
BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Daniela de Almeida Santos



Daniela de Almeida Santos

Título: Avaliação do efeito da vitamina D₃ na expressão dos genes, *VDR*, *GR* e *PPAR γ* em adipócitos humanos.

Trabalho de Dissertação apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Rio Claro, como requisito para obtenção do grau de Mestre Biologia Celular e Molecular

Orientador: Prof.^a Dra. Lúcia Regina Ribeiro

Co-orientador: Prof.^o Dr. Mário Sérgio Mantovani.

Rio Claro-SP

2014

Daniela de Almeida Santos

Título: Avaliação do efeito da vitamina D₃ na expressão dos genes, *VDR*, *GR* e *PPAR γ* em adipócitos humanos.

Trabalho Dissertação apresentado (a) ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Rio Claro, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Comissão Examinadora

Lúcia Regina Ribeiro

Membro 1, Doutora e professora da UNESP-Rio Claro

Maria Inês Pardini

Membro 2, Doutora e professora da UNESP-Botucatu

Daniele Sartori

Membro 3, Doutora e professora da UEL

Rio Claro, SP 17 de fevereiro de 2014

Aos meus pais pelo apoio e amor incondicionais.

“A vida é um convite constante ao aprendizado de amor. A família é o reduto no qual todos têm o dever de ajudar-se para que o amor Superior, no seu seio doméstico, apazigue infrutíferas querelas ou fale para esclarecer e enlevar, construir e abençoar. Coopera com teus filhos quanto puderes, chora ou sorri com eles, e perante duros momentos, entrega-os ao Amor Divino”

Joanna de Ângelis

AGRADECIMENTO

À Prof. Dra. Lúcia Regina Ribeiro, pela confiança e sabedoria empregadas em todos esses anos;

Ao Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani, pelo acolhimento e incentivo à pesquisa, auxiliando nas dúvidas do dia a dia;

À Ms. Ingrid Felicidade, pela amizade, companheirismo, paciência, alegrias e risadas; por ajudar a construir meu caminho profissional e pessoal, ensinando detalhes que irão me acompanhar a vida toda;

Ao laboratório de Genética Toxicológica – UEL; aos novos e bons amigos, um grupo de pesquisa que sabe o valor do trabalho em conjunto, agradeço pelo apoio e amizade nestes anos, em conjunto mudamos e crescemos e esta força motriz faz de vocês grandes profissionais.

RESUMO

Estudos sobre o desenvolvimento dos adipócitos têm se tornado importante, devido ao fato da diferenciação deste tipo celular estar associado a diversas doenças crônicas e/ou degenerativas, tais como hipertensão, diabetes, doenças cardiovasculares e câncer, as quais possuem vínculo com a obesidade, devido, em parte, à expansão do tecido adiposo. A vitamina D tem demonstrado relação com a obesidade e, portanto, estudar suas bases moleculares, vias metabólicas e interação com tecidos, como o tecido adiposo, é necessário para auxiliar futuramente as ações práticas e clínicas do controle das doenças que acometem grande parte da população. Assim, o presente estudo objetiva estudar essas interações *in vitro* utilizando pré adipócitos humanos SGBS para a avaliação da expressão dos genes *VDR*, *GR* e *PPAR γ* . Para este estudo foram feitas três repetições biológicas independentes e separado por tempo de tratamento (4 horas, 12 horas, 24 horas, 4 dias, 8 dias e 12 dias) e pré-adipócitos as células do tempo 0 hora. Em todos os tempos avaliados as células foram divididas em dois grupos: controle (etanol) e tratado ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$). Realizou-se extração de RNA total com posterior análise de expressão gênica via RT-qPCR. Ao se comparar a expressão relativa dos genes alvo com o pré-adipócito não tratado (0h), para ambos os grupos e tempos, o gene *GR* apresentou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) para o grupo tratado com vitamina D nos tempos 12 e 24h, 4, 8 e 12 dias, e para o grupo controle os tempos 12 e 24h, 4 e 8 dias. Encontrou-se diferença significativa para o gene *PPAR γ* no grupo tratado para os tempos 8 e 12 dias, resultado semelhante ao grupo controle, quando comparados com o pré-adipócito (0h). A expressão basal do gene *VDR* não apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado com o pré-adipócito. No entanto, no que tange o *fold change*, o gene *VDR* foi o único a apresentar uma expressão estatisticamente diferente do tempo 0h, tendo uma expressão negativa de 2,87 ($p < 0,05$) no tempo 4 dias. Os valores de *fold change* encontrados nos adipócitos em fase tardia de maturação (4, 8 e 12 dias) não foram estatisticamente diferentes dos adipócitos em fase inicial de maturação, nos genes de interesse do estudo. A vitamina D modula a adipogênese por meio da ativação do seu receptor *VDR* e vários estudos têm sido realizados para investigar os mecanismos moleculares subjacentes aos efeitos da vitamina D nesse processo. O estudo da variação na expressão gênica em tempos diferentes de cultura celular mostra a ação desta vitamina durante a maturação da célula, até sua fase final, onde possui respostas fisiológicas de um adipócito maduro. A ação da vitamina D_3 na expressão do gene *VDR* na sua fase final de maturação é, ainda, desconhecida, deixando uma janela de oportunidade para novos estudos, uma vez que pesquisas com adipócitos humanos do tipo SGBS vem se tornando mais frequentes nos últimos anos.

Palavras-chave: Células SGBS. Adipogênese. Vitamina D_3 . Gene *VDR*. Gene *GR*. Gene *PPAR γ* .

ABSTRACT

Studies on the development of adipocytes have become important due to the fact that differentiation of this cell type is associated with several chronic and or degenerative diseases such as hypertension, diabetes, cardiovascular disease and cancer, which have link with obesity due in part to the expansion of adipose tissue. Vitamin D has shown relationship with obesity and their molecular bases, pathways and interaction with tissues, such as adipose tissue, therewise studies are necessary to support future clinical practices and actions to control of diseases that affects large populations. This research aims to study these interactions *in vitro* using SGBS human adipocytes to assess the expression of *VDR*, *GR* and *PPAR γ* genes. For this study, three independent biological replicates were made separate at treatment times (4 hours, 12 hours, 24 hours, 4 days , 8 days and 12 days) and pre- adipocyte cells from time 0 hour. At all times the cells were evaluated divided into two groups: control (ethanol) and treated (1,25(OH)₂D₃). Total RNA extraction with subsequent analysis of gene expression by RT-qPCR were performed. When comparing the relative expression of target genes with untreated pre-adipocyte (0h) for both groups and times, the GR gene showed a statistically significant difference ($p < 0.001$) for the group treated with vitamin D in 12 hours, 24 hours, and, 4, 8 and 12 days for the control group and the times 12 and 24 hours, 4 and 8 days. There was significant difference for *PPAR γ* gene in the group treated at times 8 and 12 days, similar to the control group results, when compared with the pre-adipocyte (0h). The basal expression of the *VDR* gene showed no statistically significant difference when compared with the pre-adipocyte. However, for the fold change, the *VDR* gene was the only to show expression statistically different at time 0h having a negative expression of 2.87 ($p < 0.05$) at time 4 days. The values of fold change found in adipocytes in the late stage of maturation (4, 8 and 12 days) were not statistically different from adipocytes in early stage of maturation in the genes of interest in the study. Vitamin D modulates adipogenesis through activation of its *VDR* and several studies have been conducted to investigate the molecular mechanisms underlying the effects of vitamin D in this process. The study of variation in gene expression in different cell culture times shows the action of this vitamin during cell maturation until its final phase, which has physiological responses similar of mature adipocytes. The action of vitamin D₃ in the expression of the *VDR* gene in its final phase of maturation is still unknown, leaving a window of opportunity for new studies, since research with human SGBS adipocytes is becoming more frequent in recent years.

Keywords: SGBS cells. Adipogenesis. Vitamin D3. Gene VDR. Gene GR. Gene PPAR γ .

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	12
2.1	Vitamina D e Comorbidades Associadas à Obesidade.....	12
2.2	Adipogênese.....	13
2.3	Modelos de Adipócitos <i>in vitro</i>.....	15
2.4	Genes de Interesse.....	17
2.4.1	<i>VDR</i>	17
2.4.2	<i>GR</i>	17
2.4.3	<i>PPARγ</i>	18
2.5	Justificativa para o Desenvolvimento do Estudo.....	19
3	OBJETIVOS.....	20
3.1	Geral.....	20
3.2	Específicos.....	20
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
4.1	Delineamento Experimental.....	21
4.2	Cultura de Células.....	21
4.3	Condições e Tempo de Tratamento com a 1,25(OH)$_2$D$_3$.....	22
4.4	Análise da Expressão Gênica.....	22
4.4.1	Extração de RNA.....	22
4.4.2	Síntese de cDNA.....	22
4.4.3	RT-qPCR.....	23
4.5	Análise Estatística.....	24
5	RESULTADOS.....	25
6	DISCUSSÃO.....	30
7	CONCLUSÃO.....	34
	REFERÊNCIAS.....	36

1 INTRODUÇÃO

Estudos sobre o desenvolvimento dos adipócitos têm se tornado importante, devido ao fato da diferenciação deste tipo celular estar associada ao desenvolvimento de diversas doenças crônicas e/ou degenerativas (NTAMBI & KIM, 2000; ROSEN & SPIEGELMAN, 2006; ALLOT et al., 2012). Dentre essas, devemos considerar as doenças e agravos não transmissíveis (DANTs) que incluem hipertensão, diabetes, doenças cardiovasculares e câncer, as quais possuem vínculo com a obesidade, devido, em parte, à expansão do tecido adiposo. Com um papel central no controle do equilíbrio energético e da homeostase de metabólitos, o tecido adiposo torna-se, portanto, um importante órgão para o metabolismo humano. Evidências sugerem que existe uma associação entre obesidade e deficiência de vitamina D, em várias populações do mundo (WOOD, 2008; ABOUD et al., 2013).

No Brasil, segundo a última Pesquisa de Orçamento Familiar (POF- 2008/2009), divulgada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o sobrepeso atinge grande parte das crianças (30%), adolescentes (20%) e adultos (48% das mulheres e 50,1% dos homens). No caso da obesidade, todas as faixas etárias são atingidas com valores de prevalências maiores que aqueles obtidos em pesquisas anteriores, sendo os valores para adultos de 12,4% para homens e 16,9% para mulheres (IBGE, 2010). De acordo com o mesmo estudo, divulgado em 2011 com enfoque sobre a dieta do brasileiro, observa-se que a população brasileira, aproximadamente 98%, também apresenta altos níveis de hipovitaminose D (IBGE, 2011).

Oliveira et al. (2013) avaliaram 160 adolescentes brasileiros e obtiveram resultados semelhantes ao da pesquisa realizada pelo IBGE. Dos participantes, 48,1% eram eutróficos (peso corporal adequado) e 51,9% apresentavam sobrepeso. Estes autores observaram, ainda, uma prevalência de insuficiência de vitamina D em 70,6% dos adolescentes com eutrofia e 68,8% no grupo com sobrepeso, sendo, também, observado que a baixa ingestão diária de vitamina D também foi associada aos grupos estudados.

Estudos prévios têm demonstrado uma associação inversa entre níveis de vitamina D e o índice de massa corporal (IMC), circunferência da cintura e composição corporal (ARUNABH et al., 2003; BLUM et al., 2008; GU et al., 2009; DING et al., 2010; OU et al., 2011; BELLIA et al., 2011; BINH et al., 2011). Algumas pesquisas indicam que a variação nos níveis séricos de vitamina D é influenciada pela variação da adiposidade corporal e não

somente pela variação do peso, necessitando de uma perda de peso acentuada para mensurar mudanças nos níveis séricos desta vitamina (ARUNABH et al., 2003; BELLIA et al., 2011; PICCOLO et al., 2013). Em um estudo recente foi observado que o aumento em 1kg/m^2 no IMC estava associado com a diminuição de 1nmol/L de $25(\text{OH})\text{D}_3$ (LAGUNOVA et al., 2011). Barchetta et al. (2013) demonstraram que os níveis séricos de vitamina D_3 são significativamente menores em indivíduos obesos acometidos ou não de síndrome metabólica, mesmo quando comparados com as variantes sexo, idade, IMC, circunferência da cintura e massa de gordura corporal.

A vitamina D tem relação com a obesidade e, portanto, estudar suas bases moleculares, vias metabólicas e interação com tecidos, como o tecido adiposo, é necessário para auxiliar futuramente as ações práticas e clínicas do controle das doenças que acometem grande parte da população.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Vitamina D e Comorbidades Associadas à Obesidade

A vitamina D é produzida na pele em resposta à radiação ultravioleta B (UV-B) e é convertida no fígado para 25-hidroxivitamina D₃ (25(OH)D₃), metabólito usado na quantificação sérica em exames bioquímicos. Nos rins, a 25(OH)D₃ é, então, convertida pela 1 α -hidroxilase para, assim, alcançar sua forma hormonal de 1,25-dihidroxivitaminaD₃ (1,25(OH)₂D₃), a qual atua como ligante para o fator de transcrição Receptor de Vitamina D (VDR) (HOLICK, 2010; CARLBERG et al., 2013; BARCHETTA et al., 2013).

A fração hormonal desta vitamina é lipofílica e sabe-se que em indivíduos obesos, com alto percentual de gordura subcutânea, a vitamina D₃ recém-sintetizada tem maior probabilidade de ser absorvida pela camada de gordura do que nos indivíduos não-obesos, devido ao fato de haver maior disponibilidade de tecido adiposo (ARUNABH et al., 2003). Em um estudo com indivíduos obesos e não-obesos, para avaliar os níveis de vitamina D e a resposta após a radiação UV-B, foi observado que o aumento nos níveis de vitamina D₃ foi 57% menor nos indivíduos obesos do que nos não-obesos. Ademais, observou-se que a suplementação com 50.000 UI (unidades internacionais) via oral de vitamina D₃ resultou em um aumento sérico em ambos os grupos. Os resultados desse estudo implicam que a obesidade está associada com baixos níveis de vitamina D devido à adiposidade e, consequentemente, elevada absorção de vitamina D₃ recém-sintetizada no tecido subcutâneo (WORTSMANN et al., 2000).

Os níveis séricos de 25-hidroxivitamina D₃ tidos como normais são aqueles >30 ng/mL, considerados como necessários para maximizar os efeitos benéficos da vitamina D na saúde. Insuficiência de vitamina D é constatada quando o indivíduo apresenta níveis entre 30ng/mL a 20ng/mL. Abaixo deste valor classifica-se como deficiência (BRASIL, 2010), sendo que essa condição afeta mais de 1 bilhão de pessoas em todo o mundo (HOLICK, 2007). As consequências esqueléticas da hipovitaminose D como o raquitismo e osteomalácia, em crianças, a osteoporose e fraturas frequentes, em adultos, são amplamente conhecidas. Entretanto, atualmente, novas patologias estão sendo relacionadas à insuficiência e deficiência de vitamina D como obesidade, doenças cardíacas, diabetes do tipo 1 e 2, e câncer (CARLBERG et al., 2013).

Análises sobre o metabolismo e a identificação dos fatores de transcrição e genes envolvidos nas vias metabólicas da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ foram essenciais para que novos estudos se desenvolvessem, a fim de esclarecer as ações moleculares deste secosteróide nas doenças que afetam o metabolismo, melhorando, assim, o entendimento das funções do sistema endócrino da vitamina D (CARLBERG & CAMPBELL 2013).

O excesso de adiposidade está intimamente relacionado com a diabetes do tipo 2. Tais comorbidades levam a respostas gênicas que, combinadas ao ambiente ao qual o sujeito se expõe, certamente vêm contribuindo para o aumento de uma epidemia denominada de “diabesity”, sigla em inglês que expressa a ação conjunta da obesidade e diabetes. Fatores hereditários são parcialmente responsáveis pelo desenvolvimento desta condição. No entanto, a ingestão nutricional e atividade física são fatores chave na interação genética e sua predisposição ao avanço para a epidemia (PHILLIPS, 2013).

A explicação da relação vitamina D-obesidade-diabetes tipo 2 não está totalmente esclarecida. No entanto, devido à solubilidade lipídica e possível elevada absorção tecidual do metabólito ativo, a hipovitaminose D pode ter uma conexão com a progressão da obesidade e consequente desenvolvimento das desordens metabólicas. (TRAYHURN et al., 2011).

Cheng et al. (2010) avaliaram a correlação da vitamina com o tecido adiposo. Mesmo sendo o tecido adiposo subcutâneo o mais abrangente em volume e estoque lipídico no corpo humano, a gordura visceral está mais relacionada com os níveis baixos de vitamina D sérica, mesmo se avaliados em pessoas com IMC nos níveis de eutrofia. A $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ modula a adipogênese através da ativação do seu receptor e com isso a depleção de vitamina D no organismo pode levar à diferenciação excessiva de pré-adipócitos para adipócitos (CHENG et al., 2010).

2.2 Adipogênese

O conteúdo celular do tecido adiposo é de, aproximadamente, 50% de adipócitos, sendo o restante constituído de frações vasculares estromais de fibroblastos, células endoteliais, macrófagos e pré-adipócitos. Frente a um balanço calórico positivo, há o aumento de estoque energético e ativação de novas células para estoque de energia, ocorrendo assim a adipogênese dos pré-adipócitos (BAYS et al., 2008).

A adipogênese tem seu início na vida pré-natal, desenvolvendo-se de acordo com o ambiente vivenciado durante a gestação. Neste período, há a formação do tecido adiposo marrom e maturação do tecido adiposo branco (PALOU et al., 2013). Fundamentava-se a ideia de que o número de adipócitos humanos era fixado na infância, predestinando, assim, à obesidade ou eutrofia. Entretanto, atualmente, afirma-se que não há somente uma hipertrofia (aumento do volume lipídico intracelular) como também a hiperplasia (aumento no número de células), como recrutamento e proliferação de pré-adipócitos nos humanos adultos, transformando-se em importante foco de estudo para os eventos de desordem metabólica (BAYS et al., 2008).

As desordens metabólicas sofrem influência dos fatores genéticos tanto quanto dos ambientais. Atividade física e a ingestão alimentar, quando praticados de forma saudável, são o alicerce para a prevenção de doenças relacionadas à obesidade. Em desequilíbrio, tais fatores afetam grupos gênicos diferentes, como aqueles relacionados ao gasto de energia (*UCP*, proteínas desacopladoras) e o grupo adipogênico (*PPAR*, receptor ativado por proliferadores de peroxissoma; *VDR*, receptor de vitamina D; e *RXR*, receptor X de retinóide) (BAYS et al., 2008; BINH et al., 2011; PALOU et al., 2013).

Estudos têm sido realizados para investigar os mecanismos moleculares subjacentes aos efeitos da vitamina D na adipogênese (SHI et al., 2002; BLUMBERG et al., 2006; KONG & LI, 2006; BINH et al., 2011; OCHS-BALCOM et al., 2011). Dada a importância do tecido adiposo no desenvolvimento de doenças, o delineamento de eventos moleculares envolvendo a regulação da vitamina D na adipogênese, vem se tornando necessário.

A cascata da adipogênese segue um programa amplamente definido. Para cada modelo de estudo *in vitro* há um período de diferenciação que varia entre 4 a 12 dias. Modelos *in vitro* de cultura celular de ratos desenvolvem os estágios sequenciais da adipogênese de 4-7 dias, e modelos de cultura celular humana desenvolvem entre 8-12 dias. No início de sua expansão mitótica clonal, genes da família *C/EBP β* e *C/EBP δ* iniciam a cascata de expressão para diferenciação celular, induzindo a expressão dos genes *C/EBP α* e *PPAR γ* . Tais genes são reguladores centrais da transcrição na adipogênese, os quais ativam a expressão de genes específicos para esse processo. Subsequentemente, no estágio final, as células são terminalmente diferenciadas em adipócitos maduros (KONG & LI, 2006; WOOD, 2008; PHILLIPS, 2013).

Concomitantemente à expressão gênica em cascata, descrita anteriormente, há, também, o aumento da expressão do gene *VDR*, durante a diferenciação, e essa disponibilidade do produto do gene *VDR* possibilita a influência da vitamina D no processo de diferenciação dos pré-adipócitos em adipócitos (WOOD, 2008).

Adipogênese é, portanto, um processo fisiológico importante na qual sua função ou disfunção pode prevenir ou promover doenças metabólicas.

2.3 Modelos de Adipócitos *in vitro*

Green & Meuth (1974) estão entre os primeiros autores a citar a atividade *in vitro* da linhagem celular 3T3, isolada de células não-clonais de camundongos Swiss, as quais demonstraram capacidade de diferenciação e maturação celular semelhantes com as de um adipócito humano, sendo estabelecido como o primeiro modelo de cultura celular para adipogênese.

Em 2001, Wabitsch et al. (2001) apresentaram um novo modelo de estudo *in vitro*, com uma linhagem celular derivada de tecido adiposo humano, as células do tipo SGBS.

A linhagem celular SGBS é derivada do tecido adiposo subcutâneo branco de uma paciente com Síndrome Simpson-Golabi-Behmel, uma desordem rara caracterizada pelo supercrescimento celular pré e pós-natal. A linhagem, quando estabelecida, exibe alta capacidade para estudo da diferenciação adiposa, resistindo até a 50ª geração, o que a difere de culturas primárias obtidas de amostras de tecido adiposo humano sem a síndrome, pois essa possui expansão clonal limitada. A linhagem também possui potencial na maturação da célula adiposa, a qual é bioquímica e fisiologicamente similar aos adipócitos humanos. A morfologia das SGBS é do tipo fibroblasto e foi comparada com células estromais obtidas de amostra de tecido adiposo de crianças saudáveis tendo como resultado o mesmo padrão de crescimento, morfologia e fisiologia (WABITSCH et al., 2001; FISCHER-POSOVSKZY et al., 2008).

O cultivo celular com adição de meio de cultura específico para indução da diferenciação promove o desenvolvimento e maturação da célula em até 20 dias. Sendo assim, denomina-se pré-adipócito as células cultivadas em meio de proliferação celular para expansão mitótica clonal. Células em fase primária de maturação são aquelas que estão sob influência do meio de diferenciação por até 96 horas e, adipócitos maduros, aqueles que

assemelham-se bioquímica e fisiologicamente à adipócitos maduros. Isto ocorre entre 12 e 20 dias após a indução da diferenciação. Durante o período de maturação, a maioria das células acumulam lipídeos e, ao final, apresentam morfologia típica de células maduras, como os vacúolos no citoplasma preenchidos com lipídeos (WABITSCH et al., 2001).

A linhagem SGBS são amplamente usadas em pesquisas relacionadas à obesidade e seus eventos moleculares, como a avaliação da expressão de genes relacionados à inflamação do tecido adiposo (KEUPER et al., 2011), modulação de fitoquímicos no perfil da expressão de genes responsáveis pela inflamação do tecido (ZAGOTTA et al., 2013) e micro arranjos relacionados à cascata adipogênica, sob a influência de um agente externo ou não (LAHNALAMPI et al., 2010; GEIGER et al., 2011)

Múltiplas opções de linhagens celulares estão disponíveis para pesquisa no campo da adipogênese (Tabela 1). Entretanto, como exemplificado anteriormente, a linhagem celular SGBS é uma ferramenta prática e eficaz para estudos *in vitro* e, portanto, para esta pesquisa optou-se por esta linhagem celular, a qual foi doada pelo Prof.º Dr. Carsten Carlberg da University of Eastern Finland, Kuopio, Finlândia.

Tabela 1: Linhagens celulares usadas para o estudo da adipogênese.

Linhagem celular	Espécie	Origem
Totipotentes		
Células tronco embrionárias	camundongo	blastócitos de camundongos
Multipotentes		
10T1/2	camundongo	embrião de camundongos
3T3-F442A	camundongo	embrião de camundongos Swiss (células 3T3)
Unipotentes		
hMSC imortalizada	humano	
3T3-L1	camundongo	embrião de ratos Swiss
Ob17	camundongo	gorduraepididimal de ratos ob/ob
TA1	camundongo	subclone de 10T1/2 tratado com 5-azacitidina
Lisa-2	humano	liposarcoma
Linhagem celular		
Primária	rato	WAT de todos os depósitos de recém-nascidos e adultos
Primária	camundongo	WAT de todos os depósitos de recém-nascidos e adultos

Primária	humano	WAT de todos os depósitos de recém-nascidos e adultos
Células tronco adultas	camundongo, rato e humano	medula óssea
SGBS	humano	Subcutâneo WAT de uma criança com SGBS

hMSC = Célula tronco mesenquimal
WAT = Tecido adiposo branco

Fonte: Adaptado de Fischer-Posovskzy et al. 2008.

2.4 Genes de Interesse

2.4.1 *VDR*

As respostas biológicas ao hormônio $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ são mediadas pelo receptor da vitamina D (*VDR*). O receptor é originalmente identificado como uma proteína associada à cromatina, que se liga a este metabólito ativo. Ao chegar à célula alvo, a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ se dissocia da sua proteína ligante, normalmente albumina, e entra no núcleo da célula, interagindo com o produto do gene *VDR*. O *VDR* é um fator de transcrição que gera sinais de transdução complexos ao formar um heterodímero com o receptor X de retinóide (*RXR*). O ligante heterodímero *VDR-RXR* é capaz de reconhecer os elementos responsáveis à vitamina D (VDREs) na sequência de DNA, responsável por regular genes ativados, portanto, pela vitamina D (WHITFIELD et al., 2005; HAUSSLER et al., 2011).

Estudos dessas ações moleculares podem nortear o entendimento dos efeitos alvo do *VDR* na fisiologia. Parte deste arranjo de efeitos específicos e sensibilidade são determinados pelo estado de epigenética intrínseca e expressão compartilhada de co-fatores, e complexos de modificação de histonas. Recentemente a vitamina D_3 demonstrou efeitos na proliferação celular e diferenciação em uma variedade de tecidos (YANG et al., 2012). Por exemplo, o *VDR* é importante na diferenciação de células tronco mesenquimais para células ósseas e adipócitos. Estes estudos permitem uma ampla compreensão da interação da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e o controle da fisiologia do corpo humano em geral (CARLBERG & CAMPBELL, 2012).

Na cascata de ativação da adipogênese, outros ativos metabólicos envolvem os genes, porém a vitamina D destaca-se como um dos metabólitos chave para a compreensão e modulação desta via. A via pela qual a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ conduz à diferenciação total do pré-

adipócito não está totalmente elucidada, contudo, evidências sugerem que a ativação de genes primários (como o *VDR*, genes da família *PPAR* e da família *C/EBP*) e suas respostas em cascata compõem o cerne desta complexa via.

2.4.2 *GR*

O gene *GR* (receptor de glucocorticóide) também denominado na literatura como *NR3C1* (GEELLEN et al., 2013; MOREIRA et al., 2013) é um fator de transcrição ligante-dependente que pertence a super família dos receptores nucleares hormonais. As duas principais vias moleculares pelas quais o *GR* controla a transcrição são: i) a dimerização e ligação direta à elementos positivos ou negativos da resposta a glucocorticóides (GRE) e ii) a ação dos monômeros *GR* que influenciam indiretamente a transcrição de genes por meio de interações proteína-proteína com outros fatores de transcrição (por exemplo *VDR-RXR*) (SILVERMAN & STERNBERG, 2012).

Devido à interação dos glucocorticóides com a enzima responsável pela conversão da vitamina D à sua forma ativa, a alteração na transcrição dessa enzima, acabam por, definirem novos mecanismos de cooperação funcional dos genes *GR*, *C/EBPβ* e *VDR* na regulação do catabolismo da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (DHAWAN& CHRISTAKOS, 2010).

Da família dos hormônios esteróides, o glucocorticóide desempenha uma ação crítica e complexa sobre o metabolismo de triglicerídeos (TG). Durante o jejum, tanto curto quanto prolongado, os níveis de glucocorticóides na circulação aumentam, estimulando a lipólise dos adipócitos e, então, o TG é hidrolisado à ácido graxo (AG) e glicerol. Ácidos graxos livres (AGL) são mobilizados para o músculo esquelético e para o fígado para serem oxidados e usados como energia, enquanto o glicerol se transforma em substrato para gluconeogênese hepática. O mecanismo oposto, de estoque dos ácidos graxos livres, também é mediado pelos glucocorticóides, demonstrando prováveis efeitos tanto para a lipogênese quanto para a lipólise, dependendo da necessidade de depósito da gordura (WANG et al., 2012)

Esta rede de síntese e degradação do triglicerídeo está intrinsicamente ligada ao gene *GR*. A homeostase dos triglicerídeos armazenados nos adipócitos está ligada a ação da via de mecanismos que o gene *GR* desencadeia após ativação e, portanto, abre caminhos para novos questionamentos no campo da interação nutriente *versus* doença, podendo este gene participar ativamente da captação de triglicérides do adipócito (YU et al., 2010).

O gene *GR* e seus ligantes do cortisol estão presentes como fatores centrais da regulação e controle dos eventos da adipogênese em humanos (LAHNALAMPI et al., 2010).

2.4.3 *PPAR γ*

O receptor nuclear *PPAR γ* é requerido para a formação do tecido adiposo e é também alvo para drogas de sensibilização à insulina, usadas no tratamento de doenças envolvidas na síndrome metabólica, como a diabetes (LEHRKE & LAZAR, 2005). O *PPAR γ* atua como um ativador transcricional de vários genes específicos nos adipócitos envolvidos na síntese, direcionamento e estocagem de lipídeos, sendo uma das chaves para a manutenção, função e regulação da diferenciação dos adipócitos (FARMER, 2006). O *PPAR γ* se liga a elementos de respostas formando heterodímeros associados com a maioria das induções gênicas relacionadas ao metabolismo de lipídeos e glicose (NIELSEN et al., 2008).

Estudos *in vivo* demonstraram que a forma ativa da vitamina D₃ exerce uma ação de sensibilização à insulina pelo aumento da expressão dos receptores de insulina nos tecidos periféricos e facilita o transporte de glicose mediado pela insulina (NAZARIAN et al., 2011; RYU et al., 2013). Além disso, a vitamina D₃ regula diretamente o metabolismo de AGL, agindo sobre o *PPAR γ* e melhorando a resistência à insulina induzida por AGL. Portanto, a deficiência de vitamina D pode agravar o grau de resistência à insulina, por meio de um maior fluxo de AGL na corrente sanguínea (ZHOU et al., 2008).

Rosen et al. (2002) demonstraram dois modelos do papel dos genes *C/EBP α* e *PPAR γ* na adipogênese. No primeiro modelo os genes *PPAR γ* e *C/EBP α* induzem a expressão um do outro e podem agir independentemente na promoção da diferenciação de adipócitos; já no segundo apresenta um modelo alternativo onde o gene *PPAR γ* é o regulador direto da adipogênese, enquanto o gene *C/EBP α* possui papel central na manutenção da expressão do gene *PPAR γ* e na promoção da sensibilidade a insulina.

2.5 Justificativa para o Desenvolvimento do Estudo

A interação da vitamina D₃ na via adipogênica ainda não está totalmente esclarecida. As vias moleculares são peças chaves para o entendimento da via adipogênica, e auxiliam no futuro desenvolvimento de novas terapias. Estudos com o objetivo de esclarecer as vias

moleculares da adipogênese são de interesse de saúde pública, auxiliando no desenvolvimento de novos caminhos da nutrição e medicina personalizadas. Com isso, o presente estudo visa entender essas interações *in vitro* utilizando-se pré adipócitos humanos SGBS para a avaliação da expressão dos genes *VDR*, *GR* e *PPAR γ* .

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Determinar os efeitos da vitamina D ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) na expressão dos genes *PPAR γ* , *VDR* e *GR* em pré-adipócitos, fase primária de maturação do adipócito e em adipócitos SGBS.

3.2 Específicos

- Avaliar a expressão dos genes *PPAR γ* , *VDR* e *GR* em células SGBS submetidas ao tratamento com $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ nos tempos 0, 4, 12 e 24 horas e nos tempos 4, 8 e 12 dias.

- Avaliar a expressão dos genes *PPAR γ* , *VDR* e *GR* em células SGBS não tratadas com $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ nos tempos 0, 4, 12 e 24 horas e nos tempos 4, 8 e 12 dias.

4 MATERIAIS E METODOS

4.1 Delineamento Experimental

Para este estudo foram feitas três repetições biológicas independentes. Os frascos de cultura foram designados para o experimento após atingirem 90% de confluência. Os frascos foram separados por tempo de tratamento (4 horas, 12 horas, 24 horas, 4 dias, 8 dias e 12 dias) e os pré-adipócitos considerados as células do tempo 0 hora. Em todos os tempos avaliados as células foram divididas em dois grupos: controle (tratados com etanol) e tratados (tratados com $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$).

Após cada tempo de tratamento das células, realizou-se a extração de RNA total e, posteriormente, RT-qPCR para análises de expressão gênica.

4.2 Cultura de Células

Pré-adipócitos humanos da linhagem celular SGBS foram cultivados em placas de cultura de 9cm³ (TPP), em estufa com controle de umidade a 95% e concentração de CO₂ a 5%. As placas foram tratadas com uma solução de adesão contendo gelatina a 0,05% e fibronectina (Sigma Aldrich). Para o crescimento e proliferação celular utilizou-se meio de cultura Dulbecco's modified Eagle's/Nutrient Mix F12 (DMEM/F12) (Gibco, Paisley, UK), suplementado com biotina (Sigma Aldrich, 8mg/L), d-pantotenato (Sigma Aldrich, 4mg/L), Antibiótico-Antimicótico 100X (Gibco, 10ml/L) e 10% de FBS (soro bovino fetal, não aquecido), referido como meio de crescimento.

Células confluentes foram tratadas com o meio de crescimento (denominado meio OF), sem a adição de FBS, para estabilização do crescimento celular. Passadas 24 horas, as células foram tratadas com meio de diferenciação, denominado Quickdiff, composto por DMEM/F12, transferrina humana (Sigma Aldrich, 0,01mg/ml), insulina (Sigma Aldrich, 20nM), cortisol (0,1uM), T3 (Sigma Aldrich, 200 nM), IBMX (Sigma Aldrich, 500 uM) e rosiglitazona (Sigma Aldrich, 100 nM). Após 96 horas, o meio de cultura foi trocado por outro capaz de manter a diferenciação, denominado 3FC, composto por DMEM/F12, transferrina humana (0,01 mg/ml), insulina (20 nM) e cortisol (0,1 uM). Realizou-se a troca

do meio 3FC a cada 96 horas até a total diferenciação e amadurecimento dos adipócitos, os quais ocorreram até o 12º dia de cultura.

4.3 Condições e Tempo de Tratamento com a 1,25(OH)₂D₃

Células com 90% de confluência receberam tratamento com 1,25(OH)₂D₃ a 100nM, enquanto o grupo controle foi tratado com etanol (0,001%), uma vez que esse foi o veículo de diluição da vitamina. A concentração da vitamina D para tratamento foi sugerida pelo consultor do projeto, Prof. Carsten Carlberg, da University of Eastern Finland, Kuopio, Finlândia, com base em experiências anteriores obtidas em seu Laboratório. A 1,25(OH)₂D₃ foi adicionada a cada troca de meio.

De acordo com as sequências de eventos ocorridas no decorrer da adipogênese, considerou-se pré-adipócitos as células do tempo 0 hora; em fase primária de diferenciação as células dos tempos 4 horas, 12 horas, 24 horas; em fase final de maturação as células do tempo 4 e 8 dias e adipócito maduros as células do tempo 12 dias.

4.4 Análise da Expressão Gênica

4.4.1 Extração de RNA

Realizou-se extrações de RNA total nos diferentes tempos, de acordo com o protocolo, para avaliação dos níveis de expressão do mRNA dos genes alvo.

O RNA total das células foi isolado e purificado utilizando-se o kit RNeasy Mini Kit (Qiagen), de acordo com protocolo do fornecedor. O RNA isolado foi quantificado no NanoDrop (ThermoScientific), sendo que a razão A260nm/280nm manteve-se entre 1,9 e 2,1, e a integridade confirmada usando eletroforese (80V, 30mA, 30 minutos) em gel de agarose 0,4%.

4.4.2 Síntese de cDNA

O cDNA foi sintetizado a partir de 1 µg do RNA total extraído. O volume final da reação foi de 20 µL, composto por 10% de tampão de reação (200 mM Tris-HCl (pH 8.4),

500 mM KCl – Invitrogen), 1,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen), 0,5 mM de dNTPs (Invitrogen), 80 pmol de Oligo dT12-18 (Invitrogen), 100 pmol de RandomPrimers (Invitrogen), 10 unidades da enzima SuperScript III (Invitrogen) e 2 unidades da enzima RNaseOut (Invitrogen). Inicialmente, uma mistura constituída apenas por RNA, Oligo dT12-18, RandomPrimers e dNTPs foi submetida a uma pré-incubação de 10 minutos a 65° C em termociclador Veriti (AppliedBiosystems), seguido de choque térmico em gelo. Uma segunda mistura contendo os demais constituintes foi preparada e adicionada à mistura inicial, totalizando 20 µL. Em seguida, a mistura final obtida foi submetida ao seguinte programa de reação em termociclador Veriti: 2 minutos a 25° C, 45 minutos a 50° C e 15 minutos a 70° C.

Para minimizar variações de desempenho da transcriptase reversa três reações distintas de síntese de cDNA foram realizadas para cada experimento, cujos produtos foram incorporados para obtenção de uma única mistura referente a cada amostra em sua respectiva condição de cultivo, como descrito por Pfaffl (2004) e Bustin et al. (2005). Os cDNAs sintetizados também foram quantificados por espectrofotometria, e a concentração final ajustada para 50 ng/µL.

4.4.3 RT-PCR

A reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa (RT-qPCR) foi utilizada para avaliar a expressão relativa dos genes de interesse. O gene *RPLP0* (proteína ribossomal P0) foi usado como gene constitutivo (Tabela 2).

Tabela 2: Sequências dos primers dos genes alvos e constitutivos

Gene	Foward	Reverse
<i>VDR</i> ^b	5'AGATGACCCTTCTGTGACCC 3'	5'AGCTTCTTCAGTCCCACCTG 3'
<i>GR</i> ^b	5'GGAACCTTACACCTGGATGAC 3'	5'GTAACCTCAGAGGAAACATACAG 3'
<i>PPARG</i> ^b	5'CGACCAAGTAACTCTCCTCA 3'	5'GTTCCGTGACAATCTGTCTG 3'
<i>RPLP0</i> ^{ac}	5'AGATGCAGCAGATCCGCAT 3'	5'GTGGTGATACCTAAAGCCTG 3'

Fonte: ^aWABITSCH et al., 2001; ^bLAHNALAMPI et al., 2010; ^cHOLICK, 2012.

Os dados da RT-qPCR (reação em cadeia da polimerase quantitativa) foram normalizados por meio da avaliação da razão do Ciclo Threshold (Ct) entre os genes de interesse e o gene constitutivo, que foi amplificado em conjunto.

Os dados referentes à expressão gênica foram obtidos pelo emprego da técnica de PCR em tempo real, com a utilização do sistema CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Para tal, foi utilizado o kit SsoAdvanced™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad – cat. N° 1725260), seguindo recomendações do fabricante, para um volume final de 10 µL, utilizando 5 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador e 250 ng de cDNA molde.

A mistura de reação foi submetida ao seguinte programa de amplificação: 50° C por 2 minutos; 95° C por 5 minutos; 40 repetições de ciclos de 15 segundos a 95° C (desnaturação), 15 segundos a 60° C (anelamento) e 30 segundos a 72° C (extensão). Todas as reações foram realizadas em triplicatas técnicas.

A especificidade da amplificação foi avaliada para cada amostra assegurando que apenas o produto de interesse fosse amplificado em cada reação, por meio da curva de fusão (*melting curve*), variando-se a temperatura de 50° C a 98° C em 0,5° C/2 segundos. Os dados foram analisados pelo CFX Manager™ software (Bio-Rad).

4.5 Análise estatística

Os dados estão apresentados como média ± desvio padrão (SD). As RT-qPCR foram realizadas em três repetições biológicas, e, por esse motivo, para a identificação de *outliers* realizou-se o teste de Grubbs (GRUBBS, 1969).

A expressão basal dos genes foi calculada por meio da fórmula $2^{-(\Delta Ct)}$ e usou-se a fórmula $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ (Pfaffl, 2002) para o cálculo da expressão relativa do gene de interesse em função do gene constitutivo, onde o $\Delta\Delta Ct$ é o $\Delta Ct_{(tratamento)} - \Delta Ct_{(veículo)}$, sendo que o ΔCt é o $Ct_{(gene\ alvo)} - Ct_{(RPLP0)}$. A razão da expressão relativa (*fold change*) foi feita dividindo-se o $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ do grupo tratado com vitamina D pelo $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ do grupo controle com o etanol, para cada tempo.

Para análise de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, os resultados do *fold change* foram transformados em $\log(2)$ e, posteriormente, analisados por meio do teste *t* de Student para uma amostra, para todos os genes de interesse e tempos estudados.

Para validação do constitutivo utilizado aplicou-se a Análise de Variância (ANOVA) com os valores dos Ciclos Threshold (Ct) obtidos de cada amplificação. Já para análise de diferenças entre os tempos e tratamentos com o tempo 0h, para cada gene de interesse, aplicou-se a ANOVA, seguido por Dunnet, quando necessário. Seguiu-se a análise com o

teste F, a fim de verificar diferenças estatisticamente significativas entre a fase inicial de maturação (4 horas, 12 horas e 24 horas) e a fase tardia de maturação (4 dias, 8 dias e 12 dias).

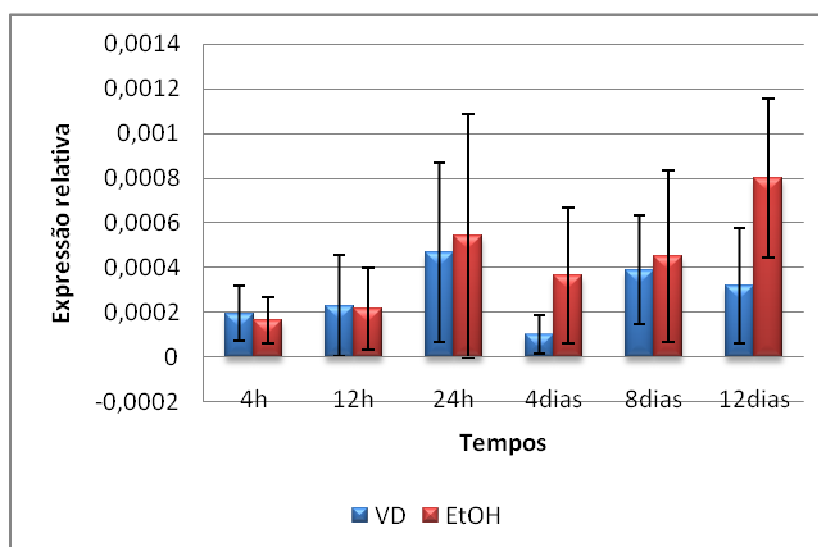
Médias foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de p foi menor que 0,05. A análise estatística foi realizada através do *software* R.

5 RESULTADOS

A expressão relativa em função do gene constitutivo foi obtida para avaliar a variação da expressão basal entre os tempos analisados (4h, 12h, 24h, 4 dias, 8 dias e 12 dias), e cada grupo (controle e tratado), com os pré-adipócitos. O gene constitutivo *RPLP0* apresentou pouca variância entre os tempos pesquisados, mostrando-se um constitutivo ideal para as análises no presente estudo ($p=0,9973$).

O gene *VDR* não apresentou mudanças estatisticamente significativas entre a expressão relativa das células tratadas com vitamina D₃ (VD) e tratadas com etanol, pertencentes a cada tempo estudado, quando comparadas ao tempo 0 hora (Figura 1).

Figura 1 - Expressão relativa do gene *VDR* em relação ao gene constitutivo, nos grupos tratado e controle, para cada tempo avaliado.

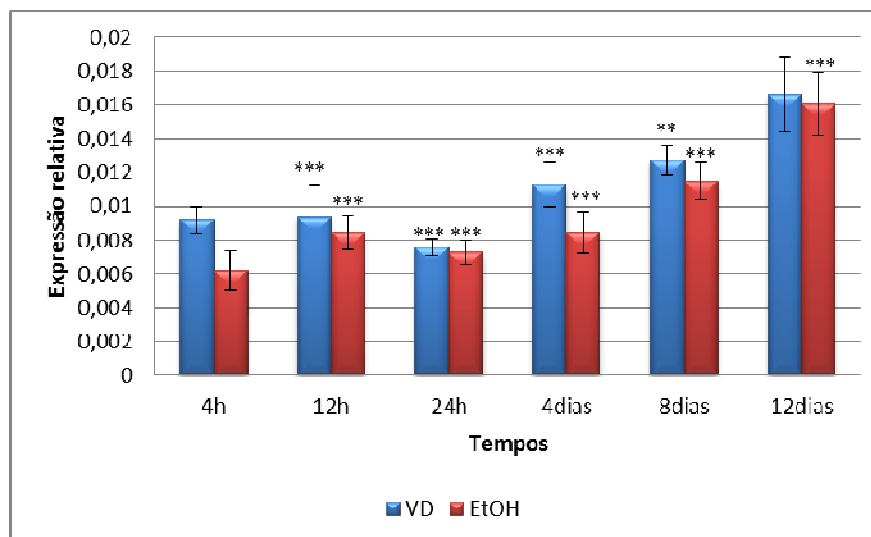


A RT-qPCR do RNAm das células SGBS foi realizada para determinar a expressão relativa dos genes alvos em relação ao constitutivo *RPLP0*. As colunas representam a média de três repetições biológicas e as barras indicam o desvio padrão. As significâncias foram determinadas através da Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnet entre grupos, para todos os tempos, e o pré-adipócito não diferenciado. VD = vitamina D₃; EtOH = Etanol.

Os resultados de expressão relativa para o gene *GR* apresentaram uma diferença significativa ($p<0,05$) para o grupo controle, nos tempos 12 horas, 24 horas, 4 dias, 8 dias e 12 dias e, também para o grupo tratado, nos tempos 12 horas, 24 horas, 4 dias e 8 dias, quando

comparados com o tempo 0 hora (pré-adipócito) (Figura 2).

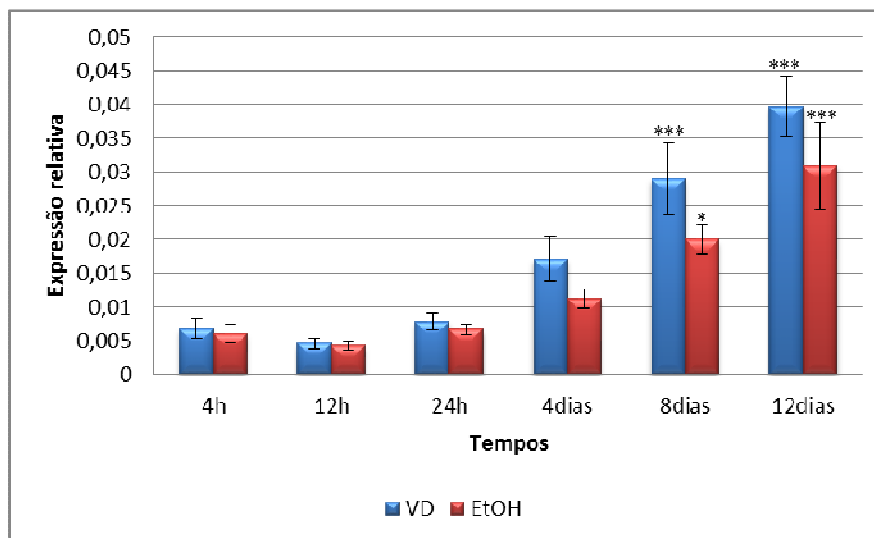
Figura 2 - Expressão relativa do gene GR em relação ao gene constitutivo, dos grupos tratado e controle para cada tempo avaliado.



A qPCR do RNAm das células SGBS foi realizada para determinar a expressão relativa dos genes alvos em relação ao constitutivo *RPLP0*. As colunas representam a média de três repetições biológicas e as barras indicam o desvio padrão. As significâncias foram determinadas através da Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnet entre grupos, para todos os tempos, e o pré-adipócito não diferenciado (0h) (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). VD = vitamina D3; EtOH = Etanol.

O gene *PPAR γ* , assim como o gene *GR*, apresentou uma diferença significativa em sua expressão relativa, quando comparado com os pré adipócitos não tratados (0h). Porém, os resultados encontrados somente nos tempos 8 dias e 12 dias de diferenciação, em ambos os grupos, demonstraram uma possível alteração de expressão do *PPAR γ* na fase tardia de maturação dos adipócitos (Figura 3).

Figura 3 - Expressão relativa do gene *PPAR γ* em relação ao gene constitutivo, dos grupos tratados e controle, para cada tempo avaliado.

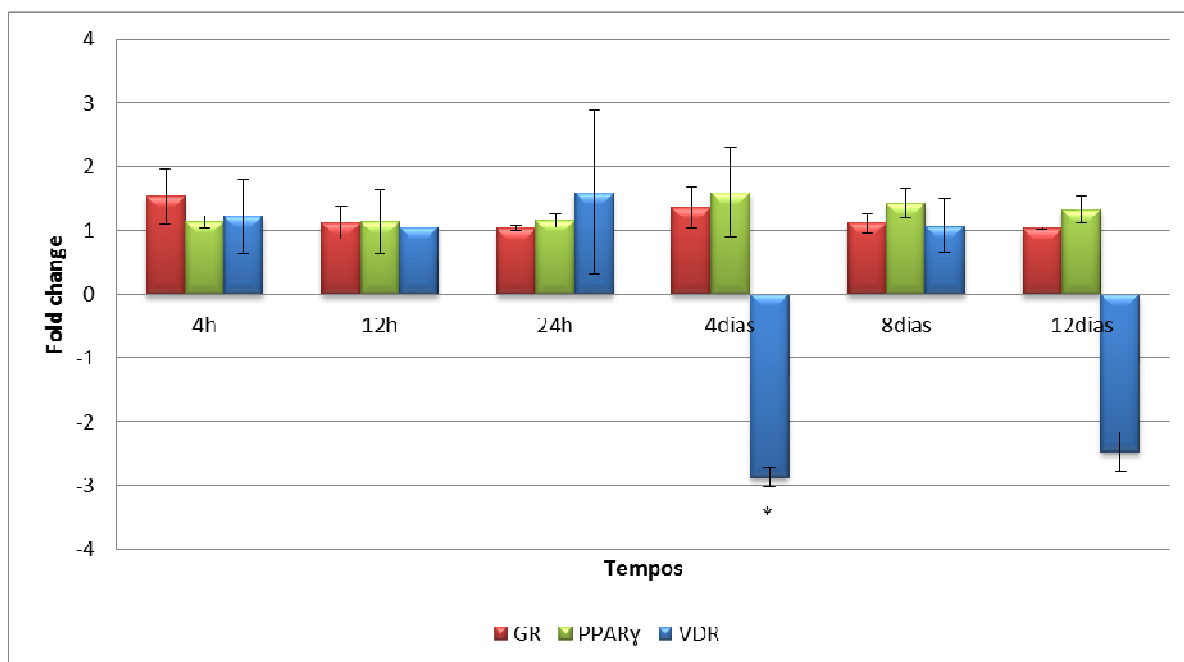


A qPCR do RNA das células SGBS foi realizada para determinar a expressão relativa dos genes alvos em relação ao constitutivo *RPLP0*. As colunas representam a média de três repetições biológicas e as barras indicam o desvio padrão. As significâncias foram determinadas através da Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnett entre grupos, para todos os tempos, e o pré-adipócito não diferenciado (0h) (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). VD = vitamina D3; EtOH = Etanol.

A Figura 4 apresenta o *fold change* dos genes de interesse, nos diferentes tempos analisados, em células SGBS. O *fold change* foi obtido da razão da expressão relativa dos genes alvos (*VDR*, *GR* e *PPAR γ*) entre os grupos (tratado e controle) a fim de avaliar se o grupo tratado com a vitamina D obteve uma expressão estatisticamente diferente do grupo controle (EtOH). Calculou-se o *fold change* seguido pelo teste *t* de Student para uma amostra. Os valores encontrados não foram significativos, com exceção do gene *VDR* (Tabela 3).

Assim, foi observada uma expressão negativa de 2,87 vezes menor que a expressão em células tratadas com vitamina D, para o gene *VDR*, no tempo 4 dias, retornando a uma expressão basal no tempo 8 dias (*fold change* de 1,07) e, no tempo final (12 dias), novamente, uma expressão negativa de menos 2,47 vezes, nas células tratadas com vitamina D. Apenas o valor de *fold change* do tempo 4 dias para o gene *VDR* foi estatisticamente significativo ($p < 0,05$).

Figura 4 – *Fold change* dos genes alvos nos diferentes tempos analisados em células SGBS.



As colunas representam as médias de três repetições biológicas e as barras os desvios padrões. O Teste *t* de Student para uma amostra foi realizado para determinar as diferenças significativas entre os grupos analisados para os tempos do estudo (* $p < 0.05$).

Estudos pilotos demonstraram que a fase inicial de maturação dos adipócitos apresentava um padrão de expressão diferente da fase final de maturação, fato observado na análise de *fold change* do gene *VDR*. Dessa forma procurou-se verificar se, por meio do teste F entre os valores de *fold change*, se a fase inicial (4 horas, 12 horas e 24 horas) de maturação foi estatisticamente diferente da fase final (4 dias, 8 dias e 12 dias). Os valores de *p* encontrados foram de 0,064 para o gene *VDR*, 0,631 para o gene *GR* e de 0,674 para o gene *PPAR γ* . Assim, observa-se que os genes alvos do estudo não apresentaram diferenças quando o padrão de expressão encontrado na fase inicial de maturação e na fase final de maturação dos adipócitos SGBS.

Tabela 3 - Valores médios de *foldchange* das células SGBS em diferentes tempos.

<i>VDR</i>			
Tempo	Média		
4h	1,222	±	0,585
12h	1,052	±	0,366
24h	1,595	±	1,290
4dias	-2,873*	±	0,144
8dias	1,075	±	0,421
12dias	-2,474	±	0,302
<i>GR</i>			
Tempo	Média		
4h	1,540	±	0,439
12h	1,125	±	0,254
24h	1,040	±	0,038
4dias	1,365	±	0,326
8dias	1,119	±	0,153
12dias	1,033	±	0,020
<i>PPARγ</i>			
Tempo	Média		
4h	1,134	±	0,097
12h	1,138	±	0,500
24h	1,164	±	0,108
4dias	1,601	±	0,703
8dias	1,430	±	0,243
12dias	1,330	±	0,206

A qPCR do mRNA das células SGBS foi realizada para determinar a expressão relativa dos genes alvos em relação ao constitutivo *RPLP0*. As significâncias foram determinadas através do teste de *t* de Student para uma amostra, para todos os tempos (* $p < 0,05$).

6 DISCUSSÃO

A $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ modula a adipogênese por meio da ativação do seu receptor *VDR* (CHENG et al., 2012) e vários estudos têm sido realizados para investigar os mecanismos moleculares subjacentes aos efeitos da vitamina D na adipogênese (SHI et al., 2002; BLUMBERG et al., 2006; KONG & LI, 2006; BINH et al., 2011; OCHS-BALCOM et al., 2011). Nimitphong et al. (2012) demonstraram que, embora a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ não afete o marcador primário da adipogênese, o gene *C/EBP β* , ela foi capaz de manter a expressão dos genes *C/EBP α* e *PPAR γ* elevada durante a fase final de diferenciação, quando o meio de cultura celular para a diferenciação teve a adição de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Por isso, os autores creditam a promoção da diferenciação de pré-adipócitos humanos pela vitamina D, à manutenção de altos níveis de expressão desses fatores de transcrição chave para a adipogênese, resultado também encontrado em nosso estudo com relação ao gene *PPAR γ* .

Kong & Li (2006) observaram que o tratamento com $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ foi capaz de estabilizar a expressão do *VDR* em células 3T3-L1 por, pelo menos, um dia adicional. Os autores sugerem que a estabilização do *VDR* pelo tratamento com vitamina D_3 pode mediar os efeitos na adipogênese. Esta constatação é consistente com a hipótese de que qualquer influência da vitamina D na adipogênese, provavelmente, seria exercida no início da transição de pré-adipócito para adipócitos maduro onde o *VDR* estaria mais disponível (LUONG & NGUYEN, 2013).

No presente estudo, a avaliação da expressão relativa do gene *VDR* nos tempos avaliados não foi significativa em relação ao pré-adipócito (Figura 1). No entanto, os resultados do *fold change* sugerem que o gene *VDR* possa influenciar na fase tardia de maturação celular através da interação com outros genes e/ou fatores de transcrição, uma vez que após 8 dias de diferenciação dos adipócitos, o gene *VDR* apresentou uma expressão basal positiva (1,07), sendo que o perfil de expressão encontrado na literatura demonstra uma regulação negativa do gene *VDR* após 24 horas de diferenciação (Figura 4). Esse repentino retorno aos níveis basais de expressão do gene *VDR*, após 8 dias, apresenta-se como um dado novo, frente às descobertas da modulação da adipogênese pela vitamina D.

A cascata de ativação que o gene *VDR* proporciona é ampla e nem todos os sítios genômicos são ainda conhecidos. No entanto, os principais sítios são: a ativação dos genes *CYP27B1* (TURUNEN et al., 2007) e *CYP24* (VAISANEN et al., 2005), *CCNC* (gene ciclina

C) (SINKKONEN et al., 2005) e da família do gene *IGF* (MATILAINEN et al., 2005). Hikkinen et al (2011) trataram monócitos da linhagem THP-1 com $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ por 4 horas e encontraram mais de 2.300 sítios genômicos expressos após a ativação do *VDR*, concluindo que a maioria destes genes encontrados, por meio da análise de micro arranjo, são genes alvos primários do *VDR*, sendo que a maioria (64%) dos genes alvos da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ tinham expressão positiva. Pouco se sabe ainda se estes mesmos sítios genômicos são ativados em qualquer fase de maturação celular, sob a presença do ligante do *VDR*. Assim sendo, ainda não é completamente conhecido se a expressão positiva em um tempo tardio de diferenciação celular, como a encontrada no nosso estudo, para adipócitos, pode resultar em uma nova cascata de ativação de sítios genômicos, e, ainda, se os genes são os mesmos da cascata inicial.

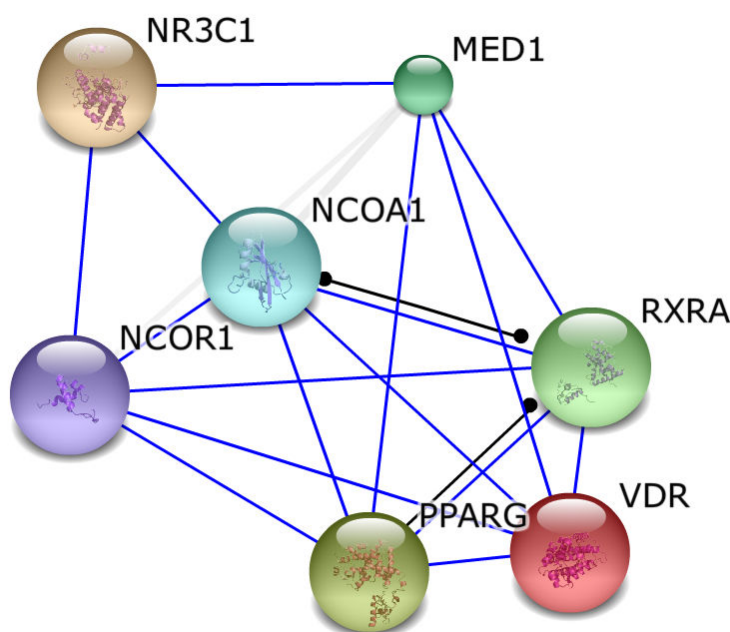
O gene *GR* (ou *NR3C1*) e seus ligantes do cortisol estão presentes como fatores centrais na regulação e controle dos eventos da adipogênese em humanos. Lahnalampi et al. (2010), em estudos com células SGBS, apresentaram resultados de *fold change* negativos para o gene *GR* em toda a fase de diferenciação celular. Os nossos resultados mostraram que, com a presença de vitamina D_3 , a expressão relativa do gene *GR* foi positiva em comparação com o constitutivo, e foi diferente estatisticamente quando comparado com o pré-adipócito (Figura 2).

Já Nimitiphong et al. (2012), após cultivo de adipócitos SGBS e tratamento com $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, observaram uma expressão positiva do gene *PPAR γ* nas células tratadas no tempo inicial de maturação celular. Lahnalampi et al. (2010) cultivaram a linhagem celular SGBS, porém sem associação a um tratamento, e observaram uma expressão positiva para o gene *PPAR γ* nas células não diferenciadas (pré-adipócitos) e uma expressão negativa nos adipócitos maduros. Os resultados do presente estudo corroboram com ambos os estudos citados acima, no que tange à expressão do gene *PPAR γ* nos adipócitos em fase inicial de maturação celular. No entanto, com o tratamento da vitamina D_3 , os adipócitos maduros (4 dias, 8 dias e 12 dias) apresentaram uma expressão relativa positiva do gene *PPAR γ* , quando comparada com o tempo inicial de maturação, representado no estudo pelos tempos 4 horas, 12 horas e 24 horas. Observa-se que não houve diferença estatisticamente significativa no padrão de expressão do *PPAR γ* entre a fase inicial e tardia de maturação. Estudos realizados em células mesenquimais humanas, submetidas a diferenciação celular para adipócito,

mostrou expressão positiva do *PPAR γ* em todos os tempos de maturação celular (ULLAH et al., 2013), o que está de acordo com os resultados encontrados no presente estudo.

As respostas dos genes são reconhecidas pelos efeitos em cascata que os mesmos promovem. A Figura 5 refere-se às interações proteína-proteína, organizadas com a utilização do banco de dados STRING (Versão 9.1). Este banco de dados possibilita a construção de uma rede de proteínas codificadas por um genoma específico. Neste caso, foram utilizados os genes de *Homo sapiens* com modificações no padrão transcricional estudados no presente trabalho. O banco de dados STRING considera apenas uma única isoforma do gene em questão e apresenta um *score* de interação derivado de análises estatísticas de co-ocorrência, da interação proposta ao banco de dados (*VDR-PPAR γ -GR*), baseado em artigos científicos e em outros bancos de dados. O valor máximo do *score* é 1 (um), sendo que acima de 0,7 o *score* é de alta confiança (JENSEN et al., 2009; FRANCESCHINI et al., 2013).

Figura 5 – Rede de interação entre *VDR*, *PPAR γ* , *GR* e outros genes.



Rede de interação entre as proteínas dos genes estudados, realizado através do banco de dados STRING. *PPARG*, receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama; *VDR*, gene receptor de vitamina D; *RXR*, receptor X de retinóide; *NCOR1*, receptor nuclear co-receptor; *NCOA1* receptor nuclear co-ativador 1; *NR3C1* (*GR*) receptor de glucocorticóide; *MED1*, complexo mediador de subunidade 1. A linha azul representa a ligação entre os genes e a linha preta uma reação entre os genes. Fonte: STRING.

Um estudo recente, realizado com células mesenquimais humanas, isoladas da crista ilíaca e submetidas a avaliações de micro arranjo e PCR em tempo real, demonstra essa interação entre os genes, separando-os por vias moleculares de atuação como metabolismo do ácido graxo, sinalização celular, biossíntese de ácidos graxos não saturados, diabetes tipo 2, entre outros (GEELLEN et al., 2013). Estas inter correlações dos genes são responsáveis pelas múltiplas respostas biológicas que um único substrato pode causar na fisiologia dos tecidos humanos. Como o caso da ligação do *VDR* com o seu heterodímero *RXR*, e conseguinte ligação com o gene *PPAR γ* , é bem descrita na literatura e apresentada no nosso trabalho (WHITFIELD et al., 2005; DHAWAN & CHRISTAKOS, 2010; HAUSSLER et al., 2011)

Através da rede representada pela Figura 5 percebe-se a interação entre os genes de interesse estudados por meio de outros receptores nucleares, configuração essa, de alta confiança, uma vez que o *score* gerado pelo banco de dados foi de 0,999. A regulação transcricional por receptores nucleares é mediada pelo recrutamento dos genes co-ativadores (*NCOA1*) e co-repressores (*NCOR1*) os quais são ativados pelo hormônio da tireóide T_3 . Este hormônio faz parte do meio de cultura para diferenciação celular da linhagem SGBS, e, em humanos, regula a termogênese e mantém a homeostase dos lipídios (ZHU et al., 2013). Estes genes e receptores do glucocorticóide e hormônios tireoideanos são modulados pelas transcrições dos elementos responsáveis ao receptor de vitamina D (*score* de ligação entre VDRE e *GR* de 0,997) e, portanto, se relacionam com a teia de ativação molecular da $1,25(OH)_2D_3$ (SANCHEZ-MARTINEZ et al., 2008; MARSHALL et al., 2012). A expressão relativa positiva do gene *GR* durante toda a fase de diferenciação celular e suas diferenças estatísticas entre os tempos finais de análise com os pré-adipócitos, (Figura 2) podem representar a interação que os genes receptores de glucocorticóides possuem na diferenciação e maturação dos adipócitos.

A total interação dos receptores nucleares co-repressores e co-ativadores ainda precisa ser melhor esclarecida. Estudos apontam que há uma interação entre a expressão destes receptores com o receptor de vitamina D (*VDR*) na intenção de regular os genes alvos que medeiam as vias de proliferação celular (BATTAGLIA et al., 2010). Na diferenciação das células adiposas de ratos, estes co-repressores regulam a ação do *PPAR γ* (YU et al., 2005) e dos domínios de interação distintos do reconhecimento dos receptores nucleares (SUTANTO et al., 2007). Como exemplo, em células epiteliais de próstata não malignas (RWPE-1), cultivadas *in vitro* e tratadas com vitamina D_3 , a expressão aumentada do *NCOR1* restringiu a

sinalização do *PPAR γ* , diminuindo a sensibilidade do *VDR* e seu heterodímero *RXR* (BATTAGLIA et al., 2010).

Os genes *VDR* e *PPAR γ* possuem forte interação entre si (*score* 0,900), assim como o heterodímero *VDR-RXR* e *PPAR γ* (*score* 0.999). Assim sendo, as mudanças de expressão dos genes em fases distintas de proliferação celular levam a modificações em toda essa via de interação. Uma diferença na expressão do *VDR* no oitavo dia de cultura celular, como a obtida no nosso estudo (Figura 4), pode interferir na expressão e transcrição dos receptores nucleares citados, assim como a diferença da expressão relativa do gene *PPAR γ* (Figura 3).

7 Conclusão

A $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ possui um papel importante na via molecular da adipogênese, atuando sobre genes que modulam a diferenciação. O estudo da variação na expressão gênica, em diferentes tempos, em cultura celular, demonstra a ação desta vitamina durante a maturação da célula, até sua fase final, onde possui respostas fisiológicas de um adipócito maduro.

A ação dos genes *VDR* e *PPAR γ* nas vias de proliferação celular, resposta de sinalização intracelular e outros processos de regulação, intensifica a constatação de que a vitamina D_3 modifica a expressão dos genes das células alvos de estudo, como os adipócitos, seja na fase inicial ou final de maturação celular. A cascata iniciada por estes genes é altamente interligada, tendo influência sobre genes de diferenciação celular, síntese de lipídios, gasto energético e regularização da insulina. A intervenção da vitamina D_3 na expressão gênica em células SGBS na fase tardia de maturação celular, via retorno da expressão do gene *VDR* a níveis basais no oitavo dia de maturação celular, poderá desencadear estas e outras vias, que com estudos mais abrangentes de arranjos gênicos poderão ser esclarecidos.

As variações da expressão relativa do gene *GR* durante o período de diferenciação das células SGBS encontrados em nosso estudo, podem representar a interação que os genes receptores de glucocorticóides possuem na diferenciação e maturação dos adipócitos, uma vez que os fatores de transcrição modulados pela vitamina D_3 atuam, também, nestes receptores nucleares (SANCHEZ-MARTINEZ et al., 2008; MARSHALL et al., 2012). A interação dos genes de interesse desse estudo representam uma fração da grande e complexa rede molecular envolvida na adipogênese. Alteração nos valores de expressão dos genes *VDR*, *GR* e *PPAR γ* podem interferir na via da adipogênese por vários meios, já que micro e macronutrientes atuam diretamente na expressão de genes, modulando suas respostas (RONTELTAP et al., 2013). A vitamina D_3 , portanto, participa na rede da adipogênese por meio da modificação da expressão de genes, como demonstrado pelos resultados encontrados neste estudo.

Pesquisas com adipócitos humanos do tipo SGBS vem se tornando mais frequentes nos últimos anos. Na base de dados e periódicos do NCBI (National Center for

Biotechnology Information) estão disponíveis cerca de 156 artigos publicados que trabalharam com esta linhagem celular.

De acordo com os resultados encontrados no presente estudo a vitamina D₃ possui influência sobre a expressão dos genes alvos estudados, durante todo o processo de diferenciação celular. No entanto, mais estudos, incluindo micro arranjos, são necessários para abranger o entendimento destes resultados e, assim elucidar, a influência do gene *VDR* e seu hormônio promotor na adipogênese.

REFERÊNCIA

- ABBOUD M.; GORDON-THOMSON, C.; HOY, A.J.; BALABAN, S.; RYBCHYN, M.S.; COLE, L.; SU, Y.; BRENNAN-SPERANZA, T.C; FRASE, D.R.; MASON, R.S.Uptake of 25-hydroxyvitamin D by muscle and fat cells. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol**, 2013.
- AHMAD, P.M; RUSSELL, T.R; AHMAD, F. Increase in fatty acid synthetase content of 3T3-L cells undergoing spontaneous and chemically induced differentiation to adipocytes. **Biochem. J.**, v.182, n.2 , p. 509-514, 1979.
- ALLOT, E.H.; OLIVER, E.; LYSAGHT, J.; GRAY, S.G.; REYNOLDS, J.V.; ROCHE, H.M.; PIDGEAN, G.P. The SGBS cell strain as a model for the in vitro study of obesity and cancer. **Clin. Transl. Oncol**, v. 14, p. 774–782, 2012.
- ARUNABH, S.; POLLACK, S.; YEH, J.; ALOIA, J.F.; Body fat content and 25-hydroxivitamin D levels in healthy women. **J Clin. Endocrinol. Metab**, v. 88, n.1, p.157-161, 2003.
- BARCHETTA, I.; BERNARDINIS, M.; CAPOCCIA D.; BARONI, M.G.; FONTANA, M.; FRAIOLI, A.; MORINI, S.; LEONETTI, F.; CAVALLO, M.G. Hypovitaminosis D is independently associated with metabolic syndrome in obese patients. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. e686-689, 2013.
- BATTAGLIA, S.; MAGUIRE, O.; THORNE, J.L.; HORNUNG, L.B.; DOIG, C.L; LIU, S.; SUCHESTON, L.E; BIANCHI, A.; KHANIM, F.L.; GOMMERSALL, L.M.; COULTER, H.S.O.; RAKHA, S.; GIDDINGS, I.; O'NEILL, L.P.; COOPER, C.; MCCABE, C.J.; BUNCE, C.M.; CAMPBELL1, M.J. Elevated NCOR1 disrupts PPAR α/γ signaling in prostate cancer and forms a targetable epigenetic lesion. **Carcinogenesis**. v. 31, n.9, p:1650–1660, 2010.
- BAYS H.E.; GONZÁLEZ-CAMPOY J.M.; BRAY G.A.; KITABCHI A.E.; BERGMAN D.A.; SCHORR, A.B.; RODBARD H.W.; HENRY, R.R. Pathogenic potential of adipose tissue and metabolic consequences of adipocyte hypertrophy and increased visceral adiposity. **Expert Rev. Cardiovasc. Ther.**, v. 6, n. 3, p. 343-368,2008.
- BELLIA, A.; GARCOVICH, C.; D'ADAMO, M.; LOMBARDO, M.; TESAURO, M.; DONADEL, G.; GENTILESCHI, P.; LAURO, D.; FEDERICI, M.; LAURO, R.;

SBRACCIA, P. Serum 25-hydroxyvitamin D levels are inversely associated with systemic inflammation in severe obese subjects. **Intern. Emerg. Med.**, v. 8, n. 1, p. 33-40, 2011.

BINH, T.Q.; NAKAHORI, Y.; HIEN, V.T.; KHAN, N.C.; LAM, N.T.; MAI, L.B.; YAMAMOTO, S. Correlations between genetic variance and adiposity measures, and gene x gene interactions for obesity in postmenopausal Vietnamese women. **J Genet.** v. 90, n. 1, p. 1-9, 2011.

BLUM, M.; DOLNIKOWSKI, G.; SEYOUM, E.; HARRIS, S.S.; BOOTH, S.L.; PETERSON, J.; SALTZMAN, E.; DAWSON-HUGHES, B. Vitamin D₃ in fat tissue. **J Am Coll. Nutr.**, v. 28, n. 3, p. 252-256, 2009.

BLUMBERG, J.M.; TZAMELI, I.; ASTAPOVA, I.; LAM, F.S.; FLIER, J.S.; HOLLENBERG, A.N. Complex role of the vitamin D receptor and its ligand in adipogenesis in 3T3-L1 cells. **J Biol. Chem.**, v. 281, n. 16, p. 11205-11213, 2006.

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). **Pesquisa de Orçamento Familiar (POF- 2008/2009) - Antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil**. Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <http://ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_encaa/pof_20082009_encaa.pdf>. Acesso em: 12 mai 2011.

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). **Pesquisa de Orçamento Familiar (POF- 2008/2009) - Análise do Consumo Alimentar Pessoal no Brasil**. Rio de Janeiro. Disponível em: <www.ibge.gov.br>. Acesso em: 13 ago 2011.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. **Portaria Nº209de 23 de abril de 2010**. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas - raquitismo e osteomalácia. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2010/prt0209_23_04_2010.html>. Acesso em: 20 out 2013.

CARLBERG, C.; CAMPBELL, M.J. Vitamin D receptor signaling mechanisms: Integrated actions of a well-defined transcription factor. **Steroids**, v. 78, n. 2, p. 127-136, 2013.

CARLBERG, C.; SEUTER, S.; DE MELLO, V.D.F.; SCHWAB, U.; VOUTILAINEN, S.; PULKKI, K.; NURMI, T.; VIRTANEN, J.; TUOMAINEN, T.P.; UUSITUPA, M. Primary

Vitamin D Target Genes Allow a Categorization of Possible Benefits of Vitamin D₃ Supplementation. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, 2013.

CHENG, S.; MASSARO, J.; FOX, C.; LARSON, M.G.; KEYES, M.J.; MCCABE, E.L.; ROBINS, S.J.; O'DONNELL, C.J.; HOFFMANN, U.; JACQUES, P.F.; BOOTH, S.L.; VASAN, R.S.; WOLF, M.; WANG, T.J. Adiposity, Cardiometabolic Risk, and Vitamin D Status: The Framingham Heart Study. **Diabetes**, v. 59, n. 1, p. 242-248, 2010.

DHAWAN, P.; CHRISTAKOS, S. Novel Regulation of 25-HydroxyvitaminD₃ 24-Hydroxylase (24(OH)ase) Transcription by Glucocorticoids: Cooperative Effects of the Glucocorticoid Receptor, C/EBPbeta, and the Vitamin D Receptor in 24(OH)ase Transcription. **J. Cell. Biochem.**, v. 110, p. 1314-1323, 2010.

DING, G.; PARAMESWARAN, V.; BLIZZARD, L.; BURGESS, J.; JONES, G. Not a simple fat-soluble vitamin: changes in serum 25-(OH)D levels are predicted by adiposity and adipocytokines in older adults. **J Intern. Med.**, v. 268, n. 5, p. 501-510, 2010.

FARMER, A.; Metabolic syndrome and mortality. **Brit. Med. Journal**, v. 332, n. 7546, p. 882, 2006.

FISCHER-POSOVSZKY, P.; NEWELL, F.S.; WABITSCH, M.; TORNQVIST, H.E. Human SGBS Cells – a Unique Tool for Studies of Human Fat Cell Biology. **Obesity Facts**, v. 1, p. 184–189, 2008

GEIGER, K.; LEIHERER, A.; MUENDLEIN, A.; STARK, N.; GELLER-RHOMBERG, S.; SAELY, C.H.; WABITSCH, M.; FRAUNBERGER, P.; DREXEL, H. Identification of hypoxia-induced genes in human SGBS adipocytes by microarray analysis. **PLoS One**, v.10, n.6, 2011.

GRUBBS, F. Procedures for Detecting Outlying Observations in Samples. **Technometrics**, v. 11, n.1, pp. 1-21, 1969.

GU, J.M.; XIAO, W.J.; HE, J.W.; ZHANG, H.; HU, W.W.; HU, Y.Q.; LI, M.; LIU, Y.J.; FU, Y.J.; FU, W.Z.; YU, J.B.; GAO, G.; YUE, H.; KE, Y.H.; ZHANG, Z.L. Association between VDR and ESR1 gene polymorphisms with bone and obesity phenotypes in Chinese male nuclear families. **Acta Pharmacol Sin.**, v. 30, n. 12, p. 1634-1642, 2009.

HAUSSLER, M.R.; JURUTKA, P.W.; MIZWICKI, M.; NORMAN, A.W. Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of $1\alpha,25(\text{OH})_2$ vitamin D₃: Genomic and non-genomic mechanisms. **Best Prac. & Res. Clin. Endo. & Metabo.**, v. 25, n. 4, p. 543-559, 2011.

HOLICK, M.F. Vitamin D: extraskeletal health. **Endocrinol. Metab. Clin. North Am.**, v. 39, n. 2, p. 381-400, 2010.

HOLICK, M.F. Vitamin D deficiency. **N. Engl. J. Med.**, v. 357, p. 266–281, 2007.

KEUPER, M.; DZYAKANCHUK A.; AMREIN K. E.; WABITSCH M., FISCHER-POSOVSKY P. THP-1 macrophages and SGBS adipocytes – a new human in vitro model system of inflamed adipose tissue. **Frontiers End.** V.2, n. 89, p. 1-8, 2011.

KONG, J.; LI, Y.C. Molecular mechanism of $1,25$ dihydroxyvitamin D₃ inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 cells. **Am J Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 290, n. 5, p. E916-E924, 2006.

LAGUNOVA, Z.; POROJNICU, A.C.; VIETH, R.; LINDBERG, F.A.; HEXEBERG, S. Serum 25 -hydroxyvitamin D is a predictor of serum $1,25$ -dihydroxyvitamin D in overweight and obese patients. **J. Nutr.**, v. 141, n. 1, p. 112-117, 2011.

LAHNALAMPI, M.; HEINANIEMI, M.; SINKKONEN, L.; WABITSCH, M.; CARLBERG, C. Time-Resolved Expression Profiling of the Nuclear Receptor Superfamily in Human Adipogenesis. **Plos One**, v. 5, n. 9, 2010.

LEHRKE, M.; LAZAR, M.A. The many faces of PPAR γ . **Cell**, v. 123, n. 6, p. 993-999. 2005.

LUONG, K.; NGUYEN, L. The beneficial role of vitamin D in obesity: possible genetic and cell signaling mechanisms. **Nut. J.**, v. 12, p. 89, 2013.

MARSHALL, P.A.; HERNANDEZ, Z.; KANEKO, I.; WIDENER, T.; TABACARU, C.; AGUAYO, I.; JURUTKA, P.W. Discovery of novel vitamin D receptor interacting proteins that modulate $1,25$ -dihydroxyvitamin D₃ signaling. **J Steroid Biochem. Mol. Biol.**, v.132, n. (1-2), p:147–159, 2012.

MERING, C.; JENSEN, L.; SNEL, B.; HOOPER, S.D.; KRUPP, M.; FOGLIERINI, M.; JOUFFRE, N.; HUYNEN, M.A.; BORK, P. STRING: known and predicted protein–protein

associations, integrated and transferred across organisms. **Nucleic Acids Research**, vol. 33, 2005.

NAZARIAN, S.; PETER, J.V.; BOSTON, R.C.; JONES, S.A.; MARIASH, C.N. Vitamin D3 supplementation improves insulin sensitivity in subjects with impaired fasting glucose. **Transl. Res.**, v. 158, n. 5, p. 276-281. 2011.

NIELSEN, R.; PEDERSEN, T.A.; HAGENBEEK, D.; MOULOS, P.; SIERSBAEK, R.; MEGENS, E. Genome-wide profiling of PPAR γ :RXR and RNA polymerase II occupancy reveals temporal activation of distinct metabolic pathways and changes in RXR dimer composition during adipogenesis. **Genes Dev.**, v. 22, p. 2953-67, 2008.

NIMITPHONG, H.; HOLICK, M.F.; FRIED, S.K.; LEE, M. 25-Hydroxyvitamin D3 and 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Promote the Differentiation of Human Subcutaneous Preadipocytes. **Plos One**, v. 7, p. e52171, 2012.

NTAMBI, J.M.; KIM, Y.C. Adipocyte differentiation and gene expression. **J Nutr.**, v. 130, n.12, p. 3122S-3126S, 2000.

OCHS-BALCOM, H.M.; CHENNAMANENI, R.; MILLEN, A.E.; SHIELDS, P.G.; MARIAN, C.; TREVISAN, M.; FREUDENHEIM, L. Vitamin D receptor gene polymorphisms are associated with adiposity phenotypes. **Am J Clin. Nutr.**, v. 93, n. 1, p. 5-10, 2011.

OLIVEIRA, R.M.S.; NOVAES, J.F.; AZEREDO, L.M.; CÂNDIDO, A.P.C.; LEITE, I.C.G. Association of vitamin D insufficiency with adiposity and metabolic disorders in Brazilian adolescents. **Pub. Health Nutr**, p. 1-8, 2013.

OU, H.Y.; KARNCHANASORN, R.; LEE, L.Z.; CHIU, K.C. Interaction of BMI with vitamin D and insulin sensitivity. **Eur J Clin Invest.**, v. 41, n.11, 2011.

PALOU, A.; PICÓ, C.; BONET, L.M. Nutritional potential of metabolic remodelling of white adipose tissue. **Cur. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care**, v. 16, n. 6, p. 650–656, 2013.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, 2002.

PHILLIPS, C.M. Nutrigenetics and Metabolic Disease: Current Status and Implications for Personalised Nutrition. **Nutrients**, v. 5, n. 1, p. 32-57, 2013.

PICCOLO, B.D.; DOLNIKOWSKI, G.; SEYOUM, E.; THOMAS, A.P.; GERTZ, E.R.; SOUZA, E.C.; WOODHOUSE, L.R.; NEWMAN, J.W.; KEIM, N.L.; ADAMS, S.H.; VAN LOAN, M.D. Association between subcutaneous white adipose tissue and serum 25-hydroxyvitamin D in over weight and obese adults. **Nutrients**, v. 26; n. 9, p. 3352-66, 2013.

RONTELTAP A., TRIJP, H.; BEREZOWSKA, A.; GOOSENS, J. Nutrigenomics-based personalized nutritional advice: in search of a business model?. **Genes Nutr.** v. 8, p:153-163, 2013.

ROSEN, E.D., MACDOUGALD, O.A. Adipocyte differentiation from the inside out. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** v. 7, p. 885–896, 2006.

ROSEN, E.D.; HSU, C.H.; WANG, X.; SAKAI, S.; FREEMAN, M.W.; GONZALEZ, F.J.; SPIEGELMAN, B.M.C/EBP α induces adipogenesis through PPAR γ : a unified pathway. **Genes Dev.**, v. 16, n. 1, p. 22-26, 2002.

RYU, O.H.; LEE, S.; YU, J.; CHOI, M.G.; YOO, H.J.; MANTERO, F. Aprospective randomized controlled trial of the effects of vitamin D supplementation on long-term glycemic control in type 2 diabetes mellitus of Korea. **End. Journal.** 2013.

SÁNCHEZ-MARTÍNEZ, R.; ZAMBRANO, A.; CASTILLO, A.I.; ARANDA, A. Vitamin D-Dependent Recruitment of Corepressors to Vitamin D/Retinoid X Receptor Heterodimers. **Mol. Cell Biol.** V. 28, n.11, p:3817–3829, 2008.

SHI, H.; NORMAN, A.W.; OKAMURA, W.H.; SEN, A.; ZEMEL, M.B. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits uncoupling protein 2 expression in human adipocytes. **FASEB J.**, v. 16, n. 13, p. 1808-1810, 2002.

SILVERMAN, M.N.; STERNBERG, E.M. Glucocorticoid regulation of inflammation and its functional correlates: from HPA axis to glucocorticoid receptor dysfunction. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1261, p. 55-63, 2012.

STRING: functional protein association network. Disponível em: www.string-db.org Acesso em: 10 de janeiro de 2014.

SUTANTO, M.M; et al. SMRT recruitment by PPARgamma is mediated by specific residues located in its carboxy-terminal interacting domain. **Mol. Cell. Endocrinol.** v. 267, p:138–143. 2007

TRAYHURN, P.; O'HARA, A.; BING, C. Interrogation of microarray datasets indicates that macrophage-secreted factors stimulate the expression of genes associated with vitamin D metabolism (VDR and CYP27B1) in human adipocytes. **Adipobiology**, v. 3, p. 31-36, 2011.

WABITCH, M.; BRENNER, R.E.; MELZNER, I.; BRAUN, M.; MOÈLLER, P.; HEINZE, E.; DEBATINK, M.; HAUNER, H. Characterization of a human preadipocyte cell strain with high capacity for adipose differentiation. **Int. J. of Obesity**, v. 25, p. 8-15, 2001.

WANG, J.; GRAY, N.; KUO, T.; HARRIS, C. Regulation of triglyceride metabolism by glucocorticoid receptor. **Cell & Bioscience**, v.2, n.19, 2012.

WHITFIELD, G.K.; JURUTKA, P.W.; HAUSSLER, C.A.; HSIEH, J.; BARTHEL, T.K.; JACOBS,E.; DOMINGUEZ, C.; THATCHER, I.; HAUSSLER, M.**Vitamin D: Physiology, Molecular Biology and Clinical Applications.** Nuclear Vitamin D Receptor: Structure-Function - Molecular Control of Gene Transcription, and Novel Bioactions. 2.ed. Londres: Springer Science, 2010.

WOOD, R.J. Vitamin D and adipogenesis: new molecular insights. **Rev Nutr.**, v. 66, n. 1, p. 40-46, 2008.

WORTSMAN, J.; MATSUOKA, L.Y.; CHEN, TC; LU, Z; HOLICK, M.F. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 72, n. 3, p. 690-693, 2000.

YANG, L.; MA, J.; ZHANG, X.; WANG, L. Glucocorticoid regulation of inflammation and its behavioral and metabolic correlates: from HPA axis to glucocorticoid receptor dysfunction. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 1261, p. 55-63, 2012.

YU, C.; et al. The nuclear receptor corepressors NCoR and SMRT decrease peroxisome proliferator-activated receptor gamma transcriptional activity and repress 3T3-L1 adipogenesis. **J. Biol. Chem.** v.280, p:13600–13605, 2005.

YU, C.; MAYBA, O.; LEE, J.V.; TRAN, J.; HARRIS, C.; SPEED, T. P.; WANG, J. Genome-wide analysis of glucocorticoid receptor binding regions in adipocytes reveal gene network involved in triglyceride homeostasis. **PLoS One**. V. 5, n. 12, 2010.

ZAGOTTA I.; DIMOVA E.; FUNCKE J.; WABITSCH M.; KIETZMANN T.; FISCHER-POSOVSZKY P. Resveratrol suppresses PAI-1 gene expression in human *in vitro* model of inflamed adipose tissue. **OxidMedCellLongev**. 2013.

ZHOU, Q.G.; HOU, F.F; GUO, Z.J.; LIANG, M.; WANG, G.B.; ZHANG, X. 1,25-Dihydroxyvitamin D improved the free fatty-acid-induced insulin resistance in cultured C2C12 cells. **Diabetes Metab Res Rev.**, v. 24, n. 6, p. 459-464, 2008.

ZHU, X.; KIM, D.W; GOODSON, M.; PRIVALSKY, M.; CHENG, S. NCoR1 regulates thyroid hormone receptor isoform-dependent adipogenesis. **J Mol Endocrinol**, v.46, n.3, p:233–244, 2011.