i>Morphometric parameters: fat stocks.....</i> | <i>43</i> |
| 5.3.4 | <i>Vitamin D supplementation Influences serum.....</i> | <i>44</i> |
| 5.3.5 | <i>Inflammatory profile.....</i> | <i>46</i> |
| 5.3.6 | <i>Adipokine leptin.....</i> | <i>47</i> |
| 5.3.7 | <i>Principal component analysis (PCA).....</i> | <i>48</i> |
| 5.4 | DISCUSSION..... | 50 |
| 5.5 | CONCLUSION..... | 53 |
| 5.6 | REFERENCES..... | 54 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 6. | ARTIGO CIENTÍFICO 2..... | 57 |
| 6.1 | INTRODUÇÃO..... | 58 |
| 6.2 | MATERIAIS E MÉTODOS..... | 59 |
| 6.2.1 | <i>Animais.....</i> | 59 |
| 6.2.2 | <i>Divisão dos grupos.....</i> | 59 |
| 6.2.3 | <i>Suplementação de vitamina D₃.....</i> | 60 |
| 6.2.4 | <i>Dieta de cafeteria.....</i> | 60 |
| 6.2.5 | <i>Exercício físico.....</i> | 60 |
| 6.2.6 | <i>Análises bioquímicas.....</i> | 61 |
| 6.2.7 | <i>Análise estatística</i> | 62 |
| 6.3 | RESULTADOS..... | 62 |
| 6.3.1 | <i>Análise morfométrica.....</i> | 62 |
| 6.3.2 | <i>Evolução de ingestão alimentar</i> | 63 |
| 6.3.3 | <i>Dados morfométricos: estoques de gordura.....</i> | 64 |
| 6.3.4 | <i>Análise bioquímica, perfil metabólico e lipídico.....</i> | 67 |
| 6.3.5 | <i>Níveis circulantes de citocina e letina.....</i> | 69 |
| 6.4 | DISCUSSÃO..... | 71 |
| 6.5 | CONCLUSÃO..... | 76 |
| 6.6 | REFERÊNCIAS..... | 77 |

1. INTRODUÇÃO

O aumento da obesidade vem sendo motivo de grande preocupação devido ao impacto exercido como fator de risco para outras doenças que comprometem a qualidade de vida e a sobrevivência dos indivíduos. A obesidade é uma doença multifatorial e sua fisiopatologia é complexa. Inúmeros fatores genéticos, ambientais e comportamentais influenciam no balanço energético e, conseqüentemente, no aumento da gordura corporal (MANCINI; MELO; ANGELUCCIA, 2014).

Com base na definição da Organização Mundial de Saúde (OMS) a obesidade pode ser classificada em valores de referência, conhecido como o índice de massa corporal (IMC). Considera-se que há excesso de peso quando o IMC é \geq a 25 kg/m² e que há obesidade quando o IMC é \geq 30 kg/m² (IBRAHIM et al., 2010).

Quadro 1- Classificação Internacional do IMC para indivíduos adultos

| CLASSIFICAÇÃO | IMC (kg/m²) |
|--------------------------------|--------------------------------|
| Muito abaixo do peso | Abaixo de 17 |
| Abaixo do peso | Entre 17 e 18,50 |
| Peso normal | Entre 18,5 e 24,99 |
| Sobrepeso | Entre 25 e 30 |
| Obesidade I | Entre 30 e 35 |
| Obesidade II (severa) | Entre 35 e 40 |
| Obesidade III (mórbida) | Acima de 40 |

Fonte: Adaptado de OMS

Alguns estudos segundo Belegri et al. (2017), Bortolin et al. (2018) e Bray et al. (2016) sugerem influências de hábitos de vida como principais fatores desencadeadores da instalação da obesidade em indivíduos que possuem hábitos alimentares ruins, alimentam-se de dietas ricas em lipídios e carboidratos simples, esse fator também encontra-se associada à inatividade física. O aumento da obesidade desencadeada por diferentes fatores têm acentuado o número de

indivíduos com complicações clínicas, tais como a Síndrome Metabólica (SM) resistência à insulina e doenças cardiovasculares (PORET et al., 2017).

A SM é caracterizada pela associação de diferentes distúrbios metabólicos e endócrinos, como obesidade, resistência à insulina, intolerância à glicose, hipertensão arterial e dislipidemias. Elementos que favorecem a instalação precoce do Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) (PORET et al., 2017; TEIXEIRA, 2015).

Um dos fatores preocupantes da obesidade se dá pelo aumento expressivo do tecido adiposo, assim temos diferentes formas de expansão do tecido adiposo em diferentes locais como a obesidade central ou visceral, sendo associada a distúrbios metabólicos, doenças cardiovasculares como o desenvolvimento das doenças arteriais coronárias e a hipertensão arterial (FARHANGI et al., 2016)

Há várias desordens nutricionais e fisiológicas que implicam na progressão desta doença, dentre essas desordens, destaca-se os baixos níveis de vitamina D em indivíduos obesos já descritos inicialmente por Blumberg et al. (2006), em que há interação entre ambas as doenças (obesidade e hipovitaminose D₃), de maneira que o baixo nível de vitamina D é resultado de uma maior quantidade de TAB, conseqüentemente aumento de gordura corporal, dessa forma o TAB atuaria como um reservatório de vitamina D₃, e com isso estaria sequestrando essa vitamina, determinando uma menor biodisponibilidade da vitamina D₃ (BLUMBERG et al., 2006; CIMINI et al., 2017).

Além de seu papel na regulação da homeostase cálcio sistêmico e saúde esquelética, a vitamina D possui ações conhecidas como extra-ósseas em que ela possui participação desde efeito protetor sobre os tecidos cardíaco e nervoso, à sinalização de recrutadores inflamatórios (FARHANGI et al., 2017; SLUSHER et al., 2015)

Considerando essas ações, encontrou-se uma relação de regulação da vitamina D sobre o tecido adiposo de maneira que há participação dela na lipogênese e adipogênese (LI et al., 2012). Um estudo realizado na Itália mostra os benefícios da suplementação de vitamina D em indivíduos num programa de perda de peso. Os indivíduos que foram suplementados com doses de 100 e 50 mil UI tiveram melhor resposta na perda de peso que os indivíduos que os indivíduos não suplementados (WAMBERG et al., 2013).

Outra maneira de controle do peso corporal para evitar o sobrepeso e suas doenças relacionadas é a prática regular de atividade física. O exercício físico é

conhecido por ser uma ferramenta não invasiva e não farmacológica de baixo custo que auxilia o controle do peso corporal. A prática regular de atividade física tem sido proposta para melhorar aspectos bioquímicos e psicológicos promovendo assim a melhora no quadro geral, contudo pouco se sabe a respeito dos benefícios da suplementação de vitamina D.

Diante disso o objetivo deste trabalho foi avaliar a relação da suplementação de vitamina D₃ em animais obesos aliados a prática regular de atividade física em ratos obesos obtidos por dieta de cafeteria.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 OBESIDADE

A obesidade possui uma definição clássica caracterizada por ocorrer o acúmulo em excesso de lipídios em forma de células adiposas, promovendo o aumento excessivo de tecido adiposo. Esse seria o resultado do desarranjo no estado nutricional, onde há maior consumo de energia e redução do gasto de energético, devido a fatores que permeiam a genética, meio ambiente, estilo de vida e fatores.

A incidência de doenças cardiovasculares e metabólicas na população mundial vem crescendo junto com aumento de indivíduos obesos. Esses fatores têm chamado à atenção dos profissionais de saúde e pesquisadores da área. Estima-se que 70% dos adultos norte-americanos encontram-se acima do peso e 35% são considerados obesos segundo um estudo desenvolvido pela National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES, 2016).

Em 2015, o Brasil já tinha cerca de 18 milhões de pessoas consideradas obesas. Somando o total de indivíduos acima do peso, o montante chega a 70 milhões, o dobro de há três décadas anterior. O Ministério da Saúde divulgou uma pesquisa que revela que houve aumento de pessoas adultas com excesso de peso. Em um período de 10 anos (2006-2016) 50% da população brasileira entrou em estado de sobrepeso e 19% encontra-se em estado de obeso (VIGITEL, 2016).

Devido ao padrão socioeconômico que se alterou durante o período de estudo o estado nutricional também sofreu mudanças. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), assim como o Sistema de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL) chegaram à um consenso que a população brasileira encontra-se em um estado de transição da desnutrição para a obesidade.

A prevalência global de obesidade e diabetes tipo II atingiu propriedades epidêmicas que classificaram como uma doença emergente e preocupante em todos os países (D'MELLO et al., 2011). O fácil acesso a alimentos e bebidas ricos em gordura e açúcar estão fortemente associadas à obesidade, pois levam à hiperfagia além da energia necessidades do organismo (FORSLUND et al., 2005; BERG et al., 2009; CHAPELOT, 2011). O hipotálamo é uma área do cérebro chave envolvida na

regulação da homeostase energética que integra sinais nutricionais, neuronais e hormonais regulando o consumo e a despesa energética (OSBORN; OLFSKY, 2012). Durante a obesidade, resposta hipotalâmica à leptina diminui frente a uma alimentação rica em lipídios e açúcares proporcionando o estado de maior consumo alimentar (NOBRE et al., 2018).

Esse crescente número de consumo exacerbado de alimentos pobres em micronutrientes está relacionado ao desencadeamento da obesidade, desta maneira alguns pesquisadores desenvolvem estudos acerca da compreensão da etiologia doença, entre essas formas de busca dos mecanismos pelos quais a obesidade induz as disfunções fisiológicas.

Existem diversas formas de indução à obesidade utilizando modelos de animais, o mais rotineiro é o uso de roedores (ROSINI et al., 2012). Dentre esses modelos alguns conseguem instalar a doença a partir de mutações genéticas. Contudo tais modelos não se assemelham a gênese atual da obesidade em humanos, isso porque quando partimos para o genótipo humano a chave da obesidade não esteja ligada à mutações nos alelos de cromossomos humanos (ROSINI et al., 2012; ESSER et al., 2014).

Uma possível hipótese entre a genética e obesidade são as formas monogênicas da mesma, isso porque, estão associadas a diversos genes e mutações envolvidos no equilíbrio de energia, fornecendo entendimento sobre alguns dos mecanismos relacionados à regulação do peso corporal, bem como mutações nos genes da leptina (LEP), receptor da leptina (LEPR) e receptor-4 de melanocortina (MC4R), estes possuem importante regulação de apetite. Quando alterados produzem o fenótipo da obesidade devido a hiperfagia desencadeada (BARNES et al., 2007; MOEHLECKE et al., 2015; NOBRE et al., 2018).

Quando há esse desequilíbrio energético a forma de armazenar a energia que “resta” se dá pela expansão das células adiposas, ricas em lipídios. Em mamíferos encontram-se dois tipos de tecido adiposo: o tecido adiposo branco (TAB) e o tecido adiposo marrom (TAM). O TAB é capacitado para a função de armazenamento de energia em períodos de balanço energético positivo (RICQUIER, 2006). Já a TAM possui como função principal oxidar lipídios para produzir calor, logo este, é especializado na termogênese adaptativa, induzida pela exposição ao frio ou à dieta (HIMMS-HAGEN, 1990).

O ponto chave para a compreensão e tratamento da obesidade é o tecido adiposo, atualmente descobriu-se que o tecido adiposo desempenha um papel importante na integração do sistema endócrino, sinais metabólicos e inflamatórios para controlar homeostase energética, através da produção de uma variedade ou proteínas bioativas, em conjunto referidas como "adipocinas", que incluem: leptina, adiponectina, resistina, visfatina, fator de necrose tumoral - alfa (TNF- α), inibidor de plasminogênio tipo 1, entre outros. Alguns desses hormônios produzidos pelo tecido adiposo estão associadas à desordens no metabolismo consequentemente auxiliam na promoção da obesidade (CALABRÒ et al., 2008; MOEHLECKE et al., 2015; PORET et al., 2017).

2.1.1 Inflamação crônica

Inflamação é decorrente de uma série de reações celulares e humorais destinado a defender o corpo de vários potenciais prejudiciais ao organismo, isto inclui, bactérias, vírus, traumas mecânicos e físicos (CILDIR; AKINCILAR; TERGAONKAR, 2013, LEE; LEE, 2014). Tipicamente, na inflamação aguda, a lesão inicial ou o agente patológico desencadeia a liberação de um número de moléculas imunomoduladoras incluindo citocinas e quimiocinas de macrófagos residentes em tecidos células, provocando um rápido recrutamento de neutrófilos e depois macrófagos e linfócitos da circulação para o local da inflamação (CILDIR et al., 2013). O infiltrando celular, em seguida, destrói os agentes infecciosos e remove as células danificadas. Finalmente, a transição de inata a imunidade adaptativa é realizada via apresentação de antígenos células (APC) e linfócitos B e T. Em geral, a inflamação é caracterizada pelo aumento dos níveis sistêmicos de citocinas, juntamente com o aumento das células imunes infiltrantes, com neutrófilos dominando principalmente nas fases agudas, enquanto os macrófagos em condições mais crônicas (LEE; LEE, 2014).

A conexão entre inflamação e diabetes foi sugerida há mais de um século (WILLIAMSON, 1901), mas a evidência de que a inflamação é um importante mediador no desenvolvimento de resistência à insulina veio recentemente. Foi

descrito que a os níveis circulantes do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) possui efeitos que elevar as concentrações de glicose sérica (KHOVIDHUNKIT, 2004).

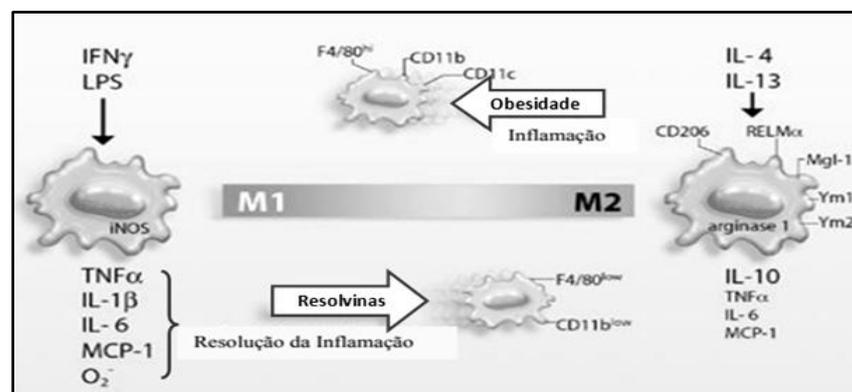
O tecido adiposo é formado por células armazenadoras de energia (adipócitos) que em grande quantidade aumentam seu tamanho (hipertrofia) ou aumentam em quantidade (hiperplasia). Há também uma função do TAB como órgão secretor de hormônios e proteínas sinalizadoras de inflamação, portanto essas descobertas forneceram a base para associar obesidade a um estado crônico de inflamação subclínica (CALABRÒ et al., 2008; IBRAHIM, et al., 2010; MOEHLECKE et al., 2015; PORET et al., 2017).

Quando esse aumento está relacionado à hipertrofia ocorre a liberação de citocinas e quimiocinas inflamatórias, que irão recrutar células fagocitárias como os macrófagos. Esses macrófagos formarão uma estrutura semelhante a coroas (Crow-like) que cercarão os adipócitos, ocorrendo a liberação de mais citocinas inflamatórias pelos macrófagos (MOEHLECKE et al., 2015; PORET et al., 2017).

Na Figura 2.1 observa-se que o TAB em estado normal, possui funções de regulação metabólica e apresenta um perfil anti-inflamatório, devido à presença de macrófagos de fenótipo tipo 2 (M2) que secretam citocinas anti-inflamatórias (BALISTRERI, 2010).

Os macrófagos podem ser divididos em dois tipos essas variações ocorrem de acordo com a via de ativação de cada um, sendo assim temos o que são designados de ativação clássica tipo M1 podendo ser induzidos por interferon-gama (INF- γ) e lipoproteína lípase (LPL) e de ativação alternada tipo M2 podendo ser induzidos pela interleucina-4 (IL-4) e interleucina-13 (IL-13), como é demonstrado na figura 2 (MRAZ; HALUZIK, 2014).

Figura 2.1 - Tipos de macrófagos no tecido adiposo e citocinas anti-inflamatórias e pró-inflamatórias

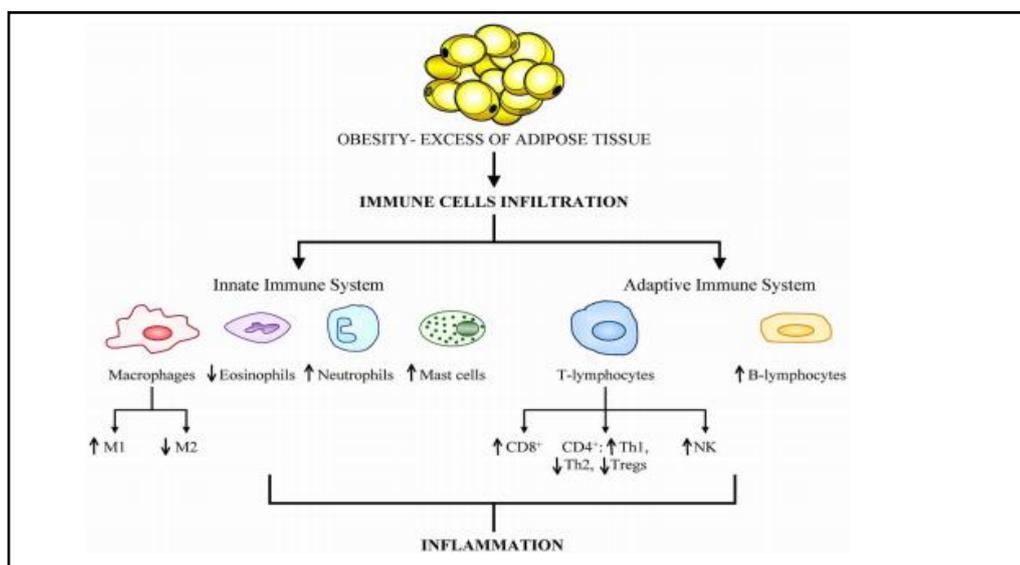


Fonte: Adaptado de Clària et al., 2011.

Nos indivíduos magros, o tecido adiposo possui macrófagos residentes, essencialmente de via de sinalização tipo M2, que se encontram próximos e até entre os adipócitos, possuem como função armazenar lipídios e sintetizar citocinas anti-inflamatórias e antígenos M2, tal como o CD206 (receptor manose). Algumas citocinas também estão envolvidas nestes processos como a arginase (enzima que inibe a atividade do óxido nítrico, iNOS), a interleucina-10 (IL-10) e o antagonista do receptor interleucina-1 (IL-1Ra) (MRAZ; HALUZI, 2014).

O tecido adiposo aumenta devido ao seu aumento progressivo das células adiposas, que pode ser por aumento de número delas ou tamanho, bem como o aumento do número de macrófagos. Nos indivíduos obesos existe um aumento da expressão de diversos antígenos pró-inflamatórios dentre eles temos os marcadores de leucócitos F4/80, CD11b e CD11c. As funções dos leucócitos são moduladas pelas integrinas β_2 , incluindo a integrina CD11b / CD18 altamente abundante (também conhecida como Mac-1 e CR3), encontra-se presente em uma conformação inativa nos leucócitos circulantes, mas é rapidamente ativado para mediar a adesão, migração e acúmulo de leucócitos nos locais de inflamação elevando a produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo o TNF- α , IL-6 e óxido nítrico sintetase 2 (enzima que forma óxido nítrico, NOS2) isso é resultado da substituição dos macrófagos M2 para M1 (CLÀRIA et al., 2011).

Figura 2.2 - Recrutadores infamatórios relacionados ao sistema imune inata e adaptativa envolvidos na obesidade.

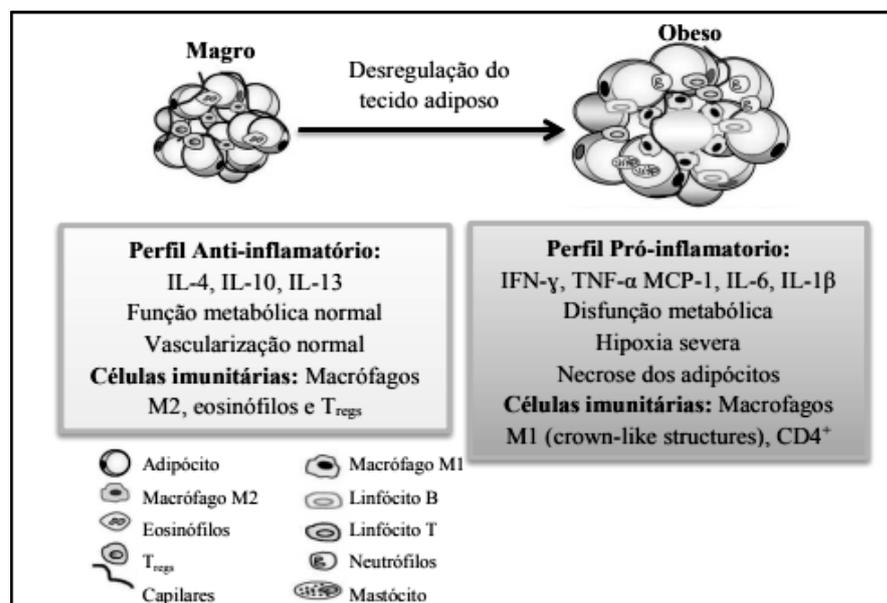


Fonte: Adaptado de Catàlan et al., 2013.

A troca das formas de adipócitos não está ligada à transformação dos macrófagos M2 residentes, mas sim alta quantidade de monócitos em circulação e à sua diferenciação em macrófagos do tipo M1 (BALISTRERI, 2010; MRAZ; HALUZIK, 2014).

Em indivíduos obesos como ocorre a expansão progressiva das células adiposas há a ocorrência de um estado inflamado. As células produzem estruturas semelhantes a uma coroa as quais apresentam níveis circulantes mais elevados de triglicerídeos, tudo isso ocorre porque há uma elevada expressão de citocinas pró-inflamatórias produzidas pelos macrófagos de fenótipo tipo 1 (M1) que atuam para ocorra aumento das células tornando o indivíduo obesos suscetível a doenças como a síndrome metabólica e o surgimento de Diabetes Mellitus Tipo II (FARB et al., 2011; RAMOS-NINO, 2013) .

Figura 2.3 – Modificações adipócitos normais e alterados



Fonte: Adaptado de Catàlan, 2013.

Os mecanismos específicos que realizam a ativação dos macrófagos no momento não são completamente esclarecidos sabe-se há participação dos complexos integrinas e também há participação de quimiocinas liberadas do tecido adiposo, sejam as responsáveis pelo recrutamento, retenção e ativação dos macrófagos precursores (monócitos). A proteína quimioatrativa de monócitos-1

(MCP-1) é considerada um importante mediador no recrutamento de monócitos ligando-se ao receptor CCR2 no adipócito estimulando a sua migração (MRAZ; HALUZIK, 2014).

Quando há um bloqueio nestes receptores ocorre uma redução da infiltração de macrófagos em obesos, provocando redução das citocinas inflamatórias e maior sinalização de insulina, desta forma, reduzindo os efeitos da resistência a insulina, bem como regressão da síndrome metabólica (OSBORN; OLFSKY, 2012).

2.2. VITAMINA D E OBESIDADE

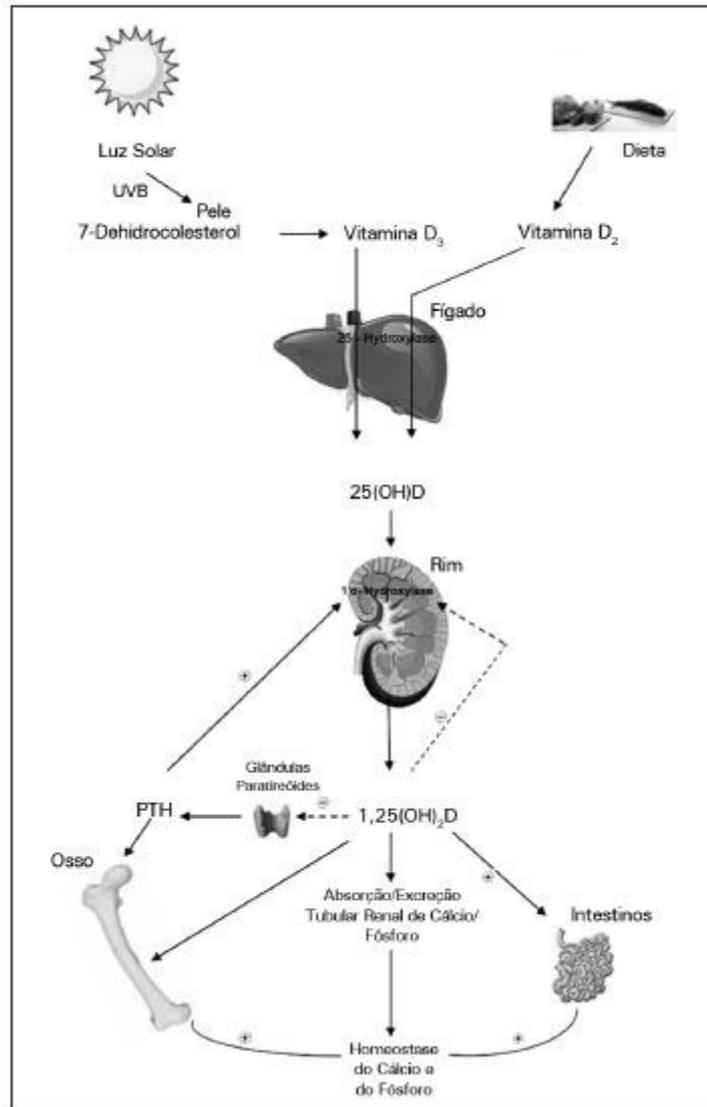
No intuito de se compreender os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da obesidade o pesquisador Blumberg e colaboradores (2006) evidenciou que a obesidade está associada aos baixos níveis circulantes de vitamina D e está interligada a regulando e ativação da proliferação de adipócitos bem como regulando a lipólise dessas células.

Como a obesidade está associada à expansão do tecido adiposo que aumenta devido ao desequilíbrio energético e também por via de ativação de inflamação faz-se necessário compreender a atividade do tecido, sendo esse tratado como ponto chave.

O sistema hormonal da vitamina D está envolvido na regulação da homeostase do cálcio e do metabolismo ósseo, mas potencialmente também tem funções no metabolismo extra mineral através da ativação de receptores extrarrenais de vitamina D (RVD); e ao longo da última década tem crescido muito o interesse no potencial terapêutico da vitamina D.

Na natureza, a vitamina D pode ser obtida de duas formas - ingestão ou síntese endógena induzida por luz solar na pele (Figura 2.4). Os seres humanos derivam a vitamina D principalmente a partir da exposição da pele à luz solar e, em menor quantidade, a partir da dieta e suplementos alimentares (CASTRO, 2011). Poucos alimentos possuem essa vitamina em sua composição, sendo assim é necessária uma fonte secundária para ingestão da mesma. Na ausência de exposição diária à luz solar, ou com o uso de filtros solares, esta deficiência será ainda maior. A radiação solar ultravioleta B converte a isoforma de 7-deidrocolesterol na epiderme em pré-vitamina D₃, que é imediatamente convertida em vitamina D₃ biologicamente inativa em processo dependente de calor (PETERS; MARTINI, 2014).

Figura 2.4 - Fontes e metabolismo da vitamina D



Legenda: UVB: Ultravioleta B; Vitamina D₃: coлекаlçiferol; Vitamina D₂: Ergocalçiferol; 25(OH)D: 25 hidroxivitamina D; 1,25(OH)₂D: 1,25 dihidroxivitamina D (calcitriol); PTH: Hormônio Paratireoideiano

Fonte: Adaptado de Castro, 2011.

O termo vitamina D engloba um grupo de moléculas secosteroides derivadas do 7-deidrocolesterol (7-DHC) interligadas através de uma cascata de reações fotolíticas e enzimáticas que acontecem em células de diferentes tecidos. Sob essa denominação ampla abrangem-se tanto o metabólito ativo (1 α ,25-diidroxi-vitamina D ou calcitriol) como seus precursores (entre eles a vitamina D₃ ou coлекаlçiferol, vitamina D₂ ou ergosterol e a 25-hidroxivitamina D ou calcidiol) e os produtos de degradação, os quais ainda podem manter alguma atividade metabólica (GANGLOFF et al., 2016). Esse sistema é formado pelas várias moléculas que compõem o grupo vitamina D, sua proteína carreadora (DBP, vitamin D binding

protein), seu receptor (VDR, vitamin D receptor) e pelas diversas enzimas que participam da cascata de reações de ativação e inativação (INDA FILHO; MELAMED, 2013).

Como a vitamina D é amplamente extensa e possui seus precursores biologicamente inertes necessita ser convertida para o hormônio ativo para ser capaz de exercer uma influência biológica com impacto sobre o metabolismo mineral e outras funções fisiológicas (PEIXOTO et al., 2012). A vitamina D é transportada no sangue através da proteína de ligação da vitamina D (PLD) para o fígado. No fígado, a vitamina D é hidroxilada na posição C-25 por uma ou mais hidroxilases 25 de vitamina D do citocromo P450, o que resulta na formação de 25(OH)D. A 25-hidroxivitamina D é a principal forma de armazenamento de vitamina D (Holick, 2016). No túbulo renal proximal (TRP), a enzima 1- α -hidroxilase catalisa a hidroxilação de 25(OH)D (Figura 1) na posição do carbono 1 do anel A, resultante na forma hormonalmente ativa da vitamina D, a 1,25-di-hidroxivitamina D (1,25(OH)₂D). Também chamado calcitriol, esta é a forma biologicamente ativa da vitamina D, que age sobre os receptores em diferentes órgãos alvo (CASTRO., 2011; INDA FILHO; MELAMED, 2013).

No túbulo renal proximal (TRP), a enzima 1- α -hidroxilase catalisa a hidroxilação de 25(OH)D (Figura 4) na posição do carbono 1 do anel A, resultante na forma hormonalmente ativa da vitamina D, a 1,25-di-hidroxivitamina D (1,25(OH)₂D). Também chamado calcitriol, esta é a forma biologicamente ativa da vitamina D, que age sobre os receptores em diferentes órgãos alvo. A síntese renal de 1,25(OH)₂D é uma etapa fortemente regulada, dada a sua potente atividade na homeostase do cálcio (Figura 2.4). O cálcio na dieta pode regular vitamina D diretamente através de mudanças nos níveis séricos de cálcio e, indiretamente, alterando os níveis de hormônio da paratireóide (PTH). A 1- α -hidroxilase pode ser suprimida por outros fatores, tais como fósforo e acidose metabólica crônica. No entanto, elevados níveis de cálcio em circulação e fator de crescimento de fibroblastos-23 (FGF-23) são capazes de suprimir diretamente a atividade da 1- α -hidroxilase renal, através da regulação da transcrição do gene da hidroxilase- α , e indiretamente através da supressão de PTH através de mudanças mediadas por AMPc (CASTRO, 2011; FANTUZZI, 2005). O FGF-23 é um hormônio produzido pelos osteócitos e é um hormônio circulante crítico envolvido no metabolismo do fosfato (GANGLOFF et al., 2016)

2.2.1 Vitamina D e atividade extra-óssea

Atualmente sabe-se por meio de estudos realizados da ação da vitamina D fora da sua função inicial que é a regulação do cálcio e fósforo. Há evidências da expressão de 1- α -hidroxilase em tecidos e órgãos que não os rins. Sugerem, portanto que a 1,25(OH)₂ D exerce uma vasta gama de ações nada clássicas, em sistemas como a modulação do sistema imune, a regulação da diferenciação celular, a morte celular programada, a inibição do crescimento celular, o controle do sistema nervoso central, regulação da hipertrofia de cardiomiócitos, a regulação da secreção de insulina e de regulação da pressão sanguínea através do sistema renina-angiotensina-aldosterona (FARHANGI et al., 2017; LIU et al., 2006; SIGMUNSDOTTIR et al 2007).

A vitamina D também encontra-se envolvida nos processos de atividade da síntese de ácido graxo em adipócitos recém-diferenciados (Kong; Li, 2006; Blumberg, et al., 2006). É provável que a 1,25(OH)₂ D seja produzida localmente nestes locais para mediar os efeitos biológicos locais no ambiente celular (INDA FILHO; MELAMED, 2013,).

Como há participação da vitamina D sobre o tecido adiposo de forma em que há intervenção da mesma existem algumas relações já compreendidas das possíveis relações existentes entre o TAB e os níveis de vitamina D, são essas:

- “1. Os baixos níveis da 25 (OH) D e obesidade são prevalentes e coexistentes e estão associados a várias doenças.
2. O tecido adiposo visceral (TAV) é o compartimento de gordura que tem o maior impacto em níveis de 25 (OH) D.
3. Os valores menores de 25 (OH) D pode ser um biomarcador do metabolismo relacionado à obesidade abdominal.
4. Níveis de 25 (OH) D aumentam espontaneamente com a perda de adiposidade” (GANGLOFF et al., 2016) .

Entendendo como o excesso de adiposidade leva a baixos níveis da vitamina D é importante para programar intervenções para reabastecer os níveis de vitamina D em obesos indivíduos. Vários mecanismos foram propostos para explicar como a obesidade leva à diminuição da circulação níveis de 25 (OH) D. Esses mecanismos incluem estigma, sequestro, diluição volumétrica e contribuintes metabólicos (LI et

al., 2001; SHI et al., 2001; WILIS., 2012). Esses mecanismos podem ou agir sozinho, mas mais provavelmente ocorrem simultaneamente e sinergicamente no indivíduo obeso (GILABERTE et al., 2011; GANGLOFF et al., 2016).

Em estudo desenvolvido por Nimitphong et al (2012) em células *in vitro* de pré-adipócitos murinos 3T3-Li descobriram que o metabolismo local da vitamina D no tecido adiposo pode regular a conversão de pré-adipócitos em adipócitos e, portanto, apoiar a remodelação saudável de humanos tecido adiposo.

E o processo inverso ocorre se houver alterações no metabolismo de adipócitos, esses podem acabar super expressando o receptor para vitamina D (RVD), como consequência secundária há o surgimento da obesidade devido ao preenchimento de lipídios (NIMITPHONG et al., 2012).

Recentemente em outro estudo sobre a relação entre obesidade e vitamina D evidenciou os efeitos da expressão de 1α -hidroxilase, houve aumento dessa proteína no tecido adiposo de animais obesos, o que indica maior produção de a forma ativa da vitamina D nos adipócitos. Quando houve essa expressão da proteína 1α -hidroxilase acarretou no aumento de proteínas desacopladoras (UCPs) no TAM induzindo à β -oxidação de ácidos graxos, proporcionando redução na proliferação dos adipócitos (NOBRE et al., 2016). Da mesma forma, Akutsu et al. (2001) relataram em seu trabalho que a suplementação com colecalciferol juntamente com o cálcio altera o metabolismo energético .

Essas descobertas suportam a noção de que o tecido adiposo não só armazenar passivamente vitamina D, mas que também tem o capacidade de modular dinamicamente a metabolização da vitamina D enzimas durante a obesidade e perda de peso (PARK; PARK; HAN., 2015).

Dentre as ferramentas não farmacológicas para a prevenção e combate a obesidade está o exercício físico, por ser uma estratégia eficaz e de baixo risco à saúde.

Por exercer ação sobre o tecido muscular estriado esquelético, o exercício físico é um dos fatores externos de grande importância na alteração neste tecido, inclui também a dinâmica para ossos, e tendões.

A tensão gerada pela contração muscular durante o exercício físico é transmitida até a célula promovendo adaptações simultâneas e remodelamento das células muscular resultando na hipertrofia da mesma, no entanto para tal resultado é

necessário que o tecido conjuntivo que circunda as fibras musculares aumenta assim como os tendões que estão envolvidos no processo (CHOI et al., 2013)

O treinamento físico compreende respostas fisiológicas e adaptações funcionais que são necessárias para melhorar a resistência muscular, força, potência e velocidade, levando a maior tolerância à atividade física (SILVA JR. 2017). O exercício aeróbico como, por exemplo, a natação, em um tempo de 10 à 40 minutos, com uma intensidade de moderada a intensa, aumenta a captação de oxigênio para os músculos (MIENALTOWSKI; BIRK, 2014). Fato interessante, pois atualmente têm sido considerado exercício de baixo impacto aos tendões e cartilagem, mas de grande valia como tratamento para a obesidade como atuante não-farmacológico para auxílio de doenças como cardiopatias, diabetes, síndrome metabólica além de combater a obesidade (CHOI et al., 2013).

Tem sido relatado, para esse modelo de treinamento, maior transporte de glicose, elevação dos estoques de glicogênio, maior oxidação de ácidos graxos de cadeia longa e aumento da capacidade de transporte do lactato da fibra muscular para a circulação sanguínea em músculos adaptados (KRAMER; GOODYEAR, 2007).

Dessa forma o exercício físico funciona como uma importante ferramenta no combate e prevenção do desenvolvimento da obesidade através de suas ações no tecido adiposo e no sistema nervoso central.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a influência da suplementação de vitamina D₃ associado ao exercício físico sobre os parâmetros biométricos, metabólicos na vida adulta de animais submetidos a dieta de cafeteria.

3.2 OBJETIVO ESPECIFICO

- Verificar o efeito da vitamina D e do exercício de maneiras isoladas e combinadas sobre o peso corporal;
- Analisar o consumo alimentar e calórico dos animais em diferentes períodos;
- Constatar as diferenças do peso absoluto das gorduras corporais em animais submetidos a diferentes protocolos de tratamento de forma isolada e combinada ;
- Mensurar os parâmetros bioquímicos do sangue: colesterol total, triglicerídeos, glicemia cálcio, TNF-alfa e leptina em animais tratados com vitamina D e animais exercitados associados a suplementação de vitamina D.

4. REFERÊNCIAS

AKUTSU, N. et al. Regulation of gene expression by 1α , 25-dihydroxyvitamin D3 and its analog EB1089 under growth-inhibitory conditions in squamous carcinoma cells. **Molecular endocrinology**, v. 15, n. 7, p. 1127-1139, 2001.

BALISTRERI, C. R.; CARUSO, C.; CANDORE, G. The Role of Adipose Tissue and Adipokines in Obesity-Related Inflammatory Diseases. **Mediators of inflammation**, v. 2010, 2010.

BARNES, L. A.; OPITZ, J. M.; GILBERT-BARNES, E. Obesity: genetic, molecular, and environmental aspects. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 143, n. 24, p. 3016-3034, 2007.

BELEGRI, E. et al. The effects of overnight nutrient intake on hypothalamic inflammation in a free-choice diet-induced obesity rat model. **Appetite**, v. 120, p. 527-535, 2018.

BERG, C. et al. Eating patterns and portion size associated with obesity in a Swedish population. **Appetite**, v. 52, n. 1, p. 21-26, 2009.

BLUMBERG, J. M. et al. Complex role of the vitamin D receptor and its ligand in adipogenesis in 3T3-L1 cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 16, p. 11205-11213, 2006.

BORTOLIN, R. C. A new animal diet based on human Western diet is a robust diet-induced obesity model: comparison to high-fat and cafeteria diets in term of metabolic and gut microbiota disruption. **International Journal of Obesity**, v. 42, n. 3, p. 525, 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção da Saúde. **Vigitel Brasil 2016: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico : estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal**. Brasília, 2017.

BRAY, G. A. et al. Management of obesity. **The Lancet**, v. 387, n. 10031, p. 1947-1956, 2016.

CALABRÒ P. et al. The role of adiposity as a determinant of an inflammatory milieu. **Journal of Cardiovascular Medicine**, v. 9, n. 5, p. 450-460, 2008.

CASTRO, L. C. O sistema endocrinológico vitamina D. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 55, n. 8, p. 566-75, 2011.

CATALÁN, V. et al. Adipose tissue immunity and cancer. **Frontiers in physiology**, v. 4, p. 275, 2013.

CHANG, E.; Kim, Y. Vitamin D insufficiency exacerbates adipose tissue macrophage infiltration and decreases AMPK/SIRT1 activity in obese rats. **Nutrients**, v. 9, n. 4, p. 338, 2017.

CHAPELOT, D. The role of snacking in energy balance: a biobehavioral approach. **The Journal of nutrition**, v. 141, n. 1, p. 158-162, 2010.

CHOI, M. et al. Vitamin D3 supplementation modulates inflammatory responses from the muscle damage induced by high-intensity exercise in SD rats. **Cytokine** v.1 n. 63, p.27-35, 2013.

CILDIR, G.; AKINCILAR, S. C.; TERGAONKAR, V. Chronic adipose tissue inflammation: all immune cells on the stage. **Trends in molecular medicine**, v. 19, n. 8, p. 487-500, 2013.

CIMINI, F. A. et al. Relationship between adipose tissue dysfunction, vitamin D deficiency and the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. **World journal of gastroenterology**, v. 23, n. 19, p. 3407, 2017.

CLÀRIA, J. et al. New insights into the role of macrophages in adipose tissue inflammation and Fatty liver disease: modulation by endogenous omega-3 Fatty Acid-derived lipid mediators. **Frontiers in immunology**, v. 2, p. 49, 2011.

D'MELLO, G et al. Childhood obesity and dental caries among paediatric dental clinic attenders. **International journal of paediatric dentistry**, v. 21, n. 3, p. 217-222, 2011.

ESSER, N. et al. Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. **Diabetes research and clinical practice**, v. 105, n. 2, p. 141-150, 2014.

FANTUZZI, G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. **Journal of Allergy and clinical immunology**, v. 115, n. 5, p. 911-919, 2005.

FARB M.G. et al. Reduced adipose tissue inflammation represents an intermediate cardiometabolic phenotype in obesity. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 58, n. 3, p. 232-237, 2011.

FARHANGI, M. A. Major components of metabolic syndrome and nutritional intakes in different genotype of UCP2- 866G/A gene polymorphisms in patients with NAFLD. **Journal of translational medicine**, v. 14, n. 1, p. 177, 2016.

FARHANGI, M. A. Cardiac tissue oxidative stress and inflammation after vitamin D administrations in high fat-diet induced obese rats. **BMC cardiovascular disorders**, v. 17, n. 1, p. 161, 2017.

FRANCISCHI, R. P.; PEREIRA, L. O.; JUNIOR, A. H. L. Exercício, comportamento alimentar e obesidade: revisão dos efeitos sobre a composição corporal e

parâmetros metabólicos. **Revista Paulista de Educação Física**, v.2, n.15 p.117-140, 2017.

GANGLOFF, A. et al. Changes in circulating vitamin D levels with loss of adipose tissue. **Current opinion in clinical nutrition and metabolic care**, v. 19, n. 6, p. 464-470, 2016.

GILABERTE, Y. et al. La vitamina D: evidencias y controversias. **Actas dermo-sifiliográficas**, v. 102, n. 8, p. 572-588, 2011.

HIMMS-Hagen, J. E. A. N. Brown adipose tissue thermogenesis: interdisciplinary studies. **The FASEB Journal**, v. 4, n. 11, p. 2890-2898, 1990.

HOLICK M.F. **New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 3, p. 266-281, 2007.

IBRAHIM M.M. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. **Obesity reviews**, v. 11, n. 1, p. 11-18, 2010.

INDA FILHO, A. J.; MELAMED, M. L. Vitamin D and kidney disease: what we know and what we do not know. **Brazilian Journal of Nephrology**, v. 35, n. 4, p. 323-331, 2013.

KHOVIDHUNKIT, W. et al. Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host. **The Journal of Lipid Research**, v. 45, n. 7, p. 1169-1196, 2004.

KONG, J.; LI, Y. C. Molecular mechanism of 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 cells. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 290, n. 5, p. E916-E924, 2006.

KRAMER, H. F.; GOODYEAR, L. J. Exercise, MAPK, and NF- κ B signaling in skeletal muscle. **Journal of applied physiology**, v.103, n. 1, p. 388-395, 2007.

LEE, B. C.; LEE, J. Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1842, n. 3, p. 446-462, 2014.

LI B. et al. 1, 25-Dihydroxyvitamin D₃ suppresses TLR8 expression and TLR8-mediated inflammatory responses in monocytes in vitro and experimental autoimmune encephalomyelitis in vivo. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e58808, 2013.

LI J. et al. 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D hydroxylase in adipocytes. **Journal Steroid Biochem Mol Biol** n. 112, p.122–126, 2008.

LIU P.T. et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. **Science**, v. 311, n. 5768, p. 1770-1773, 2006.

MANCINI, M. C.; MELO M. E., ANGELUCCIA, A. P. **Fisiologia e Tratamento Clínico da Obesidade in Wajchenberg**, Tratado de Endocrinologia Clínica, 4ª edição, cap. 29, 2014.

MIENALTOWSKI, M. J.; BIRK, D. E. Structure, physiology, and biochemistry of collagens. In: Progress in heritable soft connective tissue diseases. **Springer, Dordrecht**, p. 5-29, 2014

MOEHLECKE, M. et al. Determinants of body weight regulation in humans. **Archives of endocrinology and metabolism**, v. 60, n. 2, p. 152-162, 2016.

MRAZ, M.; Haluzik, M. The role of adipose tissue immune cells in obesity and low-grade inflammation. **Journal of Endocrinology**, v. 222, n. 3, p. R113-R127, 2014.

NIMITPHONG, H. et al. 25-hydroxyvitamin D3 and 1, 25-dihydroxyvitamin D3 promote the differentiation of human subcutaneous preadipocytes. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e52171, 2012.

NOBRE, J.L. et al. Leptin blocks the inhibitory effect of vitamin D on adipogenesis and cell proliferation in 3T3-L1 adipocytes. **General and comparative endocrinology**, v. 266, p. 1-8, 2018.

NOBRE, J.L. et al. Role of vitamin D in adipose tissue in obese rats programmed by early weaning and post diet calcium. **Molecular nutrition & food research**, v. 60, n. 4, p. 810-822, 2016.

OSBORN, O.; OLFSKY, J. M. The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. **Nature medicine**, v. 18, n. 3, p. 363, 2012.

PARK J. M; PARK C. Y.; HAN S. N. High fat diet-Induced obesity alters vitamin D metabolizing enzyme expression in mice. *Biofactors* 2015; 41:175–182.

PEIXOTO, P. V. et al. Vitamin D poisoning in animals. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 7, p. 573-594, 2012.

PETERS, B. S. E.; MARTINI, L. A. Funções Plenamente Reconhecidas de nutrientes-Vitamina D. **Brasil: International Life Sciences Institute Brasil (ILSI), 2014.**

PETERSON, C. A.; HEFFERNAN, M. E. Serum tumor necrosis factor-alpha concentrations are negatively correlated with serum 25 (OH) D concentrations in healthy women. **Journal of Inflammation**, v. 5, n. 1, p. 10, 2008.

PORET, J. M. et al. High fat diet consumption differentially affects adipose tissue inflammation and adipocyte size in obesity-prone and obesity-resistant rats. **International Journal of Obesity**, v. 42, n. 3, p. 535, 2018. doi: 10.1038/ijo.2017.280.

RAMOS-NINO, M. E. The role of chronic inflammation in obesity-associated cancers. **ISRN oncology**, v. 2013, 2013.

RICQUIER, D. Fundamental mechanisms of thermogenesis. **Comptes rendus biologies**, v. 329, n. 8, p. 578-586, 2006.

ROSINI, T. C et al.. Obesidade induzida por consumo de dieta: modelo em roedores para o estudo dos distúrbios relacionados com a obesidade. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 58, n. 3, p. 383-387, 2012.

SAMUEL S.; Sitrin M. D. Vitamin D's role in cell proliferation and differentiation. **Nutrition reviews**, v. 66, p. S116-S124, 2008..

SAPER, C. B.; Chou, T. C.; Elmquist, J. K. The need to feed: homeostatic and hedonic control of eating. **Neuron**, v. 36, n. 2, p. 199-211, 2002.

SHI, H. et al. $1\alpha, 25$ -Dihydroxyvitamin D₃ modulates human adipocyte metabolism via nongenomic action. **The FASEB journal**, v. 15, n. 14, p. 2751-2753, 2001.

SIGMUNSDOTTIR, H. et al. DCs metabolize sunlight-induced vitamin D₃ to program T cell attraction to the epidermal chemokine CCL27. **Nature immunology**, v. 8, n. 3, p. 285, 2007.

SILVA Jr, A. J. Adipocinas-A relação endócrina entre obesidade e diabetes tipo II. **RBONE-Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento**, v. 11, n. 63, p. 135-144, 2017.

SLUSHER, A. L.; McAllister, M. J.; Huang, C. J. A therapeutic role for vitamin D on obesity-associated inflammation and weight-loss intervention. **Inflammation Research**, v. 64, n. 8, p. 565-575, 2015.

TEIXEIRA, C. S. L. TNF-alfa e metabolismo do adipócito. 2015. **Tese de Doutorado**. Disponível em <<http://hdl.handle.net/10400.26/10984>> acesso em 17/04/2017

WAMBERG, L. et al. Expression of vitamin D-metabolizing enzymes in human adipose tissue—the effect of obesity and diet-induced weight loss. **International Journal of Obesity**, v. 37, n. 5, p. 651-657, 2013.

WILLIAMSON, R. T. On the treatment of glycosuria and diabetes mellitus with sodium salicylate. **British medical journal**, v. 1, n. 2100, p. 760, 1901.

WILLIS, K. S. et al. Vitamin D status and biomarkers of inflammation in runners. **Open access journal of sports medicine**, v. 3, p. 35, 2012.

5. ARTIGO CIENTIFICO 1

Vitamin d supplementation attenuates obesity in rats fed on a cafeteria diet

Authors: Maiara Mikuska Cordeiro¹; Patrícia Bubna Biscaia ²; Janaini Brunoski³; Gilson César Nobre Franco¹ and Dionizia Xavier Scomparin^{1*}

¹ State University of Ponta Grossa, Department of General Biology

² State University of Ponta Grossa, Department of Pharmacy

³ State University of Ponta Grossa, Department of Nursing and Health

ABSTRACT: In the present study, we analyzed morphological and metabolic alterations in rats supplementation of vitamin D₃ and their consequences to diet on following an inadequate diet. To evaluate the effect of vitamin D₃ supplementation on obesity in rats maintained on a diet rich in carbohydrates. Wistar rats were obtained from in the State University of Ponta Grossa (protocol submitted to the CEUA, number 030/2017). At 21 days of age, the animals were randomly divided into 4 groups (n = 12). One group was designated as CONTROL and received commercial fed throughout the procedure; another group, denominated OBESO, received a diet consisting of processed foods. Two other groups received either the control or the processed food diets were supplemented with 800 IU / day Vitamin D₃, from 60 days to 90 days of age. The diet of the cafeteria caused an increase in the abdominal circumference in the OBESO group, along with this data we have the white fat stores indicating an increase in them for the OBESO group besides presenting higher values of final body weight and reading index, all attributed as parameters of indication of obesity. Vitamin D supplementation reduced the final body weight of the OBESO group (p=0.0006), there were also reduction in fat stores was also associated with vitamin D supplementation in OBESO rats, suggesting an ability to prevent obesity (p= 0.0001). In the present study, it was verified the lipid profile, in the group OBESO+VIT D animals presented decreased circulating LDL cholesterol and increased HDL cholesterol (p<0.0001), indicating action of vitamin D on the lipidic profile (p<0.0001). The diet of the refectory promoted increased cytokines as measured in this study was TNF- α . Animals from the OBESO+VIT D₃ group presented a reduction in this parameter evaluated. The levels of leptin were also elevated in the group OBESO, already in the group OBESO+VITD₃ supplementation led to a reduction in the serum concentration of this hormone. Vitamin D₃ supplementation has an effective therapeutic potential based on the present study data, is also effective in delaying the development of the disease, and has an important potential for further studies.

Key words: obesity; cafeteria diet; metabolic syndrome; hypocalcemia; Vitamin d supplementation

5.1. INTRODUCTION

Obesity is considered to be a worldwide syndrome and has demonstrated an alarming growth in recent decades. This is a complex disease with a multifactorial etiology that is associated with the risk of premature death due to several associated clinical conditions, such as cardiovascular and metabolic changes. The increase in the prevalence of obesity has attracted the attention of health professionals and researchers in the area (BELEGRI et al., 2018). Many population studies have shown that excess adipose tissue, especially in the abdominal region, is closely related to the risk of cardiovascular complications, such as the development of coronary artery diseases and arterial hypertension (MOEHLECKE et al., 2015).

Increases in adipose tissue have been related to vitamin D deficiency; evidence demonstrates associated vitamin D deficiency in obese individuals, however the mechanisms involved in this relationship have not been clarified (BLUMBERG et al., 2006; NIMITPHONG et al., 2012). Vitamin D is well known for its action on bone tissue and the normal maintenance of calcium and phosphorus in the body. In humans, the main source of vitamin D is cutaneous synthesis, and the remainder is obtained by means of nutrition and use of supplements (SHANMUGALINGAM et al., 2014; VINH QUỐC LƯƠNG; NGUYỄN, 2013). One hypothesis for the low levels of vitamin D in obese individuals is that the local production of 1, 25 (OH) 2D 25- hydroxyvitamin D [25 (OH) D], catalyzed by 1 α -hydroxylase or CYP27B1, may be diminished by unknown factors that reduce the concentrations of this substance. Another hypothesis that may explain low levels of vitamin D3 in obese individuals is that their higher body fat content may act as a reservoir for vitamin D, due to its liposolubility, sequestering this vitamin and reducing its bioavailability (BLUM et al., 2008; BARCHETTA et al., 2013).

A worrying factor regarding the bioavailability of the prohormone of vitamin D is that a positive feedback is triggered in the hypothalamus, hampering increases in energy, and resulting in the increase of the hunger sensation and the reduced energy expenditure contributing further to obesity (NI; SMOGORZEWSKI; MASSRY, 1994; CUNHA et al., 2015).

Vitamin D supplementation may be important for controlling body weight and improving glycemic and calcium homeostasis, PTH, phosphorus and other endocrine actions related to vitamin D3. Italy's study shows the benefits of vitamin D

supplementation. Individuals supplemented with doses of 100 or 50 thousand IU vitamin D presented reduced fat stores (WAMBERG et al., 2013). Supplementation may be an important tool for reducing the metabolic and morphometric profiles of obesity. Therefore, the objective of this study was to verify the effect of vitamin D₃ supplementation on obesity in rats maintained on a cafeteria diet.

5. 2. MATERIALS AND METHODS

5. 2.1 *Experimental animals and ethical approvals*

Rats of the *Rattus norvegicus* species of the Wistar lineage were used in this experimental study. The study was previously evaluated and approved by the Committee for Ethics in Animal Experimentation (CEUA #030/2017), of the State University of Ponta Grossa (UEPG), in accordance with animal welfare act guidelines. The animals were obtained from the central animal house of the State University of Ponta Grossa at 21 days of life. Animals were housed in standard cages at 21°C on a 12-hour light, 12 hour-dark cycle.

The procedures and methods performed with the animals were followed by the ARRIVE Guidelines and the procedures for the euthanasia of animals followed the norms of the American Veterinary Medical Association's Guidelines on Euthanasia.

5. 2.2 *Experimental design*

On the 21st day of age, the animals were placed in separate cages, maintaining 3 animals per cage (Gomes et al., 2012). Animals were randomly divided into two groups: Control (n=22); animals that received commercial ration and water: and Obese (n=24); animals that received a cafeteria diet in which they consumed foods rich in simple carbohydrates (Table 1). At 60 days of age, the animals were divided again in more two groups , vitamin D₃ supplementation (+Vit D₃) or not supplementation D₃ (-Vit D₃). As such, four groups were formed: Obese without vitamin D₃ supplementation, Control without supplementation, Obese + Vitamin D₃ and Control + Vitamin D₃.

Table 5.1 Menu of supply of hypercaloric foods.

(conclusion)

| Food | Amount (g) | Calories (kcal) | Carbohydrate (g) | Protein (g) | Fat (g) | Sodium (Mg) |
|--------------|------------|-----------------|------------------|-------------|---------|-------------|
| CRACKER | 1 | 4.30 | 0.73 | 0.07 | 0.12 | 4.33 |
| COKE SODA | 1 | 0.42 | 0.11 | 0.00 | 0.00 | 0.05 |
| Total | 12 | 34.17 | 5.47 | 1.2 | 1.29 | 24.86 |

Source: Based on data provided by the authors

5.2.5 Vitamin D₃ administration

Vitamin D₃ (800 IU / day) was diluted in canola oil, as this substance has a low saturated fat content and a high content of polyunsaturated fats, composed predominantly of oleic acid, with a content of 58% (comparable to olive oil) and 10% linolenic acid (comparable to that found in soybean oil) (NELSON & COX, 2014). Supplementation occurred from 60 to 90 days of life of the animals.

5.2.6 Obesity and euthanasia

To evaluate obesity onset, 91-day-old rats were euthanized by decapitation. The euthanasia method used was guillotine decapitation, the use of anesthetic changes the glycemic profile (De Oliveira et al. 2013) and to perform this work the glycemic data are relevant. Periepididymal fat pads, retroperitoneal fat pads and mesenteric fat pads were removed, washed, and weighed to estimate obesity.

5.2.7 Biometric parameters

Naso-anal length (cm) was measured and tissues and organs were removed immediately after euthanasia. The naso-anal lengths and body weights were used to calculate the Lee Index (body weight [g]^{1/3}/ naso-anal length [cm] x 1000), which is an indicator of obesity in rodents.

5.2.8 Serum analysis

After euthanasia, blood was collected in sterile tubes and immediately centrifuged. Plasma samples obtained from centrifugation were used for biochemical measurements of glucose, triglycerides, total cholesterol, calcium by enzymatic colorimetric methods.

The measurements of TNF- α and leptin were dosed for method Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), the according to manufacturer's protocol. Measurement for cytokine TNF- α was preprotech© kit (catalog 900-k73 Lot: 0414073) and adipokine leptin used preprotech© kit (catalog 900-k76 Lot: 06080706). The plate reading occurred in apparatus Bio-Plex Systemn at reading at a wavelength of 405-650.

5.2.9 Statistical analysis

Initially, results were submitted to the Kolmogorov-Smirnove normality test. For parametric data, in the curve evolucion consuming utilized of test parametic ANOVA one-way and other parameters the two-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey post-hoc test was carried out for multiple comparisons among groups. All results are presented as means \pm standard errors of mean (SEM); $p < 0.05$ was considered as statistically significant. Graph pad Prism version 7.00 for windows was employed for analyses (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA).

We also used the "R" program for analysis the Principal Component Analysis (PCA) as a multivariate statistical method. It analyzes consecutively, matrices of variance-covariance and correlations also determination of eigenvalues and eigenvectors of these matrices. We performed main component analysis (PCA) for four highly correlated obesity phenotypes (body mass index [BMI], fat stocks, metabolic profile leptin concentration and citocine TNF- α).

5.3 RESULTS

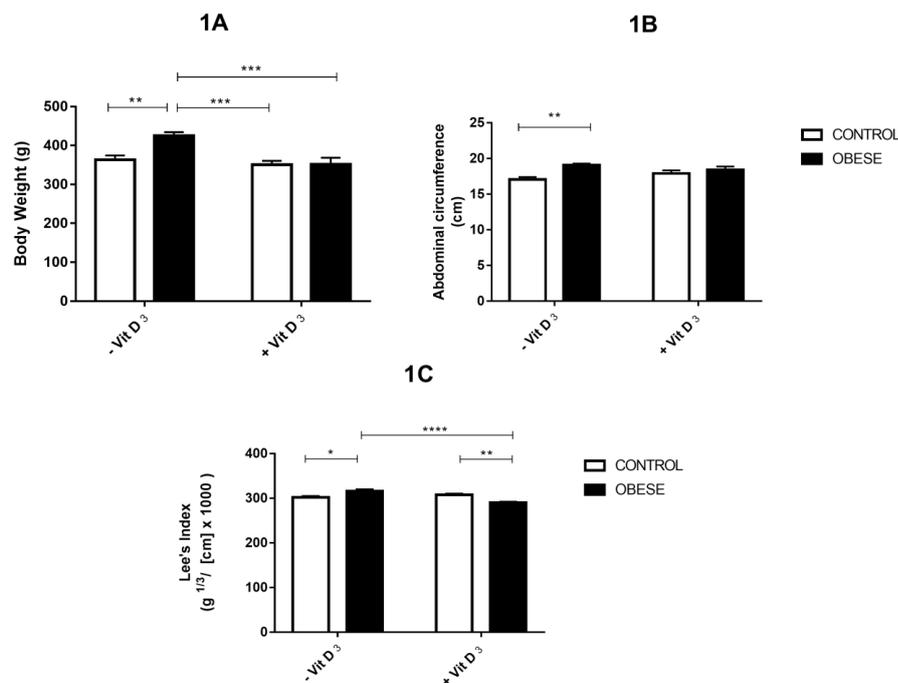
5.3.1 Morphological analysis

Two-way ANOVA showed that there was interaction between treatment and obesity for variable body weight [F (1,40) = 6.34 p = 0.0159]. Tukey's post-test showed that the animals fed on a cafeteria diet presented increased body weight [F

(1,40) = 6.663 p = 0.0136]. Obese animals had a weight gain of 14.53% greater than control animals and the cafeteria diet resulted in an increased waist circumference [F (1, 39) = 12.1 P = 0.0013], while Figure 1B showed that there was no difference in waist circumference in animals supplemented with vitamin D [F (1, 39) = 4.129 P = 0.0490, ANOVA].

Figure 1C shows the Lee Index of animals, two-way ANOVA showed an interaction between obesity and treatment [F (1, 39) = 23.23 P <0.0001], where Tukey's post test showed that the vitamin D supplementation promoted a reduction in the Lee index in the obese group [F (1, 39) = 9.756 P = 0.0034].

Figure 5.1- Effect of supplementation with Vitamin D3 on animals fed on a hypercaloric diet



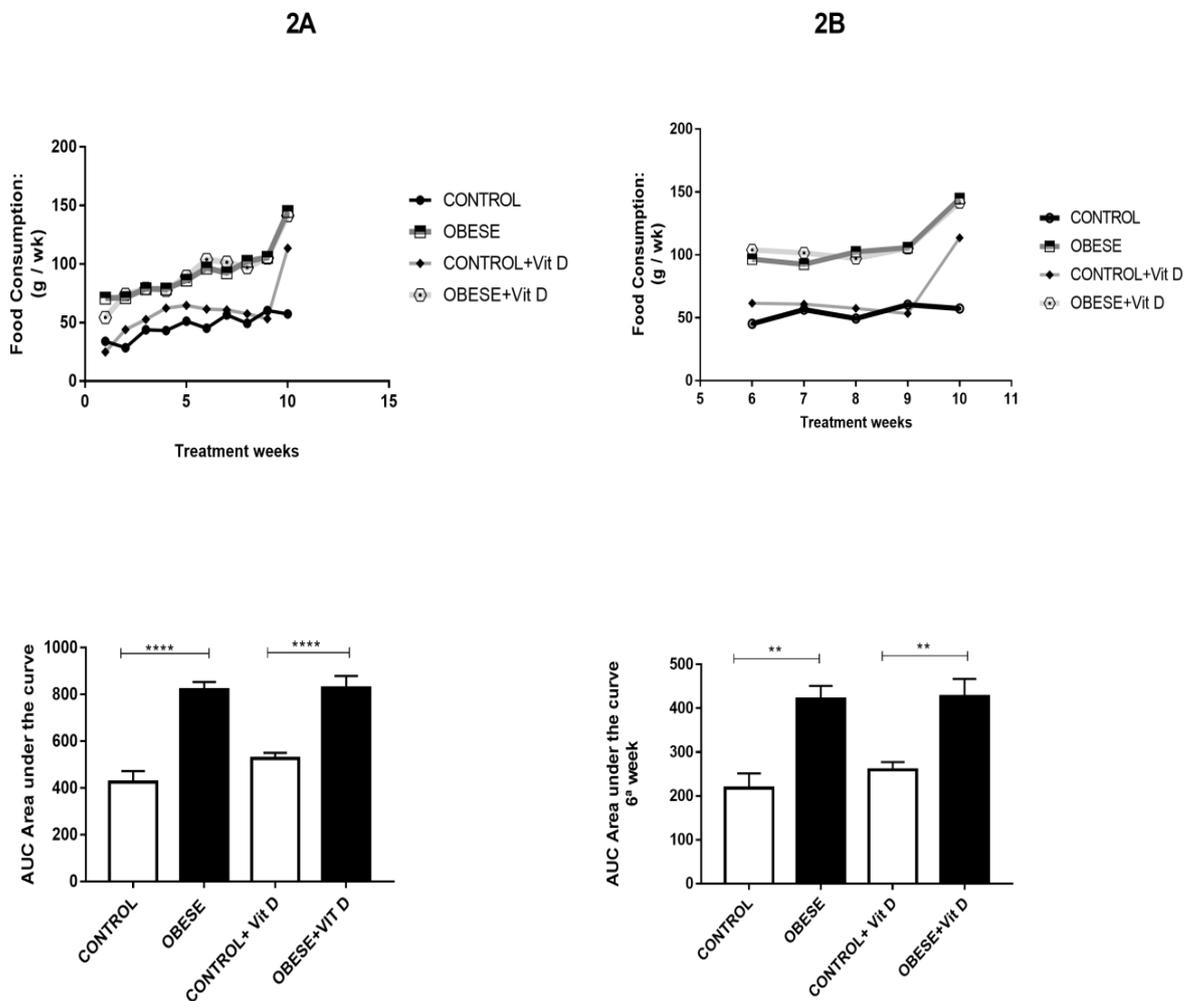
Subtitle: Morphometric parameters analyzed: final body weight, waist circumference and Lee index. Values are expressed as means \pm SEM; the symbol (*) indicates significant difference p 0.0296; (**) indicates significant difference, p 0.0033; the symbol (***) indicates significant difference, p <0.0009; the symbol (****) indicates significant difference, p <0.0001; by ANOVA two-way with post-Tukey test. **Font:** author (2018)

5.3.2 Food consumption in animals

Figure 2A shows the feeding curves for the animals during 13 weeks; one-way ANOVA followed by the Sidak post test demonstrated significant differences in food

ingestion in the obese animals ($p < 0.0001$), as also shown by the area under the curve (AUC). Figure 2B presents the analysis of the effects of vitamin D supplementation during the 6th to 10th weeks; significant differences were observed between the control groups without treatment and the obese animals treated, or not, with vitamin D, where an increase in food intake was observed for obese animals ($p < 0.0001$). There was no reduction in dietary intake for the control or obese animals when they were supplemented with vitamin D (Figure 2).

Figure 5.2- Effect of vitamin D supplementation on the amount of food ingested

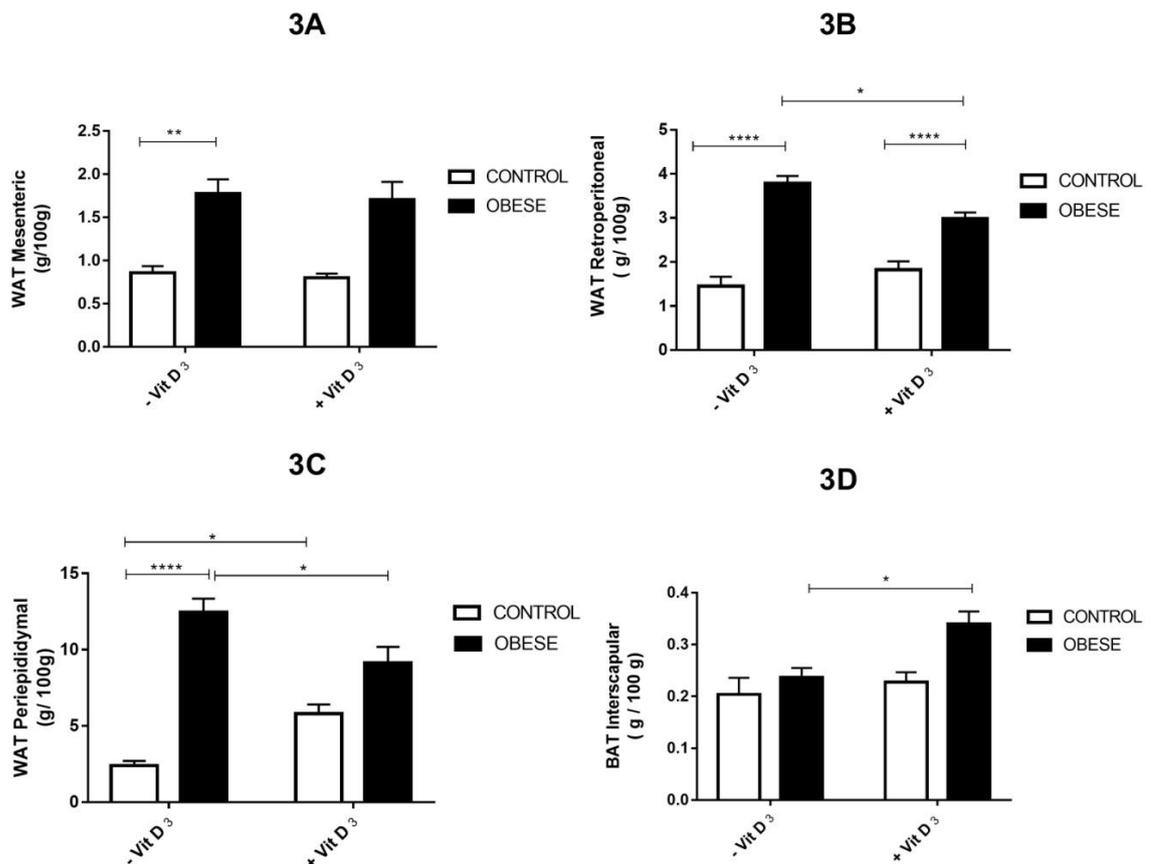


Subtitle: Parameter analyzed: Food intake during the 10-week treatment period. AUC = area under the curve in the control, control + Vit D, Obese and Obese + Vit D3 groups. Values are expressed as means \pm SEM. The amount of food consumed daily by the animals was calculated by the formula: amount of food placed - remaining quantity of food in the grid / number of days / number of animals in the box. The area under the curve of food ingested was also calculated during the period. The symbol (****) indicates significant difference, $p < 0.0001$; by two-way ANOVA with post-test of Tukey

5.3.3 Morphometric parameters of obesity: fat stocks

Figure 3A shows the mesenteric fat stocks of rats as percentages of body weight. Two-way ANOVA showed an interaction between these parameters [F (1, 31) = 4.909 P = 0.0342]. The post test showed that the cafeteria diet animals presented an increase in mesenteric fat content of approximately 2.5-fold, in relation to the control group [F (1,31) = 22.11, P <0.0001]. However, vitamin D supplementation was effective in reducing this fat stock by 59% [F (1,31) = 6.342, P = 0.0172]. The retroperitoneal fat stores were also evaluated and two-way ANOVA showed an interaction between obesity and fat stores [F (1, 36) = 9.666 P = 0.0037]. The post test showed that there is an influence of the obesity factor [F (1, 36) = 86.53 P <0.0001].

Figure 5.3 - Effect of Vitamin D supplementation on WAT and BAT fat stocks



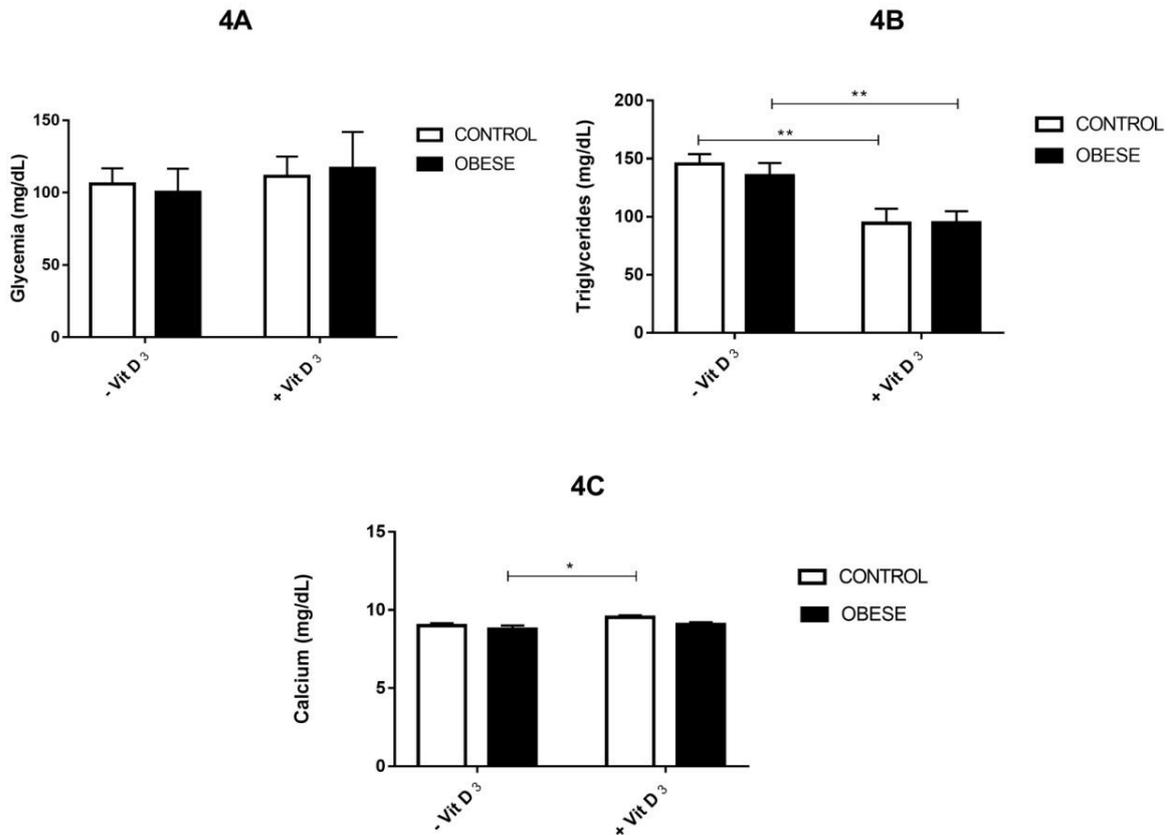
Subtitle: (A) Mesenteric WAT, (B) Retroperitoneal WAT, (C) Perigonadal WAT, (D) Interscapular adipose tissue BAT. Values are expressed as means \pm SEM; the scale used was based on the proportion of the value in grams of the fat stocks (g)/100 g body weight of the animal the symbol *, **, ***, **** indication difference, $p < 0.0001$; two-way ANOVA with post-Tukey test.

Two-way ANOVA showed an interaction between the periepididimal fat stocks and obesity [$F(1, 39) = 20.04$ $P < 0.0001$]. Vitamin D supplementation resulted in a reduction in the fat stores in the obese animals [$F(1, 39) = 78.41$ $P < 0.0001$], as observed in Figure 3C. Figure 3D shows the brown fat stocks of animals; a significant increase in the relative weight of brown fat stocks was observed in obese animals treated with vitamin D.

5.3.4 Vitamin d supplementation influences serum

Figure 4 shows the serum glucose, triglycerides and calcium levels for rats. Figure 4A shows that there were no statistical differences in fasting blood glucose between the groups. Vitamin D supplementation caused a reduction in serum triglyceride levels for both the control and obese groups (Figure 4B), where two-way ANOVA showed that only vitamin D supplementation was a significant factor [$F(1, 40) = 18.61$ $P = 0.0001$]. The Tukey post test showed that vitamin D supplementation reduced serum triglyceride levels in the control group ($p = 0.0081$) and in the obese group ($p = 0.0472$). Serum calcium data are shown in Figure 4C. Only the treatment factor influenced results ([$F(1, 30) = 19.38$ $P = 0.0001$]). The control group, when supplemented with vitamin D, presented a significant increase in serum calcium levels ($p = 0.0220$). When the obese group was submitted to supplementation, we also observed a slight increase in serum calcium levels ($p = 0.0179$).

Figure 5.4 - Effect of vitamin D supplementation on the biochemical parameters in control and obese rats



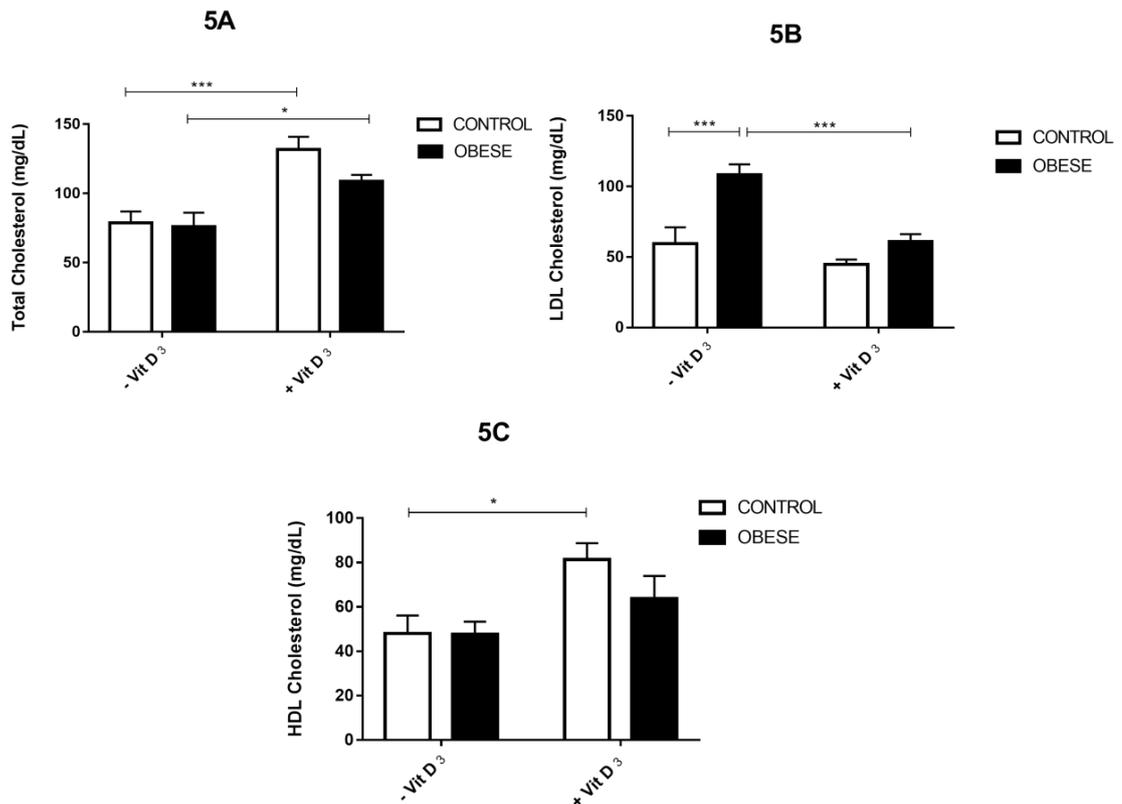
Subtitle: (A) Fasting blood glucose concentration; (B) blood triglycerides concentration ; (C) serum calcium concentration. Data represent means \pm SEM. The symbol (*) indicates a significant difference, $p=0.0296$; the symbol (**) indicates significant difference, $p=0.0033$; two-way ANOVA test with Tukey post-test.

Figure 5 depicts the lipid profile of the control and obese animals submitted to vitamin D supplementation. Two-way ANOVA showed that there was no interaction between the parameters of obesity and treatment [$F(1, 30) = 1,179$ ($P=0.2863$)]. Figure 5A shows that total cholesterol concentrations increased during vitamin D supplementation in control animals ($p = 0.0003$) and in obese animals ($p = 0.0446$), where two-way ANOVA demonstrated interference of the treatment variable in the observed results [$F(1.39) = 26.27$ ($P < 0.0001$)].

Verifying the type of cholesterol modified, a significant increase in HDL cholesterol was found in the control group treated with vitamin D, in relation to the non-supplemented control group ($P = 0.0241$). Figure 5B. With regard to LDL cholesterol, obese animals treated with vitamin D presented a significant decrease in

LDL cholesterol, when compared to non-supplemented obese animals ($P = 0.0008$)
Figure 5C.

Figure 5.5 - Effect of vitamin D supplementation on the lipid profile in control and obese rats



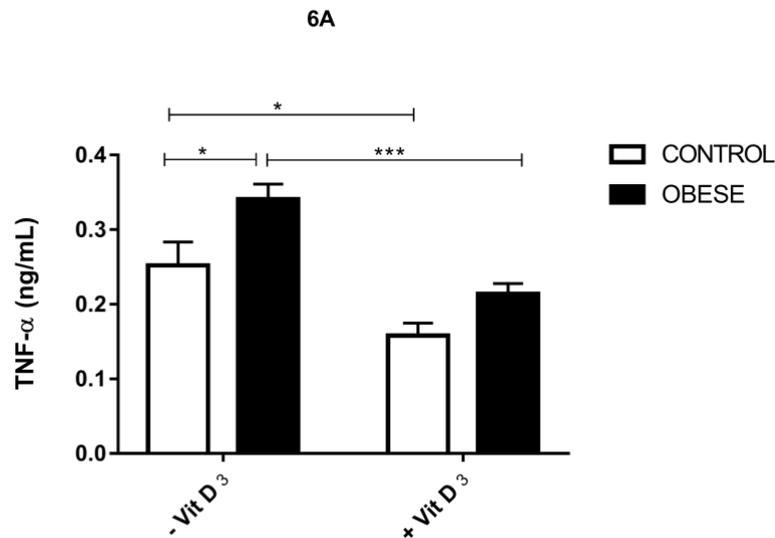
Subtitle: (A) Total Cholesterol, (B) HDL Cholesterol, (C) LDL Cholesterol. Data represent the means \pm SEM. The symbol (*) indicates a significant difference, $p=0.0296$; the symbol (**) indicates significant difference, $p=0.0033$; the symbol (***) indicates significant difference, $p=0.0009$; the symbol (****) indicates significant difference, $p < 0.0001$; two-way ANOVA with Tukey post-test.

5.3.5 Inflammatory profile

Two-way ANOVA found no interaction between the treatment and obesity variable for circulating tumor necrosis factor- α levels (TNF- α) [$F(1, 34) = 3.31$ ($P=0.0777$)]; however, obesity had an influence of 11% on TNF- α levels [$F(1.68) 8.959$ ($p = 0.00381$)], while supplementation reduced TNF- α by 12% in the samples [$F = (3.68)$ ($p = <0.0001$)]. Turkey's post-test showed that the pro-inflammatory cytokine, TNF- α , was increased in the control and obese groups not submitted to vitamin D supplementation. The non-supplemented obese group presented levels

that were 42% higher than those of the other groups studied ($p < 0.0001$). When comparing animals submitted to vitamin D treatment, we found a reduction of 51% in this index, both for control and obese rats (Figure 6A).

Figure 5.6 - Effect of vitamin D supplementation on inflammatory marker in animals obese e controls

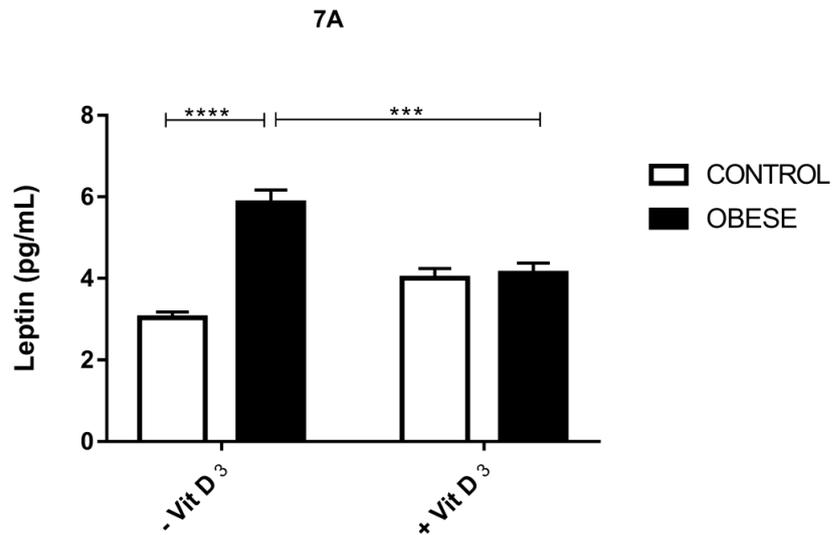


Subtitle: (A) plasma TNF- α (ng / dL). Values are expressed as means \pm SEM. The symbol (*) indicates significant difference, $p=0.0296$; the symbol (***) indicates significant difference, $p= 0.0009$; the symbol; by two-way ANOVA with post-Tukey test.

5.3.6 Adipokine leptin

With regard to plasma leptin, two-way ANOVA showed an interaction between the combination of the treatment and obesity variables [(F = 3.47 $p < 0.0001$)]. The combined variables had a 16% influence on the samples [F = (3.68) ($p < 0.0001$)]. Tukey's post-test showed that the control and obese animals presented significantly higher levels of circulating serum leptin. Furthermore, non-supplemented obese animals had the highest concentrations of serum leptin ($p = 0.0008$). In general, animals that received vitamin D supplementation presented lower serum leptin concentrations. When comparing non-supplemented OBESE animals with supplemented OBESE animals, there was a reduction of 30% in serum leptin, and this was also observed in the control animals, where a decrease of 23% in serum leptin was observed in the supplemented group (Figure 7A).

Figure 5.7- Effect of vitamin D supplementation on inflammatory marker in animals obese e controls



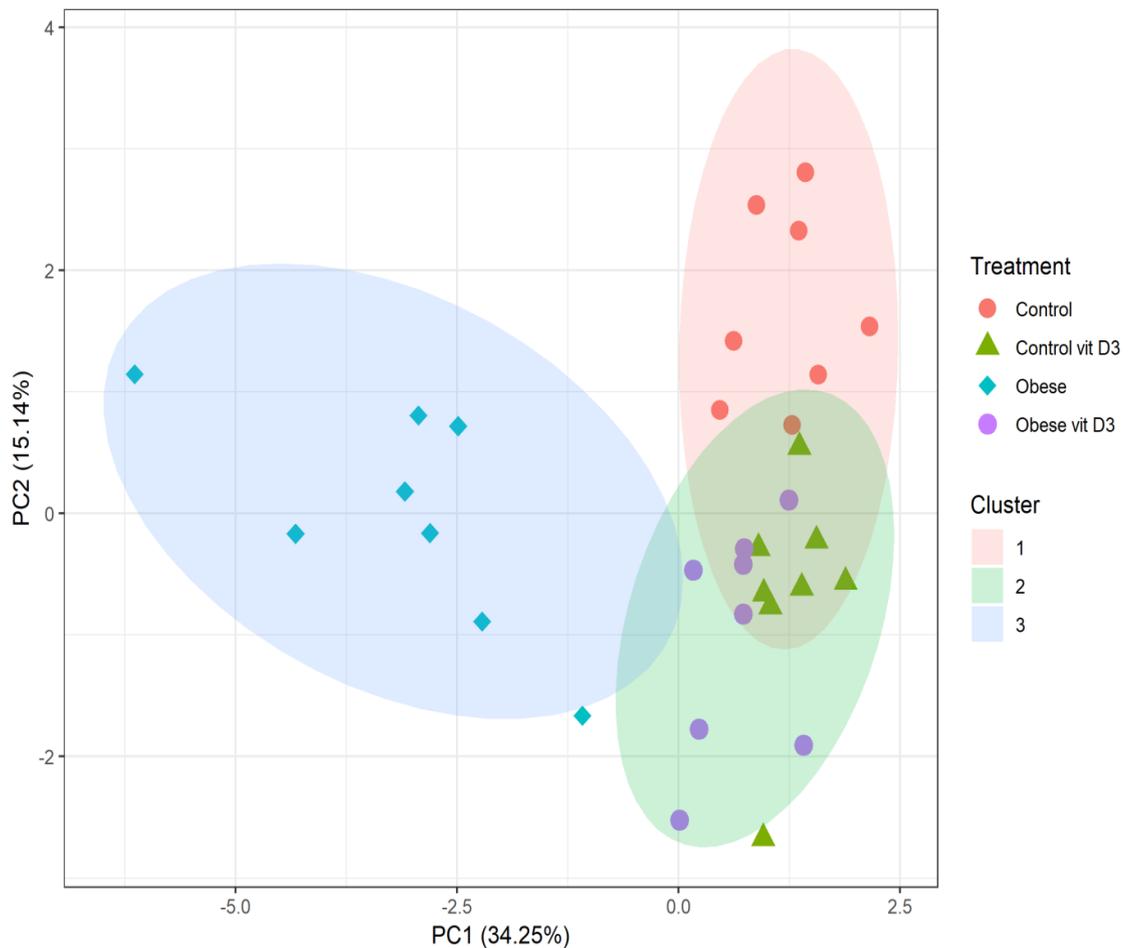
Subtitle: (A) leptin (pg / mL). Values are expressed as means \pm SEM. The symbol (***) indicates significant difference $p=0.0009$; by two-way ANOVA with post-test Tukey.

5.3.7 Principal component analysis (PCA)

In our study, the hypothesis tested was whether or not the dietary patterns of 48 sample, as derived from multivariate analysis, were related to the components of the metabolic syndrome. Specifically, using principal components analysis a given set of food-variables was transformed into a reduced set of uncorrelated food patterns (components). Then, using as dependent outcome the characteristics of the syndrome (ie, triglyceride level, high-density lipoprotein [HDL] cholesterol level, and waist circumference), the effect of the extracted food patterns was tested against the aforementioned characteristics. Componentes principais independentes (PC1 e PC2). Principal components analysis extracted six components that explained the 50% of the total variation the scores for the the different groups of nutritional patterns are represented by figure 8. the following components were derived: a healthful food pattern (component 1) control - which loaded heavily on low-fat, (2) obese- high glycemic index and high-fat pattern, (3); control vit D3- a pattern that is characterized by the intake de suplementation the vitamin D association with standard feed and (4) obese vit D3- characterized by hypercaloric foods intake associated with vitamin D3 supplementation. animals of the obese group, according

to PCA, are considered the most different group of the others in which the association between the components as body weight, fat percentage, lipid and metabolic index are related to the metabolic syndrome, being inversely correlated with obese group vit D3 and vit D control ($r = 0.73$, $P = 0.019$). Data shown in figure 6.8.

Figure 5.8- The Association between Food Patterns and the Metabolic Syndrome Using Principal Components Analysis (PCA)



Subtitle: Morphometric parameters analyzed: final body weight, waist circumference and Lee index. Blood analyzed: concentration leptin , TNF- α , lipid profile and metabolic disorders. Groups: control, obese, control vit D3, obese vit D3. Level of significance was 5%.

5.4. DISCUSSION

Metabolic homeostasis depends on mechanisms that control food intake and energy expenditure, and both processes are regulated by hypothalamic neurons (WANG et al., 2011). The habit of consuming as hyperlipidic or hypercaloric diets can be associated with the development of obesity, in our data, final body weights, Lee index, fat stocks demonstrate installation of obesity, because they present an increase in these parameters compared to the control group corroborating with Bortolin et al (2018), study in which it evidenced diet hypercaloric have the capacity to manifest the phenotype of overweight and obesity in individuals because foods have saturated long-chain fatty acids are considered the most harmful lipids, when accumulated, and can damage the hypothalamus by binding to toll-like receptors (TLR2 and TLR4) in the microglia, stimulating the production of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 and IL-6) and the consequent destruction of the neurons, compromising satiety and thermogenic control instincts (MILANSKI et al., 2009; RADA et al., 2018). Substantial evidence exists to support an important role for the TLRs in the pathogenesis of obesity. The expressions of TLR-2 and TLR-4 are increased in the adipose tissue of patients with obesity and type 2 diabetes mellitus (VINH QUỐC LƯƠNG; NGUYỄN, 2013; RHEE et al., 2013). As such, a diet rich in these fatty acids may cause an imbalance in the metabolic control of organisms (BELEGRI et al., 2017).

Our study demonstrates that obese animals treated with daily doses of vitamin D₃ presented lower values of body weight and Lee index, as well as reduced stocks of white fat. This may be due to an increase in energy expenditure, resulting from the activation of thermogenesis by vitamin D (SHIU et al., 2001). In studies similar to ours, vitamin D demonstrated effects on calcium levels, in turn increasing lipolysis through the activation of uncoupling protein (UCP2), and modulating energy metabolism in a shift from stored energy to energy expenditure. As a result, lipogenesis and lipolysis are decreased and increased, respectively, due to the activation of intracellular calcium (SHI et al., 2001; ZHU et al., 2013; FARHANGI et al., 2016).

In relation to the metabolic profile, vitamin D supplementation did not change the serum concentration of glucose, suggesting that high concentrations of insulin may be present, similarly to observations in other studies (SISLEY et al., 2016;

NAEMI et al., 2017). Vitamin D supplemented control animals presented increased calcium levels, suggesting that different factors contribute to calcium metabolism. Vitamin D generation occurs as a response to low calcium concentrations, so increased calcium levels are observed when circulating levels of the pro-hormone of vitamin D are high, in addition to increased fat oxidation, promoting apoptosis of fat cells and reducing the absorption of lipids due to the formation of insoluble fatty acid-calcium structures in the gut (SHI et al., 2001; NING et al., 2015). Additionally, increases in serum calcium suppress the production of 1,25-dihydroxyvitamin D (1,25- (OH) ₂ D) levels, decreasing intracellular calcium influx. These changes stimulate lipolysis and inhibit lipogenesis in the adipocyte (LI et al., 2008; CORDEIRO; RAMALHO, 2017). Finally, calcium can modulate appetite control and play a role in facilitating vitamin D supplementation-induced fat loss by acting indirectly on calcium concentrations (CHANG; KIM, 2017).

With regard to the lipid profiles of the animals, total cholesterol increased in those animals supplemented with vitamin D; the analysis of the types of cholesterol revealed that HDL cholesterol was increased, while LDL cholesterol was decreased by supplementation. Thus, in addition to the improvement in body weight and reduction in fat stocks, the lipid profile was ameliorated in obese animals that were given vitamin D. Major et al (2008) reported similar findings to our results in a study in which humans received calcium supplementation, observing a reduction in LDL-cholesterol concentration in individuals possible according to the study due to the ability of this mineral (calcium) to increase the conversion of cholesterol to bile acids and augmentation cholesterol excretion.

In addition, an increase in intracellular calcium in hepatocytes has been shown to stimulate microsomal triacylglyceride transfer protein (MTP) a protein implicated in the formation and secretion of VLDL (NING et al., 2015). Therefore, we suggest that the increase in the hepatocellular calcium would also be inhibited, increasing the intake of calcium, and, in turn, the VLDL-induced increases in triglycerides and LDL cholesterol would be reduced, as observed herein (SHI et al., 2001; ZHU et al., 2013).

Vitamin D supplementation also reduced pro-inflammatory circulating TNF- α in both control and obese rats. An in vitro study found that vitamin D reduces the cell surface expression of TLR-2 and TLR-4 on monocytes and macrophages in culture,

through the activation of MKP-1, resulting in the subsequent reduction of TNF- α and IL-6 production and inflammatory markers (LI et al., 2013).

Recently, a study investigating different diets, in association with vitamin D supplementation, found that vitamin D has a neuroprotective and cardiac profile, since the analogous forms of vitamin D, 1, 25 (OH) 2 D 3 and 25 (OH) D 3, inhibit lipopolysaccharide-induced phosphorylation of p38, reducing TNF- α and monocyte chemoattractant protein (MCP-1), demonstrating anti-inflammatory effects of vitamin D (FARHANGI et al., 2017).

Additionally, vitamin D can interact with adiponectins and leptin, and under certain circumstances can control the action of vitamin D in turn influencing adipogenesis, and the conversion of 25 (OH) D to 1,25 (OH) 2 D, thereby increasing the concentration of this prohormone (MATSUNUMA; HORIUCHI, 2007). Leptin cytokine is secreted by white adipose tissue, and its concentration is related to the amount of adipose tissue present. In our study, we observed a reduction in the circulating levels of leptin in vitamin D supplemented animals, possibly due to the effects of vitamin D on the peptide neuropeptide Y (NPY) / Agouti (AgRP) inhibition system, through increased activation of neurons in the arcuate nucleus (ARC) of the hypothalamus expressing pro-opiomelanocortin (POMC) (NOBRE et al., 2018). Leptin also stimulates other anorexigenic peptides, such as corticotropin releasing hormone (CRH) and CART, resulting in the metabolic effects of prolonged action and reduction of food intake, and increasing energy expenditure (MOEHLECKE et al., 2015). So, the reduction in adipose tissue showed decrease in leptin levels.

Based on the consideration of all the metabolic dysfunctions evaluated here, ie, inflammation, fasting hyperleptinemia, fasting hyperglycemia, and dyslipidemia we conclude that these obesity related disorders were induced with great efficiency in rats fed a high calorie diet (SHRESTHA et al., 2015).

Based on the consideration of all the metabolic dysfunctions evaluated here, ie, inflammation, fasting hyperleptinemia, fasting hyperglycemia, and dyslipidemia we conclude that these obesity related disorders were induced with great efficiency in rats fed a high calorie diet. Besides that, most of these risk markers share an ongoing relationship. Large meta-analyses do not end up confusing or the value of some sample becomes devalued, in the strategy of using all viable data to multi-analysis using the main components simultaneously incorporates variable markers used to measure a risk factor, is less dependent on the population distribution of the

variable, and can be used to to characterize continuous risk factors. In conclusion, obese animals without supplementation showed a greater relationship with these risk factors than the other groups. Such evidence has already been studied by other researchers such as Razak and collaborators (2007) who verified by means of PCA nutritional standards in the world population what are the definitions for each population. Already in another study carried out in Asia, they verified the foods that provide the increase in adipose tissue as well as the relation between the risk factors, in which they verified that industrialized and highly palatable foods have a greater relation with increase of BMI as well as of metabolic and lipidic alterations (SHRESTHA et al., 2015).

Thus concluding that animals without vitamin D supplementation associated with an inadequate diet favor the onset of endocrine metabolic diseases and possibly the appearance of aggravating clinical conditions. The treatment with vitamin D seems to have encouraging effects on the parameters studies, are relevant data that should be explored more in order to verify in a concrete way the pathways of activation patra better understanding and understanding about the subject.

5.5 CONCLUSION

We, herein, show that vitamin D supplementation in obese and control animals resulted in weight loss and reduction of fat stores, as well as improvements in the metabolic and lipid profiles. Supplementation reduced LDL-cholesterol, a finding that could be important for the prevention of heart diseases. Vitamin D presented anti-inflammatory effects, in addition to its neuroprotective and cardiac effects, probably due to the regulation of adipokines, such as leptin. Thus, our findings indicate that vitamin D supplementation improves a number of pathophysiological mechanisms associated with obesity, and may represent an important approach for this disorder.

5.6 REFERENCES

- BARCETTA, I. et al. Hypovitaminosis D is independently associated with metabolic syndrome in obese patients. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e68689, 2013.
- BELEGRI E. et al. The effects of overnight nutrient intake on hypothalamic inflammation in a free-choice diet-induced obesity rat model, **Appetite**, 2017. .
- BLUM, M. et al. Vitamin D3 in fat tissue. *Endocrine*, v. 33 n.1, p. 90-94, 2008.
- BLUMBERG, J. M. et al. Complex role of the vitamin D receptor and its ligand in adipogenesis in 3T3-L1 cells. **The Journal of Biological Chemistry, Baltimore**, v. 281, p. 11205-11213, 2006.
- BORTOLIN, R. et al. A new animal diet based on human Western diet is a robust diet-induced obesity model: comparison to high-fat and cafeteria diets in term of metabolic and gut microbiota disruption. **International Journal of Obesity**, v. 42, n. 3, p. 525, 2018.
- CHANG, E.; KIM, Y. Vitamin D insufficiency exacerbates adipose tissue macrophage infiltration and decreases AMPK/SIRT1 activity in obese rats. **Nutrients**, v. 9, n. 4, p. 338, 2017.
- CORDEIRO, A.; RAMALHO, A. Vitamin D Status in Obesity: Relation with Expression of Vitamin D Receptor and Vitamin D Hydroxylation Enzymes in Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue. In: **Adiposity-Omics and Molecular Understanding**. IntechOpen, 2017.
- CUNHA, K. A. D. et al. Calcium intake, serum vitamin D and obesity in children: is there an association? **Revista Paulista de Pediatria**, vol. 33 n.2, p. 222-229, 2015.
- DAVID, L. N.; COX, M. Princípios de bioquímica de Lehninger. **6ª edição. Porto Alegre: Artmed Editora**, 2014.
- FARHANGI, M. A. et al. Major components of metabolic syndrome and nutritional intakes in different genotype of UCP2- 866G/A gene polymorphisms in patients with NAFLD. **Journal of translational medicine**, v. 14, n. 1, p. 177, 2016.
- FARHANGI, M. A. et al. The effects of vitamin D administration on brain inflammatory markers in high fat diet induced obese rats. **BMC neuroscience**, v. 18, n. 1, p. 81, 2017.
- GOMES, R. M. et al. Efeito de um programa de exercício físico moderado em ratos de diferentes modelos de obesidade. **Journal of Physical Education**, v. 23, n. 2, p. 285-294, 2012.

LI B. et al. 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 suppresses TLR8 expression and TLR8-mediated inflammatory responses in monocytes in vitro and experimental autoimmune encephalomyelitis in vivo. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e58808, 2013.

LI, J. et al. 1α , 25-Dihydroxyvitamin D hydroxylase in adipocytes. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 112, n. 1-3, p. 122-126, 2008.

MAJOR, G. C. et al. Calcium plus vitamin D supplementation and fat mass loss in female very low-calcium consumers: potential link with a calcium-specific appetite control. **British journal of nutrition**, v. 101, n. 5, p. 659-663, 2008.

MATSUNUMA, A.; HORIUCHI, N. Leptin attenuates gene expression for renal 25-hydroxyvitamin D3- 1α -hydroxylase in mice via the long form of the leptin receptor. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 463, n. 1, p. 118-127, 2007.

MILANSKI, M. et al. Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *Journal of Neuroscience* v. 29, n.2, p.359-70, 2009.

MOEHLECKE, M. et al. Determinants of body weight regulation in humans. **Archives of endocrinology and metabolism**, v. 60, n. 2, p. 152-162, 2016.

MORRIS, K. L.; ZEMEL, M. B. 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 Modulation of Adipocyte Glucocorticoid Function. *Obesity research*, v. 13, n. 4, p. 670-677, 2005

NAMENI, G. et al. The impact of vitamin D supplementation on neurodegeneration, TNF- α concentration in hypothalamus, and CSF-to-plasma ratio of insulin in high-fat-diet-induced obese rats. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 61, n. 2, p. 247-255, 2017.

NI, Z. H. E. N. M. I. N.; SMOGORZEWSKI, M.; MASSRY, S. G. Effects of parathyroid hormone on cytosolic calcium of rat adipocytes. **Endocrinology**, v. 135, n. 5, p. 1837-1844, 1994.

NIMITPHONG H. et al. 25-Hydroxyvitamin D3 and 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Promote the Differentiation of Human Subcutaneous Preadipocytes. **PLoS ONE** v. 7 n.12, p. e52171, 2012. doi:10.1371/journal.pone.0052171

NING, C. et al. Lipid metabolism and inflammation modulated by Vitamin D in liver of diabetic rats. **Lipids in health and disease**, v. 14, n. 1, p. 31, 2015.

NOBRE, J.L. et al. Leptin blocks the inhibitory effect of vitamin D on adipogenesis and cell proliferation in 3T3-L1 adipocytes, **General and Comparative Endocrinology** v. 266, p. 1-8, 2018.

RADA, I. et al. Toll like receptor expression induced by exercise in obesity and metabolic syndrome: A systematic review. **Exercise immunology review**, v. 24, 2018.

REIS, J. P.; VON MÜHLEN, D.; MILLER, E. R. Relation of 25-hydroxyvitamin D and parathyroid hormone levels with metabolic syndrome among US adults. **European Journal of Endocrinology**, v. 159, n. 1, p. 41-48, 2008.

RHEE, E. J. et al. High serum vitamin D levels reduce the risk for nonalcoholic fatty liver disease in healthy men independent of metabolic syndrome. **Endocrine journal**, p. EJ12-0387, 2013

SHANMUGALINGAM, T. et al. Obesity and cancer: the role of vitamin D. **BMC cancer**, v. 14, n. 1, p. 712, 2014.

SHI, H. et al. $1\alpha, 25$ -Dihydroxyvitamin D₃ modulates human adipocyte metabolism via nongenomic action. **The FASEB journal**, v. 15, n. 14, p. 2751-2753, 2001.

SISLEY S. R. et al. Hypothalamic vitamin D improves glucose homeostasis and reduces weight. **Diabetes**, v. 65, n. 9, p. 2732-2741, 2016.

VINH QUỐC LƯƠNG, K.; NGUYỄN, L. T. H. The beneficial role of vitamin D in obesity: possible genetic and cell signaling mechanisms. **Nutrition journal**, v. 12, n. 1, p. 89, 2013.

WAMBERG, et al. Expression of vitamin D-metabolizing enzymes in human adipose tissue—the effect of obesity and diet-induced weight loss. **International journal of obesity** v. 37, n. 5, p. 651-657, 2013.

ZHU, W. et al. Calcium plus vitamin D₃ supplementation facilitated Fat loss in overweight and obese college students with very-low calcium consumption: a randomized controlled trial. **Nutrition Journal** v. 12, n. 1, p. 8, 2013. doi:10.1186/1475-2891-12-8

6. ARTIGO CIENTIFICO 2

Exercício físico associado à suplementação de vitamina D traz benefício à obesidade estudo realizado em animais com dieta hipercalórica

Maiara Mikuska Cordeiro, Patrícia Biscaia Bubna, Janaini Brunoski, Gilson César Nobre Franco, Dionízia Xavier Scomparin

Resumo: A obesidade se caracteriza pelo acúmulo de tecido adiposo no organismo resultante do desequilíbrio entre a ingestão e gasto calórico. Sendo assim, uma forma de combater a obesidade é o exercício físico. **Objetivo:** Avaliar o efeito da associação com vitamina D e exercício físico sobre a adiposidade de animais obesos induzidos pela ingestão de dieta de cafeteria. **Método:** Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar, separados aleatoriamente em 3 grupos (n=12). Um grupo foi designado como None- animais que não realizaram nenhuma intervenção terapêutica. Exercitado- animais que realizam exercício físico durante todo o período de acompanhamento. Exercitados + vitamina D, em que juntamente com os o exercício físico tiveram suplementação de vitamina D3. Dentro desses grupos havia os animais chamados de CONTROLE, que receberam ração comercial durante todo o procedimento e OBESOS receberam dieta constituída por alimentos hipercalóricos. Os animais que receberam vitamina D durante o período de 60 aos 90 dias foram suplementados com doses diárias de 800 UI. Todos os animais foram submetidos ao exercício físico da natação livre dos 21 dias aos 90 dias de vida. Realizadas três sessões por semana por 15 minutos com carga extra de 5% do peso corporal. O peso e consumo alimentar, perfil lipídico metabólico e de inflamação foram avaliados durante 10 semanas. **Resultados:** A dieta de cafeteria provocou um aumento nos estoques de gordura retroperitoneal e perigonadal e mesentérica elevando também os níveis séricos de TNF- α , todavia a suplementação com a vitamina D3 reduziu esses índices, resultando na redução do perfil inflamatório e índices menores de circulação de leptina, uma citocina secretada pelo próprio tecido adiposo. A associação entre vitamina D3 e exercício físico provocou redução do tecido adiposo branco. Também resultou no aumento do tecido adiposo marrom, produz também um efeito de redução dos perfil lipídico e inflamatório, além de provocar melhoras na concentração de leptina. **Conclusão:** Com este trabalho concluí-se que há melhoras no desenvolvimento da obesidade em diferentes biótipos como visto em animais conhecidos como controles e obesos, bem como houve potencialização da atuação das intervenções terapêuticas utilizadas sendo essas o exercício físico e a suplementação de vitamina D, ambos conseguem atenuar as desordens metabólicas que a obesidade causa.

Palavras-chave: obesidade, dieta hipercalórica, vitamina D3, exercício físico.

6.1 INTRODUÇÃO

Nos últimos 50 anos, a obesidade se tornou um fenômeno mundialmente conhecido que afeta a vida de muitas pessoas, além de se tornar um dos mais importantes problemas de saúde pública afetando a qualidade de vida da população em geral. A obesidade não tem apenas um impacto psicológico, mas também é um importante fator de risco para outras doenças, isso porque, devido ao tecido adiposo ser um órgão dinâmico que secreta vários fatores, chamados de adipocinas. Eles estão relacionados, direta ou indiretamente, em processos que contribuem na aterosclerose, hipertensão arterial, resistência insulínica e diabetes tipo 2, dislipidemias, ou seja, representam o elo entre adiposidade, síndrome metabólica e doenças cardiovasculares aumenta os custos de saúde em países de todas as partes do mundo (HIGA et al., 2014; MANCINI et al., 2014).

Atualmente sabe-se que a obesidade está ligada a diversos fatores que à permeiam, a principal ocorrência para tal instalação se dá, por meio de uma desregulação metabólica, em que há aumento na reserva de energia em forma de lipídios (triacilgliceróis), proteínas e carboidratos (glicogênio) (MOEHLECKE et al., 2015).

Relacionado as comorbidades ocasionadas pela expansão do tecido adiposo devido a este fator há uma relação com os baixos níveis de vitamina D3, ao total mundial estima-se que um bilhão de pessoas no mundo possuam deficiência de vitamina D3 ocasionadas à vários fatores, como exposição solar insuficiente, uso prolongado de roupas que cobrem totalmente o corpo, idade, e pelo baixo consumo de alimentos que contenham ergocalciferol (isoforma da vitamina D)

Com o aumento das reservas energéticas o tecido adiposo aumenta de forma excessiva resultado em instalação da obesidade. Na tentativa de retardar o desenvolvimento da obesidade, várias alternativas têm sido amplamente estudada pela comunidade científica.

Recentemente mostrou-se a relação entre obesidade e hipovitaminose D, achados demonstram que indivíduos obesos apresentam redução na biodisponibilidade de vitamina D devido ao aumento do tecido adiposo (BLUMBERG et al., 2006). Foram formuladas algumas hipóteses para tais evidências e dentre as mais aceitas seria um sequestro dessa vitamina pelo próprio tecido adiposo (SHI et

al. 2001; BLUMBERG et al. 2006). Dessa forma uma suplementação com vitamina D, poderia ser um passo para reestabelecer a homeostase de um organismo obeso.

Recentemente a comunidade científica vem estudando o papel da vitamina D com um fator antiobesidade, entretanto ainda não existem dados conclusivos sobre o seu real papel. Neste sentido a existência de dados na literatura sobre a associação de vitamina D e a prática regular de exercício físico ainda são escassos e inconclusivos.

Dessa forma o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da associação de vitamina D com a prática regular de exercício físico como a natação em animais obesos obtidos pela ingestão de dieta de hipercalórica

6.2. MATERIAIS E MÉTODOS

6.2.1 Animais

Foram utilizados ratos machos com 21 dias de vida da linhagem Wistar, alocados em caixas para roedores, com cama de maravalha, em condições de temperatura controlada de $21 \pm 2^\circ\text{C}$, com luminosidade em ciclo claro/escuro de 12 horas, alimentados com ração comercial balanceada e água potável *ad libitum*. O Estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animais da Universidade Estadual de Ponta Grossa, Protocolo número 030/2017.

6.2.2 Divisão dos grupos

Ao 21º dia de vida os animais foram dispostos em gaiolas separadas, mantendo 3 animais por gaiola (GOMES et al, 2012), sendo assim divididos aleatoriamente em 3 grupos: NONES animais que não tiveram intervenções terapêuticas, neste caso sem exercício físico ou suplementação de vitamina D. EXERCITADOS: Animais que realizam o exercício precoce na idade de 21 dias até os 90 dias de vida. EXERCITADOS + VIT D: Animais que realizaram o exercício físico e foram suplementados dos 60 dias até os 90 dias de vida com vitamina D3. Dessa maneira dentro destes grupos foram subdivididos em animais CONTROLE: animais receberam ração comercial e OBESO: animais que receberam dieta de cafeteria. O fluxograma abaixo esquematiza a distribuição dos grupos experimentais.

6.2.3 Suplementação de vitamina D₃

A Vitamina D₃ (800 UI/dia) foi diluída em óleo de canola (1mL), considerando que sua composição possui baixa de gordura saturada e um alto teor de gorduras poli-insaturadas composto predominantemente por ácido oleico com teor de 58% comparável ao azeite de oliva e 10% de ácido linolênico, comparável ao encontrado no óleo de soja (Nelson & Cox, 2014). A suplementação ocorreu dos 60 aos 90 dias de vida dos animais.

6.2.4 Dieta de cafeteria

A dieta de cafeteria foi ofertada *ad libitum* diariamente ao grupo OBESO a partir do 31º dia de vida. Os itens que compõem a dieta foram agrupados em três combinações distintas ofertadas alternadamente (A, B, C – Tabela 6.1).

Tabela 6.1 - Alimentos ofertados durante indução à obesidade

| ALIMENTOS | CARDÁPIO A | | | | | |
|----------------------------|------------|--------|-----------------|--------------|--------------|---------|
| | Qtd (g) | Kcal/g | Carboidrato (g) | Proteína (g) | Lipídios (g) | Na (Mg) |
| RAÇÃO PADRÃO | 1 | 2,95 | 0,55 | 0,22 | 0,04 | 0,00 |
| SALGADINHO SABOR QUEIJO | 1 | 3,92 | 0,72 | 0,08 | 0,09 | 12,3 |
| BOLACHA WAFER DE CHOCOLATE | 1 | 5,56 | 0,63 | 0,03 | 0,51 | 0,76 |
| REFRIGERANTE DE COLA | 1 | 0,42 | 0,11 | 0,00 | 0,00 | 0,05 |
| CARDÁPIO B | | | | | | |
| RAÇÃO PADRÃO | 1 | 2,95 | 0,55 | 0,22 | 0,04 | 0,00 |
| MARSHMALLOW | 1 | 3,35 | 0,82 | 0,04 | 0,00 | 0,25 |
| APRESUNTADO | 1 | 1,85 | 0,07 | 0,13 | 0,16 | 11,7 |
| REFRIGERANTE DE COLA | 1 | 0,42 | 0,11 | 0,00 | 0,00 | 0,05 |
| CARDÁPIO C | | | | | | |
| RAÇÃO PADRÃO | 1 | 2,95 | 0,55 | 0,22 | 0,04 | 0,00 |
| SALGADINHO SABOR BACON | 1 | 5,08 | 0,521 | 0,08 | 0,29 | 6,40 |
| BOLACHA MARIA | 1 | 4,30 | 0,73 | 0,07 | 0,12 | 4,33 |
| REFRIGERANTE | 1 | 0,42 | 0,11 | 0,00 | 0,00 | 0,05 |

FONTE: Dados com base na pesquisa do autor

6.2.5 Exercício físico

O exercício físico constitui-se de natação livre em aquário de concreto com água em profundidade de 1 metro a temperatura era controlada de 32±2°C. Aos 21

dias de vida os animais do grupo exercitado iniciaram o protocolo de exercício. Durante há primeira semana aos animais sofreram um processo de adaptação ao ambiente aquático, em um intervalo de tempo de 5 minutos sem peso adicional. Ao término deste período eles realizaram a natação 3 vezes por semana 15 minutos por dia com um peso adicional correspondendo a 5% do peso corporal até os 90 dias de vida. O peso era preso ao tórax do animal. Esse exercício é considerado de intensidade moderado além de aeróbico (Francischi et al., 2017).

6.2.6 Análises bioquímicas

O sangue coletado foi centrifugado em tubos contendo heparina a 3.000 rpm por 10 minutos. Após foi coletado o plasma sanguíneo e utilizado para as seguintes dosagens: a) Glicemia plasmática; b) triglicerídeos; c) colesterol total; d) cálcio sérico. Todas as dosagens foram realizadas pelo método enzimático colorimétrico em uma leitura de 500 - 610nm

e) TNF- α e Leptina: o soro coletado foi utilizado para dosagem por método e ensaio imunoenzimático sanduíche -ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), o protocolo utilizado foi o recomendado pelo kit, de Preprotech® catálogo 900-k73 Lote:0414073. A leitura da placa ocorreu em comprimento de onda de 405 -650 nm. 30 e Preprotech® catálogo 900-k76 Lote:06080706.

6.2.7 Analise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada com auxílio do software GraphPad Prism 7, adotando um nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$). Para determinação do melhor teste estatístico, primeiramente os dados foram submetidos ao teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov que avaliou a distribuição dos mesmos, após o teste foi utilizado o teste paramétrico ANOVA de duas vias seguido do pós teste de Tukey para análise dos dados.

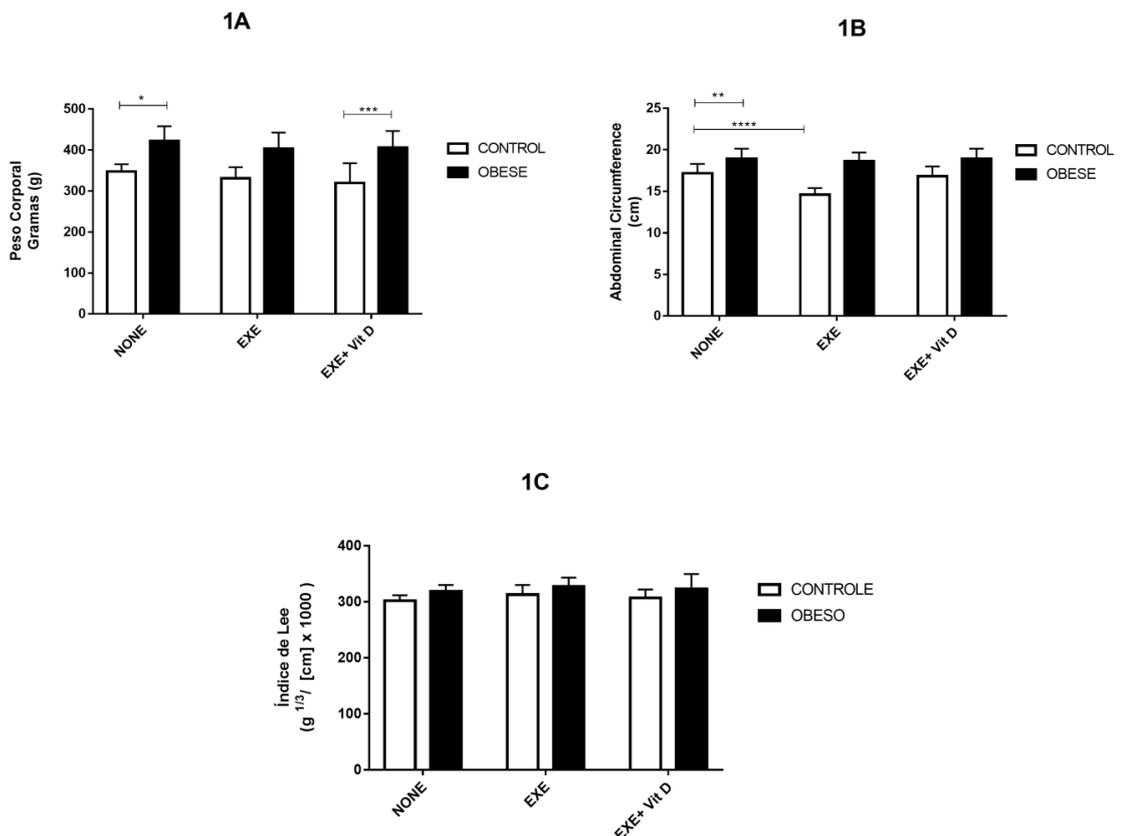
6.3 RESULTADOS

6.3.1 Análise morfométrica

A figura 1A refere-se ao peso corporal final destes animais em gramas (g), segundo o teste de ANOVA de duas vias não houve interação entre as variáveis e obesidade e tratamento [F (2, 51) = 0,1972 P=0,8216].

O pós-teste de Tukey constatou diferenças para o grupo OBESO NONE e OBESOS EXE+VIT D, em que ambos os grupos os animais apresentaram maior peso corporal [F (1, 51) = 64,44 P<0,0001], quando comparados ao grupo controle. Neste parâmetro não foi encontrado redução do peso corporal entre os grupos. Dados visualizados na figura 1A.

Figura 6.1- Efeito da associação de exercício mais suplementação de vitamina D₃



Legenda: Parâmetro morfométricos analisados: 1A- peso corporal final 2B- Circunferência abdominal e 3C- Índice de Lee. Os valores estão expressos em média ± SEM; o símbolo (*) indica diferença significativa p 0,0296; o símbolo (**) indica diferença significativa p 0,0033; o símbolo (***) indica diferença significativa p 0,0009; o símbolo (****) indica diferença significativa p <0,0001; pelo teste ANOVA two-way com pós -teste de Tukey. FONTE: Autor (2018).

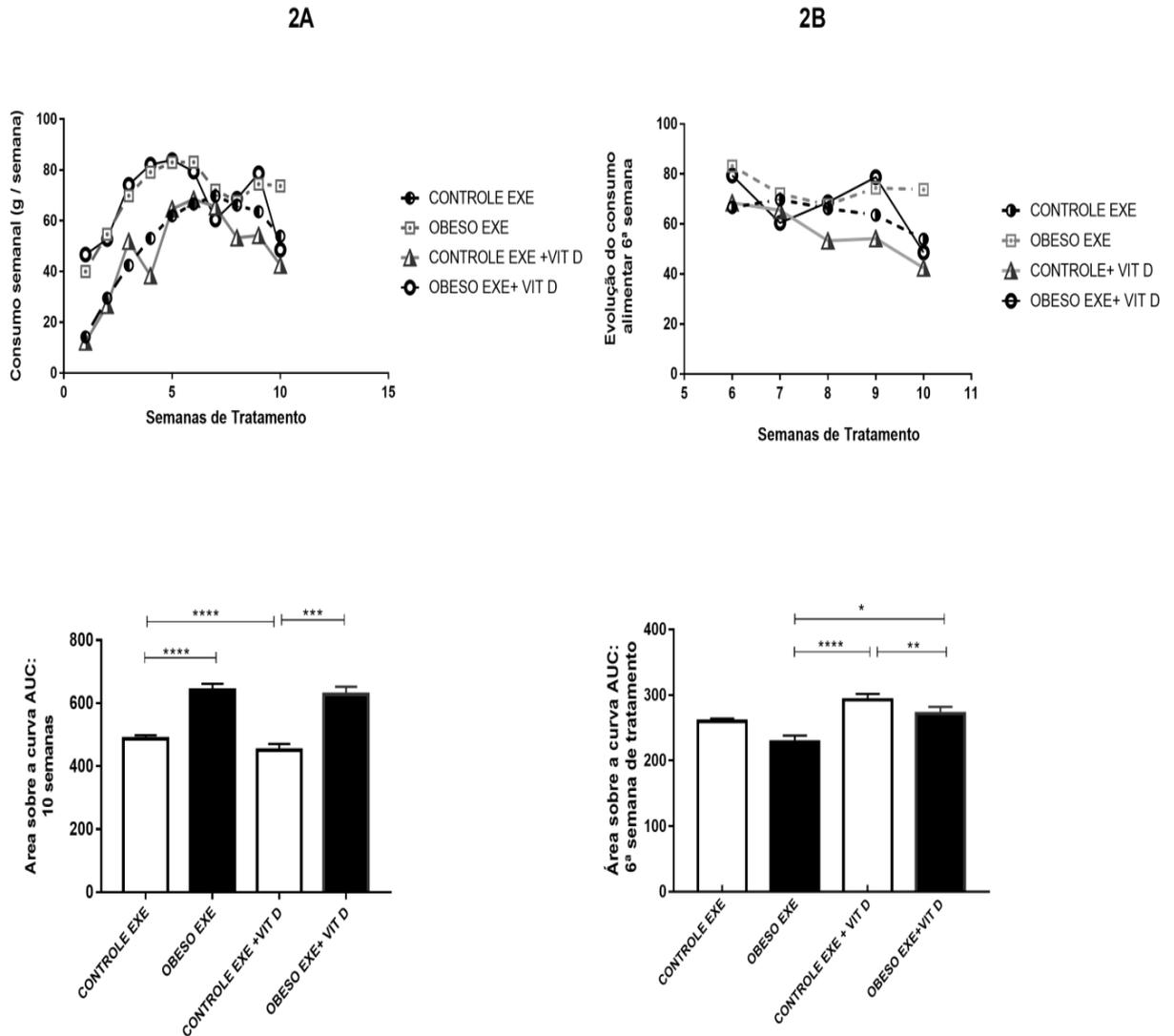
Em relação à circunferência abdominal o pós-teste de Tukey revelou diferenças entre os grupos que realizaram exercício físico e não foram alimentados com dieta hipercalórica (NONE CONTROLE X EXE CONTROLE) em que houve redução neste parâmetro. Também constatamos diferenças entre os subgrupos controle e obeso (NONE), neste o pós-teste de tukey revelou que existe aumento na circunferência abdominal de animais obesos [$F(1, 59) = 91,76$ $P < 0,0001$]. Por meio do teste de ANOVA de duas vias encontramos interação entre as variáveis obesidade e tratamento [$F(2, 59) = 6,881$ $P = 0,0021$] de acordo com o teste a variável obesidade teve interação com os dados de aproximadamente 48,82% [$F(1,40) = 91,03$ $P < 0,0001$] confirmando a instalação da mesma. Dados observados na Figura 1B

A Figura 1C demonstra os resultados do índice de Lee segundo o teste de ANOVA de duas vias não houve interação entre as variáveis obesidade e tratamento [$F(2, 60) = 0,02396$ $P = 0,9763$], bem como segundo o pós – teste de tukey não encontrou diferenças entre os grupos, neste parâmetro não houve redução da obesidade.

6.3.2 *Evolução de ingestão alimentar*

A Figura 2A mostra as curvas de alimentação para os animais durante 10 semanas; ANOVA one-way seguida do teste de tukey, por meio do teste evidenciou que diferenças significativas na ingestão de alimentos nos animais obesos ($p < 0,0001$), como também mostrado pela área sob a curva (AUC). A Figura 2B apresenta a análise dos efeitos da suplementação de vitamina D durante a 6ª a 10ª semana; diferenças significativas foram observadas entre os grupos controle sem tratamento e os animais obesos tratados, ou não, com vitamina D, onde um aumento na ingestão alimentar foi observado para os animais obesos ($p < 0,0001$). Não houve redução na ingestão alimentar para os animais controle ou obesos quando foram suplementados com vitamina D.

Figura 6.2- Efeito da suplementação com vitamina D na ingestão alimentar



Legenda: Parâmetro analisados: 2A- Ingestão alimentar no período de 10 semanas de tratamento com AUC = área sobre a curva. 2B- Ingestão alimentar no período de 6 últimas semanas de tratamento com AUC = área sobre a curva. Os valores estão expressos em média \pm EPM. A quantidade de alimento consumido diariamente pelos animais através da fórmula: (quantidade colocada de alimento - quantidade restante de alimento na grade)/número de dias/número de animais na caixa dessa maneira também foi cálculo a área sobre a curva do alimento ingerido ao longo desse período. O símbolo (****) indica diferença significativa $p < 0,0001$; pelo teste ANOVA two-way com pós -teste de Tukey. FONTE: Autor (2018)

6.3.3 Dados morfométricos: estoques de gordura

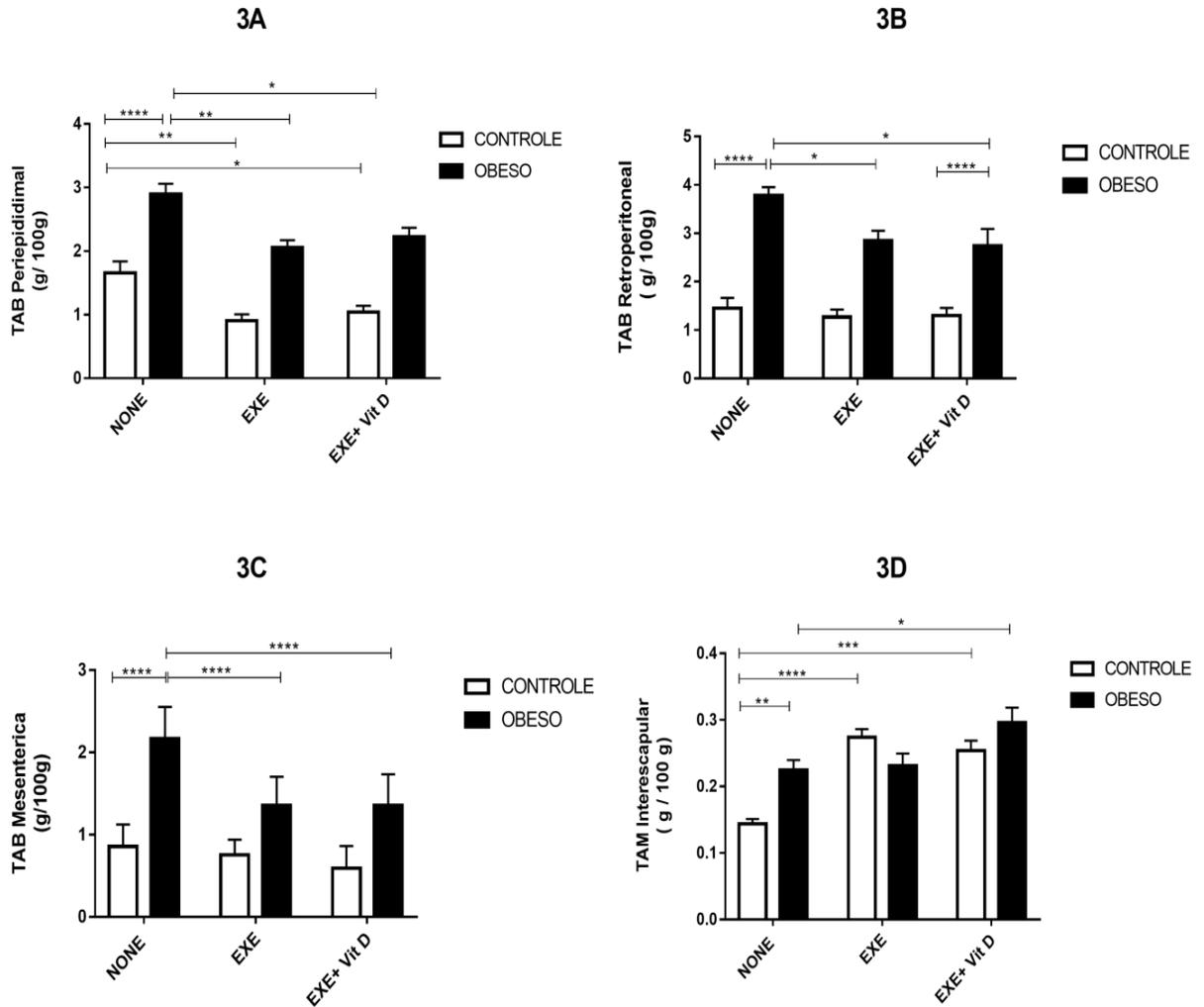
A Figura 3 apresenta o valor dos estoques de gorduras proporcional ao peso corporal dos grupos NONE, EXE e EXE+ VIT D. A escala utilizada foi baseada por representação da proporção do valor em gramas da os estoques de gordura (g)/ 100 g de peso corporal do animal.

Desta forma temos os seguintes resultados, o TAM periepididimal, através do teste de ANOVA de duas não houve interação entre as variáveis obesidade e tratamento [F (2, 53) = 0,04341 P=0,9576]. Quando analisadas de maneira isoladas as variáveis demonstraram efetividade sobre os dados, em que a instalação da obesidade foi constatada 53% de influência sobre os dados [F (2, 53) = 18,48 P <0,0001]. Já a variável tratamento obteve influência sobre os dados de 20% demonstrando efetividade na suplementação da vitamina D aliada ao exercício físico [F (1, 53) = 102,1 P= <0,0001]. Dessa forma por meio do pós teste de tukey, tivemos redução neste estoque nos grupos EXE e EXE+VIT D X NONE [F (2, 53) = 18,48 P<0,0001]. No entanto não encontramos diferenças entre os grupos EXE e EXE+VIT D, o tratamento associado a suplementação com a vitamina D não foram considerados grupos diferentes pelo teste de ANOVA de duas vias. Dados observados na Figura 3A.

Em relação ao estoque de gordura retroperitoneal, constatamos por meio do teste de ANOVA de duas vias que não houve interação entre as variáveis obesidade e tratamento F (2, 56) = 2,604 P=0,0829]. Averiguamos que houve influência da variável obesidade [F (2, 56) = 5,112 P=0,0091] e tratamento [F (1, 56) = 106,8 P<0,0001] de maneira isoladas, dessa forma por meio do pós-teste de tukey, encontramos diferenças entre os obesos dos grupos Nones x EXE x EXE+ VIT D em que houve redução deste estoque (P= < 0,0001). Dados observados na Figura 3B.

Quando verificamos o estoque de gordura branca (TAB) mesentérica, verificamos por meio do teste de ANOVA de duas vias, que houve interação entre as variáveis obesidade e tratamento [F (2, 59) = 7,624 P= 0,0011], comprovou-se a influência da obesidade sobre este estoque em análise. Segundo o pós-teste de tukey, encontramos diferenças entre os animais dos grupos OBESO EXE x OBESO EXE + VIT D (P< 0,0001). Os animais do grupo obeso none tiveram os maiores valores de peso deste estoque em relação ao peso corporal, demonstrando a instalação da obesidade, bem como a redução do mesmo estoque nos demais grupos e suas respectivas intervenções. Em relação a maior efetividade do exercício ou do exercício associado a vitamina D, não foi constado como diferentes segundo o teste de ANOVA de duas vias. Dados observados na Figura 3C.

Figura 6.3- Efeito da associação de vitamina D e exercício físico nos estoques de gorduras TAB e TAM



Legenda: Parâmetro morfométricos analisados: 3A- TAB Periepididimal 3B- TAB Retroperitoneal, 3C- TAB Mesentérica 3D- TAM Marrom. Os valores estão expressos em média \pm SEM; a escala utilizada foi baseada por representação da proporção do valor em gramas da os estoques de gordura (g)/ 100 g de peso corporal do animal o símbolo (*) indica diferença significativa p 0.0296; o símbolo (**) indica diferença significativa p 0,0033; o símbolo (***) indica diferença significativa p 0,0009; o símbolo (****) indica diferença significativa p <0,0001; pelo teste ANOVA two-way com pós -teste de Tukey. FONTE: Autor (2018)

O estoque de gordura marrom (TAM) interescapular, também foi retirado a fim de verificações. Desta forma o teste de ANOVA de duas vias indicou interação entre as variáveis obesidade tratamento [F (2, 52) = 7,89 P= 0,0010], dessa forma averiguamos por meio do pós-teste de Tukey que os animais que realizaram exercício físico bem como os animais que foram suplementados com vitamina D e associados ao exercício tiveram aumento progressivo deste estoque, em especial animais obesos suplementados com vitamina D, tiveram um aumento de 10% do

peso quando comparados aos animais que não foram submetidos a nenhuma intervenção terapêutica. Dados observados na Figura 3D.

6.3.4 Análise bioquímica, perfil metabólico e lipídico

A Figura 4 apresenta os dados séricos de glicemia, triglicerídeos, colesterol e cálcio. A Figura 4A apresenta os dados de glicemia em avaliação durante jejum. Para esse parâmetro observamos diferenças estatísticas, em que o teste de ANOVA de duas vias encontrou interação entre as variáveis obesidade e tratamento [$F(2, 58) = 10,95$ $P < 0,0001$].

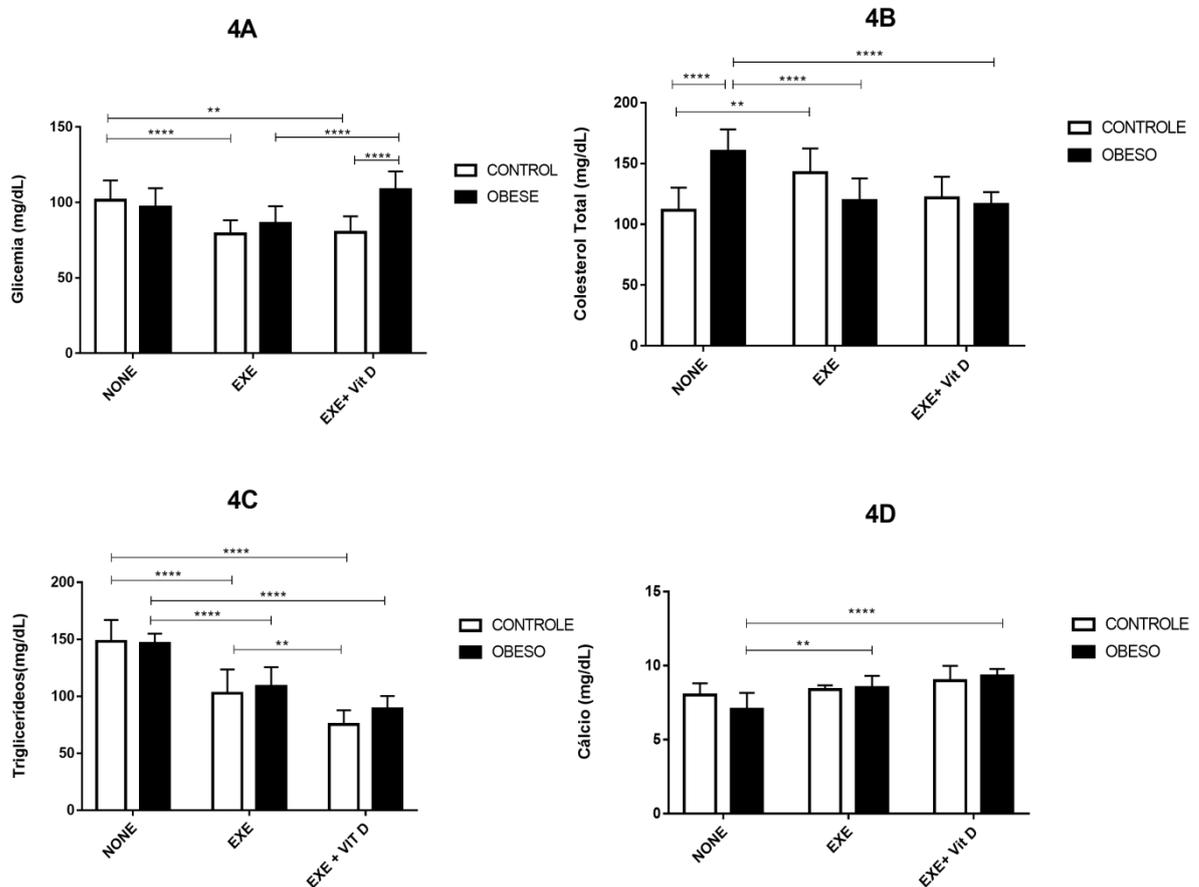
A variável obesidade teve influência sobre os dados de 20% dessa forma compreendemos por meio do pós-teste de Tukey não houve diferenças encontradas para os animais controles e obesos do grupo NONE. Por meio do mesmo teste constatamos que os animais controles exercitados e exercitados associados a suplementação de vitamina D tiveram redução nos índices glicêmicos aferidos quando comparados com animais NONE que não tiveram nenhuma intervenção terapêutica ($p < 0,0015$). Animais obesos e controles do grupo exercitados associados à suplementação tiveram diferenças estatísticas encontradas, em que animais obesos apresentam maior índice glicêmico. Dados visualizados na Figura 4A.

Já em relação ao colesterol total dosado, verificamos por meio do teste de ANOVA de duas vias existiu interação entre as variáveis tratamento e obesidade $F(2, 55) = 22,07$ $P < 0,0001$], desta forma por meio do pós-teste de Tukey, constatamos que os animais que não tiveram nenhuma intervenção terapêutica, tanto controle quanto obeso, obtiveram maiores níveis circulantes de colesterol total, quando comparado aos grupos, exercitado e exercitado associado a suplementação. Houve também diferenças para os animais controle e obeso do grupo NONE, em que os animais obesos apresentaram maiores valores quando comparados aos animais controle ($p < 0,0001$). Não foi encontrada diferenças entre os animais de exercitados e exercitados associados à suplementação, sendo portanto considerados iguais pelo teste de ANOVA de duas vias. Dados visualizados na Figura 4B.

Por meio da determinação do triglicerídeo sérico, constatamos que não houve interação entre as variáveis já mencionadas [$F(2, 55) = 1,322$ $P = 0,2749$], em

relação às variáveis quando mensuradas individualmente foi possível constatar que houve influência do tratamento sobre as amostras, em que 75% dos dados foram favoráveis a essa intervenção [$F(2, 55) = 95,38$ $P < 0,0001$]. Desta forma é possível visualizar por meio do pós-teste de Tukey, que houve redução gradativa, animais exercitados associados com vitamina D apresentaram menores índices circulantes dosados. Dados observados na Figura 4C.

Figura 6.4- Avaliação sobre o perfil metabólico e lipídico de animais exercitados associados a vitamina D₃



Legenda: 4A- Concentração de glicemia em jejum; 4B-concentração de triglicérides e 4C- Concentração sérica de cálcio. Os dados representam a média \pm EPM. O símbolo (*) indica diferença significativa $p < 0,0296$; o símbolo (**) indica diferença significativa $p < 0,0033$; pelo teste ANOVA two-way com pós -teste de Tukey. FONTE: Autor (2018)

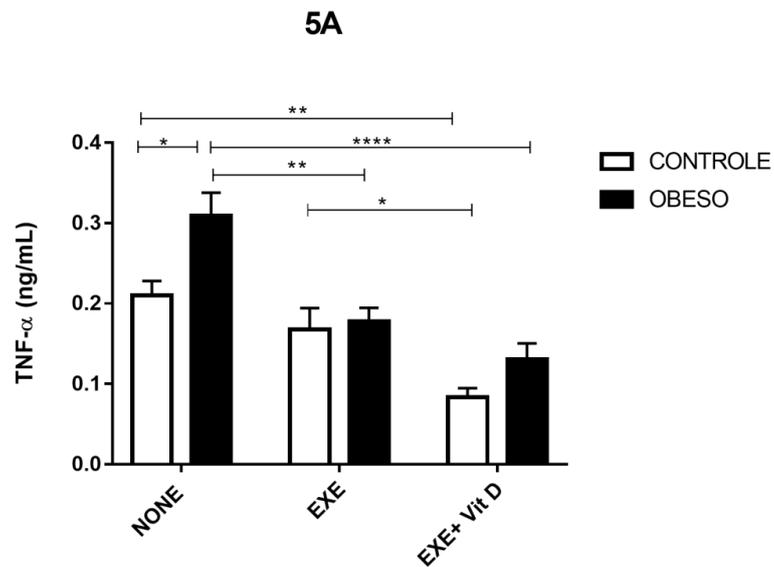
Em relação à mensuração do cálcio sérico, verificou-se a existência de interação entre a variável tratamento e obesidade [$F(2, 53) = 3,5$ $P = 0,0373$]

considerou, portanto efetividade da intervenção terapêutica com suplementação de vitamina D, em que apresentou diferenças significativas entre os grupos exercitados e exercitados vitamina D comparados ao grupo none (NONE x EXE x EXE+ VIT D, demonstrando que mesmo com o exercício físico houve aumento da circulação de cálcio [F (2, 53) = 19,86 P<0,0001]. Não foi encontrada diferenças entre os grupos exercitado e exercitado associado a suplementação, não são considerado pelo teste de ANOVA de duas vias como grupos diferentes. Dados observados na Figura 4D.

6.3.5 Níveis circulantes de citocina e leptina

A Figura 5 representa a mensuração realizada nos níveis séricos de citocina pró-inflamatória, TNF- α , dessa forma temos a figura 6^a, representada por meio de análise gráfica o conjunto de valores para os grupos nones, exercitados e exercitados associado a suplementação de vitamina D, por meio do teste de ANOVA de duas vias, animais obesos do grupo none apresentam maior circulação de fator de necrose tumoral (TNF- α), considerando portanto a instalação da obesidade, quando comparados esses animais com os demais grupos, verificamos que houve atenuação deste parâmetro nos grupos que realizam exercício físico e animais que exerceram o exercício físico aliado à suplementação de vitamina D [F (2, 43) = 25,88 P= 0,0001]. No entanto não foi possível observar interação entre as variáveis obesidade e tratamento [F (2, 43) = 2,206 P= 0,1224]. Em relação à efetividade suplementação junto com o exercício físico, constatamos por meio do pós-teste de Tukey que houve maior efetividade no grupo controle, quando comparado ao grupo (EXE CONTROLE x EXE+VIT D CONTROLE) em que se apresentou como diferente do grupo controle que apenas realizou o exercício físico (p= 0,0401). Dados observados na Figura 5A.

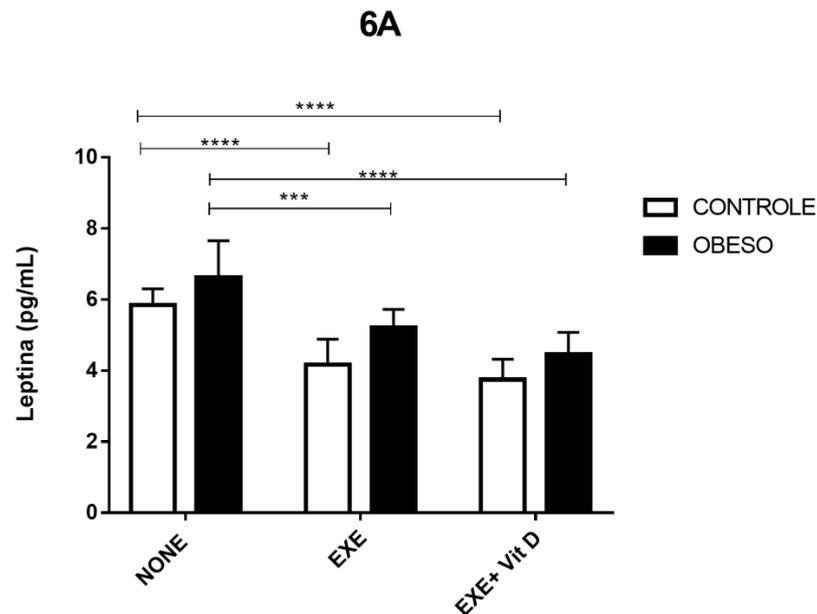
Figura 6.5- Mensuração de perfil inflamatório em diferentes intervenções terapêuticas



Legenda: Parâmetro verificados: TNF- α . Os valores estão expressos em média \pm SEM; a unidade de medida para a os perfis analisados é ng/dL. O símbolo (*) indica diferença significativa p 0,0296; o símbolo (**) indica diferença significativa p 0,0033; o símbolo (***) indica diferença significativa p 0,0009; o símbolo (****) indica diferença significativa p <0,0001; pelo teste ANOVA two-way com pós-teste de Tukey. FONTE: Autor (2018)

Em relação a adipocina leptina verificamos que os valores para os animais do grupo none estes animais possuem maiores níveis circulantes deste parâmetro mensurado. Desta forma de acordo com ANOVA de duas vias não ocorreu interação entre as variáveis, obesidade e tratamento [F (2,50) = 0,2952 P=0,7456]. Já a variável tratamento foi considerado efetivo sobre a amostra analisada [F (2,50) = 47,99 P= <0,0001] com isso à redução quando há uma intervenção seja essa terapêutica não farmacológica como o exercício e farmacológica como a suplementação. Não foi considerado diferente o grupo exercitado e exercitado associado à suplementação de vitamina D. Dados visualizados na Figura 6A.

Figura 6.6 - Mensuração dos níveis séricos de leptina



Legenda: Parâmetro verificados: leptina. Os valores estão expressos em média \pm SEM; a unidade de medida para a os perfis analisados é pg/mL para Leptina. O símbolo (*) indica diferença significativa p 0,0296; o símbolo (**) indica diferença significativa p 0,0033; o símbolo (***) indica diferença significativa p 0,0009; o símbolo (****) indica diferença significativa p<0,0001; pelo teste ANOVA two-way com pós -teste de Tukey. FONTE: Autor (2018).

6.4. DISCUSSÃO

A obesidade é uma condição de alteração metabólica que predispõe a numerosas doenças, considerada uma epidemia em todo o mundo, tornou uma grande preocupação global de saúde pública (IMAMURA et al., 2015).

A principal chave de compreensão para o acarretamento e progressão da obesidade, bem como desenvolvimento dos fatores de risco associada a esta doença, se dá na fase pré-clinicamente. Considerando o aumento nos parâmetros morfométricos apresentados na Figura 6.1, observamos nos animais OBESO em diferentes intervenções aumento comparado aos animais controles, mesmo com intervenções terapêuticas diferentes, isso corrobora com estudos Bortolin et al. (2018) em que averiguou as condições de instalação e desenvolvimento da obesidade por meio de comparações entre dietas. As chamadas como high-fat diet (HFD) e as dietas hipercalóricas apresentaram as alterações fisiológicas e

metabólicas apresentadas na fase de instalação da obesidade, confirmando a importância do padrão nutricional no desenvolvimento da obesidade.

A obesidade é descrita como o acúmulo excessivo de gordura corporal, mas nem todas as dietas "obesogênicas" induzem obesidade (ROSINI et al., 2012). Neste estudo, verificamos que a dieta hipercalórica apresentou aumento nos estoques de gordura como observado na Figura 6.3, dados estes já encontrados em outros estudos como de Sampey et al (2011) o qual verificou que a dieta hipercalórica produz a característica voluntária de hiperfagia dado esse encontrado em nosso estudo na Figura 6.2. Devido aumento da quantidade ingerida ocorre desequilíbrio metabólico devido alterações no controle do núcleo arqueado responsável pela sensação de saciedade, além de outros mediadores que auxiliam nesta regulação (FONSENCA-ALANTIZ et al., 2006; BELEGRI et al., 2017).

Existem evidências consideráveis indicando que o acúmulo excessivo de tecido adiposo branco está fortemente correlacionado com o desenvolvimento de resistência à insulina e diabetes tipo 2, corroborando com nossos achados temos estudos desenvolvido por Higa e colaboradores (2014) que destacam as desordens endócrinas, como aumento na secreção de leptina e citocinas pró-inflamatórias grandes causadores da progressão para essas doenças mencionadas.

A leptina é produzida quase exclusivamente pelo tecido adiposo branco, concentrações plasmáticas de leptina aumentam na obesidade e estão fortemente relacionados à massa gorda corporal (MATSUNUMA; HORIUCHI, 2007). A leptina circula no plasma, agindo no hipotálamo após atravessar a barreira hematoencefálica. Efeitos de leptina no sistema nervoso central regulam a ingestão de alimentos, o gasto energético, além do crescimento e maturação sexual (NOBRE et al., 2018). Quando há resistência à leptina há uma alteração da ingesta alimentar, atuando junto com a leptina temos ações extra-ósseas da vitamina D (CHANG; KIM., 2017).

Quando a vitamina D se encontra abaixo dos níveis normais ela possui efeitos sobre a regulação da leptina, portanto quando há deficiência de vitamina D, ocorre estimulação da proteína relacionada com agouti/Neuropeptídeo Y (AgRP / NPY) suprimindo a pro-opiomelanocortina/cocaína Transcrição Regulada por Anfetamina (POMC / CART) fato esse relacionado ao aumento de peso e alteração endócrina metabólica (ZHU et al., 2013),

Com base na consideração de todas as disfunções metabólicas avaliadas aqui, isto é, inflamação, hiperleptinemia em jejum hiperglicemia de jejum, e dislipidemia concluímos que esses distúrbios relacionados à obesidade foram induzidos, com grande eficiência em ratos alimentados com dieta hipercalórica.

Neste trabalho também avaliamos duas formas terapêuticas de realizar tratamento uma para conter a obesidade, sendo esses, o exercício físico e a suplementação associada ao exercício físico, poucas vezes houve um potencialização da ação da vitamina D sobre os dados.

Nos estoques de gordura verificamos que houve decréscimo dos estoques de tecido adiposo branco TAB apenas com a intervenção do exercício físico (Figura 3) fato esse relacionado ao aumento oxidação de ácidos graxos, também foi eficaz na hiperglicemia que existia, reduzindo a mesma, pois há aumento da captação de glicose e melhora a resistência à insulina cronicamente (FLORES-OPAZO et al., 2019). Vários estudos implicam a atividade da proteína ERK1 / 2 em vários aspectos da metabolismo lipídico, incluindo regulação da acetil-CoA carboxilase e fosforização da lipase sensível a hormônios ERK1 / 2 foi estudo como proteína relacionada a regulação de ácido graxo, auxiliando também na captação durante a contração no músculo esquelético de ratos, possivelmente por meio da membrana da proteína ligante de ácidos graxos CD36 (MARINHO et al., 2015).

Dados recentes utilizando exercícios de baixo a moderado sugerem ainda que o aumento da absorção e oxidação de ácidos graxos é dependente de ERK1 / 2 in vivo (FONSECA – ALANIZ et al., 2006; FUJITA et al., 2018). Há também relação da perda de estoques de gordura se deva ao treinamento contendo sucessivos estímulos anaeróbios talvez favoreça o maior gasto energético pós-exercício por manter a taxa metabólica de repouso em níveis elevados por um longo tempo. Segundo alguns autores, o exercício físico promove elevação da lipólise no tecido adiposo pela ação de hormônios lipolíticos (glucagon, adrenalina, noradrenalina, glicocorticóides e hormônio do crescimento (GH), que são liberados durante o exercício de longa duração (BRAGA et al., 2016; WILIS et al., 2012). Dessa forma, quanto mais intenso for o exercício, maiores serão os níveis séricos de catecolaminas, menor será o saldo negativo no balanço energético e maior será o gasto energético em repouso (CHOI et al., 2013).

No entanto como demonstrado em estudos de Rodrigues et al. (2017) alta atividade física provoca alterações na membrana das fibras musculares, também é

acompanhado pela produção de radicais livres, que provocam uma alteração das membranas celulares, o que causa uma lesão acompanhada por um processo inflamatório ao nível das fibras musculares. Com a ativação de proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs) que têm sido mostrados para ativar o NF- κ B leva à hipótese de que o exercício também pode ativar o NF- κ B, essas são moléculas sinalizadoras ativadas durante o exercício e mais genes ativados pelo NF- κ B têm se mostrado pró-inflamatórios e estão envolvidas no processo inflamatório. No entanto como apresentado na figura 6 houve potencialização do efeito da suplementação com vitamina D em que apresenta perfil protetor de inflamação, houve decréscimo do marcador inflamatório TNF- α , possivelmente esse resultado se deva a função da vitamina D3. Em diversos estudos como de Choi et al (2013), Farhangi et al (2017) e Nameni et al (2016) em que constataram tecido específicos como músculo estriado esquelético, músculo estriado cardíaco e tecido nervoso tiveram pouco recrutadores pró-inflamatórios quando tiveram suplementação de vitamina D3 esse resultado é devido a inibir a translocação nuclear de p65 NF- κ B e a fosforilação de IKK e I κ B portanto, uma redução na atividade do NF- κ B consequentemente, redução de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α por meio da vitamina D (VIMALESWARA et al., 2013; CHANG & KIM, 2017).

O exercício de natação realizado neste trabalho é considerado moderado, exercício moderado tem sido relacionado a uma melhora na sinalização da insulina no músculo esquelético, além da função mitocondrial e consumo de energia. há também benefício na disfunção microvascular que diminui o volume de sangue capilar no músculo esquelético melhorando a movimentação do músculo (MAJOR et al., 2013; FUJITA et al., 2018).

Houve redução nos estoques de gordura animais exercitados associados a vitamina D3 nossa hipótese é de lipólise induzida por vitamina D, visto que há existência de receptores de vitamina D₃ (RVD) neste tecido, dessa forma sugerimos que houve essa redução devido a capacidade da vitamina D de modelar os adipócitos como visto nos estudos de Li et al (2013). Além disso, Shi et al (2001) verificou que a 1,25 (OH) 2D3 aumenta as atividades enzimáticas da sintetase de ácidos graxos e da GAPDH por meio de ações não genômicas.

Em nosso trabalho podemos observar que o tecido adiposo marrom interescapular apresentou aumento nos grupos suplementados com vitamina D. Este tecido é conhecido por promover o aumento do gasto energético, devido ao aumento

da oxidação de ácidos graxos pode resultar da indução, sob o efeito da vitamina D, de genes que controlam essa via de ativação por função mitocondrial (Ppara, Pgc1 α e Pgc1 β) juntamente com a indução de genes envolvidos no metabolismo oxidativo de ácidos graxos (Cpt1, Mcad, Lcad e Pdk4). Além disso, temos que ter em mente que no presente estudo avaliou o impacto de uma suplementação de vitamina D, não sabemos ao certo quais são as vias de ativação de atuação da vitamina D (FARB et al., 2011; VIMALESWARA et al., 2013).

Recentemente foi constatado regulação da UCP1 pelo VDR no tecido adiposo era dependente da Vitamina D como as modulações de expressão da UCP1 foram fortemente correlacionadas com o modificações de peso em camundongos RVD e camundongos superexpressores de hRVD (WONG et al., 2009; DEMPERSMIER et al., 2015). Sugerindo desta maneira que há aumento da considerarmos por meio de outros estudos que há aumento na expressão do VDR no metabolismo energético levando ao aumento do peso de gordura marrom (MARCOTORCHINO et al., 2014).

Outra hipótese para a atenuação dos estoques de gordura bem como redução dos triglicerídeos e colesterol LDL Major et al. (2007) demonstraram que 200 UI / dia de suplementação de vitamina D (formulário não especificado) associado a uma redução de 700 kcal / dia em calorias resultou em melhorias significativas no colesterol perfis de comparação com placebo.

Wamberg et al (2012) verificaram a expressão da enzima em diferentes tecidos em grupos obesos e magros com isso não encontraram dados que relacionem diretamente como a vitamina D está relacionada ao tecido adiposo mas encontram evidências que há maior degradação de vitamina D por meio da enzima CYP24A1 durante a obesidade, além disso Nimitphong et al (2011) encontrou em seus estudos relação entre o nível da plasma 25OHD depende do volume de distribuição, ou seja aumento de 25OHD depende da quantidade de tecido adiposo existe.

Dessa forma há uma relação entre a quantidade de tecido adiposo com a biodisponibilidade da vitamina D, sugerimos que a mesma possui efeitos que podem ocasionar redução do TAB e aumentar o gasto energético por meio da UCP-1 alterando dessa maneira o gasto mitocondrial, tendo também efeitos associado ao exercício físico que traz benefícios ao indivíduo obeso por meio de oxidação de ácidos graxos e aumento de catabolismo melhorando os perfis lipídicos e insulínicos,

reduzindo a chances de desenvolver diabetes mellitus bem como reduzir a possíveis desordens metabólicas.

6.5 CONCLUSÃO

O presente estudo conseguiu avaliar os efeitos de duas intervenções terapêuticas sobre a obesidade, verificamos por meio de estudos com exercício físico aeróbico reduzir os estoques de gordura e conseqüentemente melhorar os perfis lipídicos e metabólicos, enquanto que comparado as duas intervenções de suplementação de vitamina D associada ao exercício físico encontramos potencialização em alguns resultados que podem sugerir uma ação conjunta das duas intervenções. Dessa maneira faz se necessário maior estudo a respeito da ação extraóssea da vitamina D bem como consideramos que o exercício físico atuado de maneira isolada já produz o efeito desejado para combate e redução da obesidade.

6.6 REFERÊNCIAS

BELEGRI, E. et al. The effects of overnight nutrient intake on hypothalamic inflammation in a free-choice diet-induced obesity rat model. **Appetite**, v. 120, p. 527-535, 2018.

BLUM, M et al. Vitamin D3 in fat tissue. **Endocrine**, v. 33 n.1, p. 90-94, 2008.

BLUMBERG, J. M. et al. Complex role of the vitamin D receptor and its ligand in adipogenesis in 3T3-L1 cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 16, p. 11205-11213, 2006.

BORTOLIN, R. C et al. A new animal diet based on human Western diet is a robust diet-induced obesity model: comparison to high-fat and cafeteria diets in term of metabolic and gut microbiota disruption. **International Journal of Obesity**, v. 42, n. 3, p. 525, 2018.

BRAGA, L. et al. Exercício contínuo e intermitente: Efeitos do treinamento e do destreinamento sobre o peso corporal e o metabolismo muscular de ratos obesos. **Revista Portuguesa de Ciências do Desporto**, v. 6, n. 2, p. 160-169, 2006.

CHANG, E.; KIM, Y. Vitamin D insufficiency exacerbates adipose tissue macrophage infiltration and decreases AMPK/SIRT1 activity in obese rats. **Nutrients**, v. 9, n. 4, p. 338, 2017.

CHOI, M. et al. Vitamin D3 supplementation modulates inflammatory responses from the muscle damage induced by high-intensity exercise in SD rats. **Cytokine**, v. 63, n. 1, p. 27-35, 2013.

DAVID, L. N.; COX, M. Princípios de bioquímica de Lehninger. **6ª edição. Porto Alegre: Artmed Editora**, 2014.

DEMPERSMIER, J. et al. Cold-inducible Zfp516 activates UCP1 transcription to promote browning of white fat and development of brown fat. **Molecular cell**, v. 57, n. 2, p. 235-246, 2015.

FARB M.G. et al. Reduced adipose tissue inflammation represents an intermediate cardiometabolic phenotype in obesity. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 58, n. 3, p. 232-237, 2011.

FARHANGI, M. A. et al. Cardiac tissue oxidative stress and inflammation after vitamin D administrations in high fat-diet induced obese rats. **BMC cardiovascular disorders**, v. 17, n. 1, p. 161, 2017.

FLORES-OPAZO, M. et al. Exercise serum increases glut4 in human adipocytes. **Experimental physiology**, 2019.

FONSECA-ALANIZ, M. H. et al. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. **Arq. bras. endocrinol. metab**, v. 50, n. 2, p. 216-229, 2006.

FRANCISCHI, R. P.; Pereira, L. O.; Junior, A. H. L. Exercício, comportamento alimentar e obesidade: revisão dos efeitos sobre a composição corporal e parâmetros metabólicos. **Revista Paulista de Educação Física**, n.15 v.2, p.117-140, 2017.

FUJITA, N. et al. Changes in lipid metabolism and capillary density of the skeletal muscle following low-intensity exercise training in a rat model of obesity with hyperinsulinemia. **PloS one**, v. 13, n. 5, p. e0196895, 2018.

HIGA, T. S. et al. Comparison between cafeteria and high-fat diets in the induction of metabolic dysfunction in mice. **International journal of physiology, pathophysiology and pharmacology**, v. 6, n. 1, p. 47, 2014.

IMAMURA, F. et al. Consumption of sugar sweetened beverages, artificially sweetened beverages, and fruit juice and incidence of type 2 diabetes: systematic review, meta-analysis, and estimation of population attributable fraction. **Bmj**, v. 351, p. h3576, 2015.

LI B. et al. 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 suppresses TLR8 expression and TLR8-mediated inflammatory responses in monocytes in vitro and experimental autoimmune encephalomyelitis in vivo. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e58808, 2013.

MAJOR, G. C. et al. Calcium plus vitamin D supplementation and fat mass loss in female very low-calcium consumers: potential link with a calcium-specific appetite control. **British journal of nutrition**, v. 101, n. 5, p. 659-663, 2008.

MANCINI, M. C.; Melo M. E.; Angeluccia, A. P. Fisiologia e Tratamento Clínico da Obesidade in Wajchenberg, **Tratado de Endocrinologia Clínica**, 4ª edição, cap. 29, 2014.

MARCOTORCHINO, J. et al. Vitamin D protects against diet-induced obesity by enhancing fatty acid oxidation. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 25, n. 10, p. 1077-1083, 2014.

MARINHO, R. et al. Influences of different protocols of physical training on the phosphorylation of akt protein in skeletal muscle and insulin sensitivity of obese rats. **Revista da Educação Física/UEM**, v. 26, n. 1, p. 107-117, 2015.

MATSUNUMA, A.; Horiuchi, N. Leptin attenuates gene expression for renal 25-hydroxyvitamin D3-1 α -hydroxylase in mice via the long form of the leptin receptor. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 463, n. 1, p. 118-127, 2007.

MIENALTOWSKI, M. J.; BIRK, D. E. Structure, physiology, and biochemistry of collagens. In: **Progress in heritable soft connective tissue diseases**. Springer, Dordrecht, p. 5-29, 2014.

MOEHLECKE, M. et al. Determinants of body weight regulation in humans. **Archives of endocrinology and metabolism**, v. 60, n. 2, p. 152-162, 2016.

NAMENI, G. et al. The impact of vitamin D supplementation on neurodegeneration, TNF- α concentration in hypothalamus, and CSF-to-plasma ratio of insulin in high-fat-diet-induced obese rats. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 61, n. 2, p. 247-255, 2017.

NIMITPHONG, H. et al. 25-hydroxyvitamin D3 and 1, 25-dihydroxyvitamin D3 promote the differentiation of human subcutaneous preadipocytes. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e52171, 2012.

NOBRE, J.L. et al. Leptin blocks the inhibitory effect of vitamin D on adipogenesis and cell proliferation in 3T3-L1 adipocytes. **General and comparative endocrinology**, 2018.

RODRIGUES, A. C. et al. Effects of aerobic exercise on the inflammatory cytokine profile and expression of lipolytic and thermogenic genes in β 1-AR $^{-/-}$ mice adipose tissue. **Life sciences**, v. 221, p. 224-232, 2019.

ROSINI, T. C.; da Silva, A. S. R.; de Moraes, C. Obesidade induzida por consumo de dieta: modelo em roedores para o estudo dos distúrbios relacionados com a obesidade. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 58, n. 3, p. 383-387, 2012.

SAMPEY, B. P. et al. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. **Obesity**, v. 19, n. 6, p. 1109-1117, 2011.

SHI, H. et al. 1 α , 25-Dihydroxyvitamin D3 modulates human adipocyte metabolism via nongenomic action. **The FASEB journal**, v. 15, n. 14, p. 2751-2753, 2001.

VIMALESWARAN, K. S. et al. Causal relationship between obesity and vitamin D status: bi-directional Mendelian randomization analysis of multiple cohorts. **PLoS medicine**, v. 10, n. 2, p. e1001383, 2013.

WAMBERG, L. et al. Expression of vitamin D-metabolizing enzymes in human adipose tissue—the effect of obesity and diet-induced weight loss. **International Journal of Obesity**, v. 37, n. 5, p. 651-657, 2013.

WILLIS, K. S. et al. Vitamin D status and biomarkers of inflammation in runners. **Open access journal of sports medicine**, v. 3, p. 35, 2012.

WONG, K. E. et al. Involvement of the vitamin D receptor in energy metabolism: regulation of uncoupling proteins. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 296, n. 4, p. E820-E828, 2009

ZHU, W. et al. Calcium plus vitamin D 3 supplementation facilitated Fat loss in overweight and obese college students with very-low calcium consumption: a randomized controlled trial. **Nutrition journal**, v. 12, n. 1, p. 8, 2013.