



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Priscila Portugal dos Santos

**Influência da Suplementação da Ração com diferentes Doses de
Vitamina D sobre a Proteína de Interação com a Tiorredoxina
(TXNIP) no Coração e suas Vias de Sinalização**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de Doutora em
Fisiopatologia em Clínica Médica.

Orientador: Prof. Titular Sergio Alberto Rupp de Paiva

Coorientador: Prof. Adjunto Leonardo Antonio Mamede Zornoff

**Botucatu
2015**

Priscila Portugal dos Santos

Influência da Suplementação da Ração com diferentes
Doses de Vitamina D sobre a Proteína de Interação
com a Tiorredoxina (TXNIP) no Coração e suas Vias de
Sinalização

Tese apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de Doutora em
Fisiopatologia em Clínica Médica.

Orientador: Prof. Titular Sergio Alberto Rupp de Paiva
Coorientador: Prof. Adjunto Leonardo Antonio Mamede Zornoff

Botucatu
2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Santos, Priscila Portugal dos.

Influência da suplementação da ração com diferentes doses de vitamina D sobre a proteína de interação com a Tiorredoxina (TXNIP) no coração e suas vias de sinalização / Priscila Portugal dos Santos. - Botucatu, 2015

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Sergio Alberto Rupp de Paiva
Coorientador: Leonardo Antonio Mamede Zornoff
Capes: 40101002

1. Suplementos dietéticos. 2. Tiorredoxinas. 3. Stress oxidativo. 4. Vitamina D. 5. Remodelação ventricular. 6. Rato como animal de laboratório.

Palavras-chave: Estresse oxidativo; Proteína de Interação com a Tiorredoxina; Rato; Remodelação cardíaca; Vitamina D.

Dedicatória

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida,

Aos meus pais Cássia e Osvaldo

Por toda minha formação. Obrigada por terem me incentivado seguir este caminho e nunca desistir.

Amor eterno!

Aos meus irmãos Lucas e Carolina

Por toda amizade carinho e apoio!

Ao Ricardo

Que faz com que meus dias sejam como sempre sonhei e a quem agradeço todo carinho e incentivo!

Ao meu filho

Tão amado e ansiosamente aguardado!

Agradecimentos Especiais

A **Deus**, por minha vida, pela saúde, oportunidades e pelo convívio com pessoas sensacionais!

Ao meu orientador **Dr. Sergio Alberto Rupp de Paiva**, pela oportunidade, pelo conhecimento e pelos preciosos ensinamentos, incentivo, carinho e por nunca deixar de acreditar que tudo iria dar certo.

Ao meu co-orientador **Dr. Leonardo Antônio Mamede Zornoff** e aos professores do grupo de pesquisa **Paula, Marcos, Bertha e Meliza** pela disponibilidade, ensinamentos e pelas oportunidades que sempre me deram.

À professora **Dra. Ana Angélica** por todo conhecimento, paciência e exemplo profissional.

Às amigas de jornada **Andréa, Bruna e Vanessa**, que compartilharam das mesmas dificuldades e expectativas.

Ao administrador do laboratório experimental **José Carlos Georgete**, e aos técnicos **Mário, De Lalla, e José Aparecido**, por toda ajuda e colaboração neste trabalho.

À **Jacira, Rafael, Juninho e Felipe** por terem me acolhido como parte da família.

Agradecimientos

Aos amigos do laboratório *Adriana, Aline, Amanda, Ana Carolina, Camila Bonomo, Bruna, Camila Rosa, Danielle, Diego, Dijon, Fernanda, Loreta, Luana, Maria Tereza, Mariana, Miriane, Pamela, Paula, Paulinha e Regiane, Renan, Renata* por todos os momentos juntos.

À professora *Dra. Rita de Cassia Tostes* e aos alunos *Thiago, Marcondes e Stéfany* pela oportunidade de trabalharmos juntos e por toda colaboração.

Ao *Dr. Rodrigo Gibin* por toda disponibilidade e contribuição.

À todos os funcionários do Laboratório Experimental: *Ángelo, Bardela, Camila, Cris, Danilinho, Diego, Eduardo, Elenize, Elisete, Fátima, Florian, Igor, Lucas, Márcia, Marta, Mara, Paula, Regina, Renata, Rogério, Sueli e Vitor* por toda ajuda e amizade.

A todos os funcionários do Departamento de Clínica Médica: *Alexandre Luís Loureiro, Ana Maria Mengue, Bruno José Fajiolli, Elisangela Aparecida da Silva, Laura Andrade Câmara, Mario Augusto Dallaqua e Renato Borges Pereira*, pela atenção e disponibilidade em todo auxílio requisitado.

A todos os funcionários da Secretaria de Pós-Graduação: *Andréa Paula Longo Devidé, Janete Aparecida Herculano Nunes Silva, Lílían Cristina Nadal Bianchi Nunes, Nathanael Pinheiro Salles e Regina Célia Spadin* pela atenção e por todo auxílio.

Aos Professores: *Dr. Katashi Okoshi, Dra. Marina Politi Okoshi, Dr. Luiz Shiguero, Dra. Beatriz Bojikian Matsubara, Dr. Luis Cuadrado Martin e Dr. Antônio Carlos Cicogna* pela colaboração profissional.

Ao *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* pelo suporte financeiro, viabilizando o desenvolvimento deste trabalho.

A *todas as pessoas* que fizeram parte da minha vida, contribuindo para minha formação profissional e pessoal.

Muito Obrigada!

“ Triste não é mudar de ideia. Triste é não ter ideias para mudar”.

Francis Bacon

Resumo

Resumo

SANTOS, P. P. **Influência da Suplementação da Ração com diferentes Doses de Vitamina D sobre a Proteína de Interação com a Tiorredoxina (TXNIP) no Coração e suas Vias de Sinalização.** 2015. 108 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2015.

A deficiência de vitamina D (VitD) tem aumentado nos últimos anos, tornando-se um problema de saúde pública. Adicionalmente, a deficiência de VitD está associada com o aumento do risco de desenvolvimento de várias doenças crônicas, inclusive cardiovasculares. Esses fatores têm incentivado o uso indiscriminado dessa vitamina, sem conhecer ao certo as alterações decorrentes da suplementação de diferentes doses. Estudos têm mostrado que a VitD é importante para o desenvolvimento e funcionamento cardíaco, entretanto pode ter efeito cardiovascular prejudicial, mesmo em doses consideradas não tóxicas. A VitD atua nas células alvo ligando-se ao receptor de VitD (VDR). Adicionalmente, foi identificada a Proteína de Interação com a Tiorredoxina (TXNIP) cuja expressão é regulada positivamente pela VitD. Esta proteína participa da regulação de várias vias de sinalização celular (balanço redox, apoptose, inflamação, crescimento celular, metabolismo energético) que podem ser importantes para o processo de remodelação cardíaca. O objetivo deste estudo foi avaliar se suplementação em excesso, mas em doses não tóxicas, de VitD na ração por 2 meses resulta em alteração da expressão protéica TXNIP, remodelação cardíaca com aparecimento de estresse oxidativo, apoptose e alterações de mediadores inflamatórios e metabolismo energético, e se com o aumento do tempo de suplementação de VitD (por 4 meses) ocorre alterações na morfologia e função do coração. Para isso, foram realizados o Experimento 1: utilizados 64 ratos machos, alocados em 3 grupos - Controle (C, n=21) recebeu ração padrão; VD3 (n=22) e VD10 (n=21) receberam 3.000 e 10.000 UI de colecalciferol/kg de ração respectivamente, por 2 meses; e o Experimento 2: utilizados 46 ratos machos, alocados em 3 grupos: Controle (C-4, n=14) recebeu ração padrão; VD3-4 (n=16) e VD10-4 (n=14) receberam 3.000 e 10.000 UI de colecalciferol/kg de ração respectivamente, por 4 meses. Após 2 e 4 meses foi realizado o estudo ecocardiográfico e posteriormente os animais foram eutanasiados. O soro e o ventrículo esquerdo dos animais de 2 meses foram utilizados para análises bioquímicas. Para análise estatística foi realizado ANOVA de 1 via e pós teste de Tukey ou Kruskal Wallis e pós teste de Dunn. Para avaliar a resposta dose dependente foi utilizado teste de tendência. Para o experimento 1 a expressão protéica da TXNIP foi maior no grupo VD10 comparado ao C e seu aumento foi dose dependente, por outro lado a atividade da tiorredoxina foi menor no grupo VD10 comparado ao C, sendo sua diminuição dose dependente. Os animais suplementados com colecalciferol apresentaram aumento do estresse oxidativo, caracterizado pela diminuição da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e da glutathione peroxidase e aumento do hidróperóxido de lipídios. As alterações observadas para os marcadores de estresse oxidativo foram dose dependente. No entanto, não houve alteração na expressão protéica do fator nuclear eritróide-2 nem das enzimas reguladas por ele, glutathione peroxidase-1 e heme oxigenase-1. Para os marcadores de apoptose, houve aumento da expressão protéica caspase-3-clivada no grupo VD10 comparado ao VD3 e diminuição da expressão protéica da Bcl-2 no grupo VD10 comparado ao C. A diminuição da Bcl-2 foi dose dependente. Os mediadores inflamatórios fator de necrose tumoral- α , interferon- γ , interleucina-10 e molécula de adesão intercelular-1 foram maiores no grupo VD10 comparado ao C. O aumento dos mediadores inflamatórios foi dose dependente. Com relação ao metabolismo energético cardíaco houve

diminuição da β -oxidação de ácidos graxos, do ciclo do citrato e da cadeia respiratória mitocondrial. Por outro lado, houve aumento da via glicolítica e do metabolismo anaeróbio. Apesar de todas essas alterações metabólicas e moleculares, não houve mudança na morfologia, nem disfunção cardíaca, avaliada pelo ecocardiograma, nos animais suplementados por 2 meses. Entretanto, com o aumento do tempo de suplementação (suplementação de colecalciferol por 4 meses), houve hipertrofia cardíaca com aumento da espessura da parede posterior e da espessura relativa da parede posterior, de maneira dose dependente, e disfunção diastólica caracterizada por aumento dose dependente do diâmetro e do volume do átrio esquerdo, além de alteração do tempo de desaceleração da onda E. Além das alterações do lado esquerdo do coração, os animais suplementados com colecalciferol, apresentaram hipertrofia e disfunção do ventrículo direito. Assim, podemos concluir que a suplementação de VitD leva à remodelação cardíaca com aparecimento de estresse oxidativo, diminuição de marcadores anti-apoptóticos, aumento de mediadores inflamatórios e alteração do metabolismo energético cardíaco e que, com o aumento do tempo de suplementação, ocorre hipertrofia cardíaca e disfunção diastólica. As mudanças observadas nas proteínas TXNIP e Trx podem ser o mecanismo envolvido nessas alterações.

Palavras-chave: vitamina D; proteína de interação com a tiorredoxina; remodelação cardíaca; estresse oxidativo; rato.

Abstract

Abstract

SANTOS, P. P. **Influence of Chow Supplementation with Different Vitamin D Doses on the Thioredoxin-interacting protein (TXNIP) in the heart and its signaling pathways.** 2015. 108 f. Thesis (Doctoral) – Faculty of Medicine of Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2015.

Vitamin D (VitD) deficiency has increased in recent years, becoming a public health problem. Additionally, VitD deficiency is associated with increased risk of chronic diseases developing, including cardiovascular diseases. These factors have encouraged the widespread use of this vitamin, without knowing well the alterations of different supplementation doses. Studies have shown that VitD is important for the cardiac development and function, however this vitamin can present adverse cardiovascular effects, even at non-toxic doses. VitD acts in the target cells by binding to VitD receptor (VDR). Additionally, the thioredoxin-interacting protein (TXNIP) was identified and its expression is up-regulated by VitD. This protein acts in the regulation of signaling pathways (redox balance, apoptosis, inflammation, cell growth, metabolism energy) which can participate of the cardiac remodeling process. The aim of this study was to evaluate whether excess VitD supplementation, but in nontoxic doses, in the chow for 2 months results in change of TXNIP expression, cardiac remodeling with oxidative stress, apoptosis and alterations of inflammatory mediators and energy metabolism and whether, the supplementation increased time (for 4 months) leads to changes in cardiac structure and function. Experiment 1: 64 male rats were used and were divided into 3 groups - control (C, n = 21) received standard chow; VD3 (n = 22) and VD10 (n = 21) received 3,000 and 10,000 IU of cholecalciferol / kg of chow respectively, for 2 months; and Experiment 2: 46 male rats were used and were divided into 3 groups - control (C-4, n = 14) received standard chow; VD3-4 (n = 16) and VD10-4 (n = 14) received 3,000 and 10,000 IU of cholecalciferol / kg of chow respectively, for 4 months. After 2 and 4 months echocardiography was performed and after the animals were euthanized. The serum and the left ventricle of experiment 1 animals were used for biochemical analyzes. Statistical analysis was performed by one way ANOVA and Tukey post test or Kruskal-Wallis and Dunn post test. The dose dependent response was analyzed by trend test. For experiment 1 TXNIP protein expression was higher in VD10 group compared to the C and this increase was dose-dependent, on the other hand, the thioredoxin activity was lower in VD10 group compared to C. The thioredoxin activity decreased in dose-dependent manner. The animals supplemented with cholecalciferol showed increase of oxidative stress, characterized by decreased antioxidant enzymes activity superoxide dismutase and glutathione peroxidase and increased lipid hydroperoxide. The changes observed for oxidative stress were dose-dependent. However, there was no change in the protein expression of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) and of enzymes glutathione peroxidase 1 and heme oxygenase 1. For the apoptosis, was observed increase in the protein expression of cleaved caspase-3 in VD10 group compared to the VD3 group and was observed decrease in the protein expression of Bcl-2 in VD10 group compared to C. The decrease of Bcl-2 was dose-dependent. The inflammatory mediator tumor necrosis factor- α , interferon- γ , interleukin-10 and intercellular adhesion molecule-1 were higher in the VD10 group compared to C. The increase in the inflammatory mediators was dose-dependent. In relation to cardiac energy metabolism there was decreased β -oxidation of fatty acids, citrate cycle and the mitochondrial respiratory chain. On the other hand, the glycolytic pathway and anaerobic metabolism was increased. Despite these metabolic and molecular

alterations, there was no change in the cardiac structure function, assessed by echocardiography, in the animals supplemented by two months. However, with supplementation increased time, (for 4 months), there was cardiac hypertrophy with dose-dependent increase in left ventricle wall thickness and relative wall thickness, and diastolic dysfunction characterized by increase of the diameter and volume of the left atrium, in dose-dependent manner, and E-wave deceleration time alteration. In addition to the changes in the left heart, animals supplemented with cholecalciferol, showed hypertrophy and dysfunction of the right ventricle. Thus, we concluded that Vit D supplementation leads to cardiac remodeling with oxidative stress, decreased anti-apoptotic factor, increased inflammatory mediators and cardiac energy metabolism alteration. The supplementation increased time resulted in cardiac hypertrophy and diastolic dysfunction. The changes observed in TXNIP and Trx proteins can be the mechanism involved in these changes.

Keywords: vitamin D; thioredoxin-interacting protein; cardiac remodeling; oxidative stress; rat.

Sumário

Sumário

1. INTRODUÇÃO	20
2. HIPÓTESE	24
3. OBJETIVOS	26
4. MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 Delineamento Experimental	28
4.2 Preparo das rações	28
4.3 Doses de vitamina D utilizadas	29
4.4 Avaliação ecocardiográfica	30
4.5 Coleta de material biológico	31
4.6 Determinação plasmática de 25 (OH) D ₃	31
4.7 Determinação sérica de Cálcio	32
4.8 Determinação dos mediadores inflamatórios	32
4.9 Determinação da atividade das enzimas do metabolismo energético e de marcadores do estresse oxidativo	33
4.10 Determinação da expressão protéica por Western Blot	35
4.11 Atividade de tiorredoxina e da tiorredoxina redutase	38
4.12 Análise estatística	39
5. RESULTADOS	41
5.1 Experimento 1	41
5.1.1 Peso corporal, consumo diário de ração e de vitamina D, cálcio sérico e 25 (OH) D ₃ plasmático	41
5.1.2 Expressão protéica da TXNIP e da Trx e atividade da Trx e da TrxR	45
5.1.3 Marcadores de estresse oxidativo	50
5.1.4 Marcadores de apoptose e mediadores inflamatórios	54
5.1.5 Metabolismo energético cardíaco	59
5.1.6 Variáveis ecocardiográficas de morfologia e função	65
5.1.7 Variáveis morfométricas	68
5.2 Experimento 2	70
5.2.1 Variáveis ecocardiográficas de morfologia e função do experimento 2	70
5.2.2 Variáveis morfométricas	79
6. DISCUSSÃO	84
7. CONCLUSÕES	94
8. REFERÊNCIAS	96

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A vitamina D (VitD) é um composto lipossolúvel cuja função clássica é atuar sobre os ossos, intestino e rins regulando a homeostasia dos íons cálcio e fósforo (2). No entanto, atualmente sabe-se que essa vitamina atua sobre vários outros órgãos e tipos celulares (3-7), inclusive sobre o coração. (8, 9).

A prevalência da deficiência de VitD tem aumentado nos últimos anos (1), tornando-se um problema de saúde pública. (10). É estimado que um bilhão de pessoas em todo mundo possuem insuficiência ou deficiência de VitD (1). A deficiência de VitD está associada com o aumento do risco de desenvolvimento de várias doenças crônicas, inclusive cardiovasculares (11-18). Estudos clínicos mostraram que a hipovitaminose D está associada com o aparecimento de hipertensão (17, 19), insuficiência cardíaca (20) e doença arterial periférica (16). Além disso, estudo experimental mostrou que a deficiência causa hipertrofia, fibrose, disfunção cardíaca e alterações no metabolismo energético cardíaco (14).

A alta frequência de hipovitaminose D na população e a associação de sua deficiência com o aparecimento de doenças crônicas têm incentivado pesquisadores a recomendar maior exposição solar, fortificação alimentar e suplementação medicamentosa de VitD, tanto para pessoas com maior risco como para população em geral (21-23). Entretanto, as alterações decorrentes da suplementação de diferentes doses de VitD ainda precisam ser melhor estudadas (24, 25), pois alguns trabalhos têm mostrado que esta vitamina pode ter efeito cardiovascular prejudicial, mesmo em doses consideradas não tóxicas (26-28). Estudos realizados com modelos de agressão como ratos urêmicos nefrectomizados e ratos infartados mostraram que a suplementação de VitD em doses não hipercalcêmicas levou ao desenvolvimento de hipertensão (28), alterações na aorta (28), hipertrofia ventricular esquerda (27, 28), disfunção cardíaca e alterações no metabolismo energético cardíaco (27). Além disso, estudo realizado em nosso laboratório com ratos saudáveis, sem nenhuma forma de agressão, mostrou que a suplementação de VitD em excesso, porém em doses consideradas não tóxicas para ratos, por dois meses, levou ao aumento da pressão arterial e a alterações na estrutura e função vascular, moduladas pela geração de espécies reativas e alteração na biodisponibilidade de óxido nítrico (26).

Portanto, podemos observar que a VitD desempenha importante papel no desenvolvimento e funcionamento cardíaco. Entretanto, ela parece exercer uma curva "dose-resposta" bifásica na fisiopatologia cardiovascular, ou seja, tanto a deficiência como o excesso de VitD podem levar a alterações cardiovasculares que determinariam a remodelação cardíaca (24).

A remodelação cardíaca é desencadeada por alguma agressão ao coração que leva a alterações celulares, intersticiais e moleculares que vão ocorrendo de maneira progressiva. Com o tempo, essas alterações podem modificar a forma, a geometria e a massa cardíaca. Inicialmente, essas alterações morfológicas são importantes para a manutenção da função cardíaca. No entanto, cronicamente pode causar disfunção diastólica e/ou sistólica (29, 30). Entre as alterações celulares e moleculares que podem ocorrer no processo de remodelação cardíaca estão o estresse oxidativo, a inflamação, a apoptose, e alterações no metabolismo energético cardíaco, as quais podem progredir com hipertrofia e disfunção ventricular (27, 31, 32).

A VitD existe em duas principais formas: a VitD₂ (ergocalciferol) e a VitD₃ (colecalfiferol) (33). Tanto a VitD₂ como a VitD₃ podem ser adquiridas a partir da dieta, porém são poucos os alimentos que contêm quantidades substanciais destas vitaminas (34, 35). Sendo assim, fontes alimentares respondem por apenas 10 a 20% da VitD necessária para seres humanos, sendo o restante obtido pela síntese cutânea e/ou uso de suplementos (11). O ergocalciferol é produzido por plantas e leveduras a partir do ergosterol, após exposição à radiação ultravioleta B (11). O colecalfiferol é formado na pele, de humanos e de outros mamíferos, a partir do 7-diidroxicolesterol, também sob exposição à radiação ultravioleta B. Após a síntese cutânea ou ingestão alimentar e medicamentosa, a VitD é metabolizada no fígado e nos rins formando seu metabólito mais ativo, o 1,25 diidroxitamina D [1,25 (OH)₂ D], também chamado de calcitriol (36).

O calcitriol atua nas células alvo ligando-se ao receptor de vitamina D (VDR). O VDR é membro da superfamília de receptores nucleares para hormônios esteróides (2, 37) e age como fator de transcrição nuclear, sendo capaz de ligar-se diretamente a regiões específicas do DNA. O 1,25 (OH)₂ D associado ao VDR se liga ao receptor rexinóide (RXR), formando heterodímeros. Este complexo liga-se a regiões reguladoras de genes-alvo, conhecidas como elementos resposta de VitD, e interagem com proteínas nucleares desencadeando a ativação ou a desativação de genes (38). Adicionalmente, há duas décadas, Chen and DeLuca (1994) (39), identificaram um gene (vitamin D-up-regulated (VDUP-1)) que é positivamente regulado pela VITD em células de linhagem promielocítica (HL-60). Desde então, o VDUP-1 tem sido identificado em vários tecidos, incluindo o coração (40-43). Não se sabe ao certo como a VITD aumenta a expressão do VDUP-1. Welsh e colaboradores (2003) (44) propuseram que a expressão do VDUP-1 pode ser regulada pelo complexo 1,25 (OH)₂ D-VDR.

A proteína codificada pelo VDUP-1 é também conhecida como proteína ligante da tiorredoxina (TBP-2) ou mais atualmente, como proteína de interação com a tiorredoxina (TXNIP). Ela recebeu esses nomes, pois, dentre outras funções, foi identificada como regulador

negativo endógeno da proteína tioredoxina (Trx) (45). A TXNIP liga-se ao centro catalítico da Trx reduzida, por meio de pontes dissulfeto, formando um complexo estável. Esta interação bloqueia a ligação da Trx com outros fatores, diminuindo sua atividade redutora (46).

O sistema Trx consiste de duas enzimas oxidorreduções, a Trx e a Trx redutase (TrxR). A Trx catalisa reduções utilizando diferentes proteínas como substrato e tornando-se assim oxidada. A Trx oxidada é então reduzida pela TrxR, utilizando NADPH como doador de hidrogênio (47). Até o momento, três variantes distintas de Trx humana foram identificadas. A mais clássica é a Trx-1, localizada no citoplasma das células, e que em determinadas situações patológicas migra para o núcleo (48). Existem também a Trx-2, que está localizada nas mitocôndrias (49) e a Trx-Sp, que é uma variante muito expressa em espermatozoides (50). O sistema Trx é o maior sistema antioxidante do tipo tiol-dissulfeto oxidorredução das células (51).

Estudos têm mostrado que tanto a Trx como a TXNIP modulam diversas vias de sinalização por meio da interação direta com moléculas de sinalização intracelular e fatores de transcrição. Essas proteínas, por exemplo, participam da regulação de vias apoptóticas, inflamatórias, vias de hipertrofia e também modulam o metabolismo energético, tanto em cardiomiócitos como em outros tipos celulares (41, 51-55). Portanto, a suplementação em excesso de VitD poderia levar ao desequilíbrio da TXNIP e/ou do sistema Trx no coração, podendo resultar em remodelação cardíaca. Sendo assim, esse pode ser um dos mecanismos pelo qual o excesso de VitD causa efeitos deletérios ao coração.

Hipótese

2. HIPÓTESE

Com base nos dados apresentados acima, a hipótese do nosso trabalho é que a suplementação de vitamina D em excesso, mas em doses não tóxicas, leva à remodelação cardíaca com aparecimento de estresse oxidativo, apoptose, alteração dos mediadores inflamatórios e do metabolismo energético e que com o aumento do tempo de suplementação, ocorre alterações de morfologia e função cardíaca. Essas alterações são moduladas pela TXNIP e Trx.

Objetivos

3. OBJETIVOS

✓ Avaliar se suplementação em excesso, mas em doses não tóxicas, de vitamina D na ração por 2 meses resulta em alteração das proteínas TXNIP e Trx.

✓ Avaliar se suplementação em excesso, mas em doses não tóxicas, de vitamina D na ração por 2 meses resulta em remodelação cardíaca com aparecimento de estresse oxidativo, apoptose e alterações de mediadores inflamatórios e metabolismo energético.

✓ Avaliar se o aumento do tempo de suplementação (suplementação de vitamina D por 4 meses) leva a alterações na morfologia e função do coração.

Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento Experimental

O protocolo experimental do presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animal de nossa instituição, estando em conformidade com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

Foram realizados 2 experimentos:

Experimento 1: foram utilizados 64 ratos Wistar machos pesando aproximadamente 200 g a 250 g acondicionados no Biotério da Unipex da Faculdade de Medicina – UNESP, Botucatu. Os animais foram distribuídos em 3 grupos: 1) Grupo controle (C) – formado por 21 animais que receberam a ração sem suplementação de colecalciferol ; 2) Grupo VD3 – formado por 22 animais que receberam suplementação de 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; 3) Grupo VD10 – formado por 21 animais que receberam suplementação de 10.000UI de colecalciferol/kg de ração. Os animais receberam a suplementação de colecalciferol por período de dois meses. Após esse período, foram submetidos à avaliação ecocardiográfica e posteriormente à eutanásia e coleta de material biológico para realização das demais avaliações.

Experimento 2: foram utilizados 46 ratos Wistar machos pesando aproximadamente 200 g a 250 g foram acondicionados no Biotério da Unipex da Faculdade de Medicina – UNESP, Botucatu. Os animais foram distribuídos novamente em 3 grupos: 1) Grupo controle (C-4) – formado por 14 animais que receberam a ração sem suplementação de colecalciferol; 2) Grupo VD3-4 – formado por 16 animais que receberam suplementação de 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; 3) Grupo VD10-4 – formado por 16 animais que receberam suplementação de 10.000UI de colecalciferol/kg de ração. Os animais receberam a suplementação de colecalciferol por período de quatro meses. Após esse período, esses animais foram submetidos à avaliação ecocardiográfica e posteriormente à eutanásia e coleta de material biológico.

Os animais foram expostos a ciclo claro-escuro de 12h, à temperatura ambiente de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Foram colocados em gaiolas individuais com livre acesso à água e a ingestão alimentar foi controlada diariamente. O peso corporal (PC) foi medido semanalmente.

4.2 Preparo das rações

A ração utilizada para o grupo controle e para a fabricação das rações suplementadas com colecalciferol foi a ração comercial para ratos a base de cereais da Nuvilab® CR1 Nuvital Nutrientes S/A, Brazil. A composição aproximada por kg de ração era de 220g de proteína, 40g

de gordura, 100g de mineral, 80g de fibra, e 1.800UI de VitD. Para o preparo da ração suplementada com colecalciferol, primeiramente o colecalciferol (Sigma-Aldrich, MO, USA) foi diluído em óleo de milho (10 ml/kg de ração), e posteriormente adicionado á ração triturada. Após, a ração foi misturada, peletizada e colocada para secar a temperatura ambiente. Após processo de secagem foi armazenada em freezer (-14°C). A ração para o grupo controle foi preparada da mesma forma, sendo adicionado apenas o óleo (10ml/Kg ração). Todos os animais receberam a mesma quantidade de ração.

4.3 Doses de vitamina D utilizadas

Informações sobre as necessidades de VitD em ratos são limitadas. Recentemente, o Institute of Medicine realizou uma revisão para identificar as Dietary Reference Intakes (DRIs) para VitD para humanos. Na DRIs foi definida que da Necessidade Média Estimada para a VitD é de 400 UI/dia e que o Limite Superior Tolerável (valor acima do qual podem ocorrer efeitos deletérios) é de 4.000 UI/dia. O Nível Máximo de tolerância de Ingestão é dez vezes maior que a Necessidade Média Estimada (56). O National Research Council (NRC) recomenda a quantidade de 1.000UI de VitD por kg de ração para ratos (57). Entretanto, eles não definiram um Nível Máximo de tolerância de Ingestão para a VitD. Sendo assim, nós usamos a relação de 10 vezes a dose recomendada para ratos, para termos uma dose alta de VitD (10.000 UI/kg de ração). Além disso, usamos também uma dose intermediária (3.000 UI/kg de ração) entre a recomendada pelo (NRC) e a nossa dose alta.

Shepard & DeLuca (1980) mostraram que ratos suplementados com doses acima de 1.000UI de VitD por dia (~ 30.000UI/kg de ração) apresentaram sinais de toxicidade, tais como: irritabilidade, diarreia, perda de apetite diminuição do ganho de peso. Além disso, os rins apresentaram manchas de cor branco-acinzentada, indicativas de calcificação (58). As doses usadas em nosso estudo foram 4,8 e 11,8 vezes maiores do que a dose recomendada para ratos, mas não atingiu a dose de 1.000UI/dia considerada tóxica por Shepard & DeLuca (1980) (58). Portanto, as doses usadas no presente estudo foram consideradas suplementação em excesso de VitD, porém doses não tóxicas

4.4 Avaliação ecocardiográfica

Após receberem as dietas durante dois e quatro meses, os ratos foram anestesiados com cloridrato de cetamina (50 mg/kg) e cloridrato de xilidino (1mg/kg) via intramuscular. Em seguida foi feita raspagem da pelagem no tórax dos animais, que prontos foram posicionados em decúbito lateral esquerdo para a realização do ecocardiograma. O ecocardiógrafo utilizado foi o General Electric Medical System, modelo Vivid S6 (Tirat Carmel, Israel), equipado com transdutor eletrônico multifrequencial de 5,0-11,5 MHz. As estruturas cardíacas foram medidas em pelo menos cinco ciclos cardíacos consecutivos, obtendo-se a média aritmética em seguida (59).

A imagem da cavidade ventricular esquerda e da espessura da parede posterior (EPP) foram obtidas posicionando-se o cursor do modo-M logo abaixo do plano da valva mitral, entre os músculos papilares. As imagens da aorta e do átrio esquerdo também foram obtidas na posição para-esternal eixo menor com cursor de modo-M passando pela valva aórtica.

O diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (DDVE) e a EPP foram medidos no momento correspondente ao seu diâmetro máximo. Já, o diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo (DSVE) foi medido no momento da excursão sistólica máxima de sua parede posterior.

As medidas do diâmetro do átrio esquerdo (AE) e da aorta (Ao) foram realizadas, especificamente, no final da sístole e diástole ventricular.

O diâmetro da via de saída do ventrículo esquerdo (VSVE) foi medido na posição paraesternal eixo maior, na sístole ventricular.

Os fluxos diastólico transmitral e sistólico pela VSVE foram obtidos com o transdutor colocado nas posições apicais quatro a cinco câmaras, permitindo as medidas da onda E, onda A e velocidade máxima na VSVE. A frequência cardíaca (FC) foi estimada pelo tempo entre dois batimentos cardíacos consecutivos.

O tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) medido corresponde ao tempo entre o final do fluxo sistólico pela VSVE e o início da fluxo diastólico transmitral.

As outras variáveis foram derivadas das formulações descritas a seguir:

- ✓ Espessura relativa da parede (ERPP) = $(2 \times \text{EPP})/\text{DDVE}$;
- ✓ Fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FE) = $(\text{DDVE}^3 - \text{DSVE}^3) / \text{DDVE}^3$;
- ✓ Porcentagem de encurtamento (Enc) = $[(\text{DDVE} - \text{DSVE}) / \text{DDVE}] \times 100$;
- ✓ Volume sistólico (VS) = $[\text{VTI} \times \pi \times (\text{VSVE}/2)^2]$, sendo VTI a integral da velocidade/tempo do fluxo sistólico na VSVE;
- ✓ Débito cardíaco (DC) = $\text{VS} \times \text{FC}$;

- ✓ Índice cardíaco (IC) = DC/PC.
- ✓ Tempo de relaxamento isovolumétrico corrigido para a frequência cardíaca (FC) (TRIV/R-R) = TRIV/ $\sqrt{R-R}$, sendo que R-R = 60/FC.

Foram realizadas também algumas medidas por Doppler tissular, tais como a velocidade máxima de deslocamento sistólico do anel mitral e tricúspide (onda S'), pico de velocidade de deslocamento diastólico inicial do anel mitral e tricúspide (E') e pico de velocidade de deslocamento diastólico tardio do anel mitral e tricúspide (A') (60, 61).

Algumas variáveis ecocardiográficas foram normalizadas pelo peso corporal e pelo diâmetro da aorta.

4.5 Coleta de material biológico

Após a realização do ecocardiograma, os animais foram eutanasiados com dose excessiva de pentobarbital sódico (50 mg/kg) e posteriormente decapitados. Foram então coletados o sangue (em tubo com e sem heparina) e o coração dos animais.

O sangue foi centrifugado a 3.000 rpm por 20 minutos a 4°C. O soro e o plasma obtidos foram congelados a -80°C para posterior dosagem de cálcio, fósforo e 25 (OH) D₃.

O coração foi dissecado em átrios (A), ventrículo direito (VD) e ventrículo esquerdo (VE), todos foram pesados (dados morfométricos). O VE que foi seccionado em anéis, colocado em nitrogênio líquido e depois armazenado em freezer a -80°C para posteriores análises.

4.6 Determinação plasmática de 25 (OH) D₃

As concentrações de 25 (OH) D₃ no plasma foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O aparelho empregado foi cromatógrafo Waters 2695, com detector Waters 2996-fotodiodo. A análise foi feita por coluna C18 de fase reversa para todas as amostras. A fase móvel foi composta por água e metanol (85:15, v/v). O comprimento do detector de onda ultravioleta (UV) será fixado em 265 nm e com fluxo de 0,5 ml/min.

A extração de 25 (OH) D₃ foi feita em alíquotas de 500 µl de plasma. O plasma foi colocado em tubo, adicionado 500 µl de metanol-isopropanol (90:10, v/v), e agitado em vórtex por 15 segundos. Em seguida, foi adicionado 1,5 ml de n-hexano, agitado em vórtex por 60 segundos e centrifugado a 3.000 rpm por 3 minutos, a 4°C. Foi coletado o sobrenadante, colocado em outro tubo e evaporado com fluxo de nitrogênio. As amostras foram redissolvidas em 125 µl de metanol. Foi injetado no HPLC 50 µl de amostra. Após corrida de 20 minutos, foi

aguardado estabilização da coluna que foi lavada com metanol 100% para leitura de nova amostra (62).

4.7 Determinação sérica de Cálcio

A dosagem de cálcio foi realizada por método colorimétrico. O cálcio foi dosado no soro por meio da reação com arsenazo III, em pH neutro, formando um complexo cuja intensidade da cor é proporcional à quantidade de cálcio na amostra (teste kit Laborlab, Laborlab Produtos para Laboratório, SP, Brasil). A cor obtida foi medida a 600-650 nm em espectrofotômetro.

4.8 Determinação dos mediadores inflamatórios

A dosagem dos mediadores inflamatórios fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interferon- γ (INF- γ), interleucina-10 (IL-10) e molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) foi realizada pelo método de ELISA sanduíche.

Primeiramente foi realizada a extração da proteína do tecido cardíaco adicionando-se 1,5 ml de tampão de extração (50 mM de tampão fosfato de potássio pH=7,0; 0,3 M sucrose; 0,5 mM de DTT; 1 mM de EDTA pH=8,0; PMSF 0,3 mM; NaF 10 mM e inibidor de protease 1:100) à 60 mg de tecido cardíaco. As amostras foram homogeneizadas por 10 segundos, 2 vezes em aparelho Polytron (Ika Ultra Turrax™ T25 Basic, Wilmington USA). O material foi então centrifugado por 20 minutos à 4° C e 12.000 rpm e o sobrenadante foi coletado. A quantidade de proteína do extrato foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando curva de BSA Protein Standard (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) como padrão (63).

Após a extração de proteína, placas de 96 poços (Nunc) foram recobertas com solução contendo anticorpo purificado de captura anti-TNF- α , anti- INF- γ , anti-IL-10 ou anti-ICAM-1 (R&D Systems), diluídos em tampão PBS. As placas foram incubadas à temperatura ambiente durante uma noite. Após sucessivas lavagens com solução PBS – Tween 20 (0,05%) foi adicionada 300 μ L da solução de bloqueio, constituída de PBS contendo 1% de albumina, com incubação por 2 horas, à temperatura ambiente. As placas novamente lavadas foram incubadas por 2 horas, à temperatura ambiente, com as amostras e com as respectivas curvas padrões, diluídas na base 2 em tampão PBS contendo 1% de albumina. Decorrido o tempo de incubação, as placas foram lavadas e incubadas com os anticorpos anti-TNF- α , anti- INF- γ , anti-IL-10 ou anti-ICAM-1 de rato biotinilados durante 2 horas, à temperatura ambiente. Posteriormente, as placas foram novamente incubadas com estreptoavidina diluído 1:200 em tampão PBS contendo

1% de albumina, durante 20 minutos, à temperatura ambiente. As placas foram lavadas e reveladas com OPD (Sigma). A reação foi interrompida por adição de H₂SO₄ 16% e a leitura realizada em 492 nm.

4.9 Determinação da atividade das enzimas do metabolismo energético e de marcadores do estresse oxidativo

As enzimas do metabolismo energético e os marcadores de estresse oxidativo foram determinados por método colorimétrico.

Primeiramente foi realizada a extração de proteína em amostras de 200 mg do ventrículo esquerdo, homogeneizadas em tampão fosfato de sódio (0,1M, pH 7,0) e centrifugadas a 10.000 rpm, durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e utilizado para a determinação da concentração de proteína total; da atividade das enzimas do metabolismo energético: lactato desidrogenase, fosfofrutoquinase, complexo piruvato desidrogenase, citrato sintase, 3-hidroxiacil Coenzima A desidrogenase; para atividade das enzimas antioxidantes: superóxido dismutase, glutationa peroxidase e catalase; e para a concentração de hidroperóxido de lipídio. O pellet foi ressuspenso com tampão fosfato de sódio 0,1M contendo 250mM de sacarose e 2mM de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), e centrifugado a 10.000 rpm por 5 minutos a 4°C, para posterior determinação da atividade da succinato desidrogenase (complexo enzimático mitocondrial de cadeia respiratória II) e da ATP sintase (64).

As leituras foram realizadas em leitor de microplaca (μ Quant-MQX Bio-Tech Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) com controle pelo software. Todos os reagentes utilizados foram de procedência da Sigma (St. Louis, USA).

a) Determinação da atividade das enzimas do metabolismo energético

✓ Lactato desidrogenase (LDH)

A atividade da LDH foi determinada de acordo com metodologia proposta por Wilkinson (1965) (65) com a utilização do método UV otimizado, onde foi medido o consumo de NADH₂, (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido) que é proporcional à atividade da enzima presente na amostra.

✓ Fosfofrutoquinase (PFK)

A atividade da PFK foi determinada em meio contendo tampão TRIS-HCl (50mM; pH 8,0), MgCl₂, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, aldolase, trifosfato isomerase, ATP e frutose -6-fosfato, com medidas da velocidade de oxidação do NADH₂, segundo método descrito por Bass et al. (1969) (66).

✓ Complexo piruvato desidrogenase (PDH)

Na presença de tampão fosfato de potássio (50mM; pH 7,4) determinou-se a atividade da PDH em mistura reativa contendo NAD, tiamina pirofosfato, coenzima A, ditioneitol, MgCl₂, NBT (nitrobluetetrazóilico), piruvato de sódio e fenazina metassulfato, onde se mediu a conversão do piruvato em acetil-CoA através da velocidade da redução do NAD (66).

✓ Citrato sintase

A reação de condensação entre o grupamento acetil da molécula de acetil-CoA e oxaloacetado, reação catalisada pela citrato sintase, cuja atividade foi determinada na presença dos substratos acetil-CoA e oxaloacetato e DTNB (dithiobis-2-nitrobenzoato) em tampão fosfato Tris-HCl 50mM, pH 8,0 (66).

✓ 3-hidroxiacil Coenzima A desidrogenase (OHADH)

Foi determinada na presença de tampão Tris-HCl 0,1M, pH 7,0, EDTA, acetoacetil-CoA e NADH (66).

✓ Succinato desidrogenase (complexo II).

A atividade enzimática da succinato desidrogenase foi medida pelo método descrito por Fischer et al. (1985) (67) em meio com tampão fosfato de potássio (50mM; pH 7,4), contendo succinato de sódio, fenazina metassulfato e DPIP (diclorofenolindofenol), o qual teve absorvância, a 600nm, diminuída.

✓ ATP sintase

A atividade da ATP sintetase foi determinada em meio tamponado (Tris-HCl 50mM; pH 8,0, na presença de MgCl₂, NADH, fosfoenolpiruvato, ATP, LDH e piruvato quinase (68).

b) Determinação dos marcadores de estresse oxidativo

✓ Atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada monitorando a inibição da redução do nitroblutetrazólico (NBT) através de radicais superóxidos gerados em solução contendo NADH₂ e fenazina metassulfato (69).

✓ Atividade da glutathiona peroxidase (GPx)

Foi determinada a partir da oxidação do NADPH₂ em meio a mistura reativa contendo tampão fosfato de sódio, glutathiona reduzida, azida sódica, EDTA, glutathiona redutase, a qual catalisa a redução da glutathiona oxidada (70).

✓ Atividade da Catalase (CAT)

A atividade enzimática da catalase foi determinada em tampão fosfato pH 7,0, utilizando-se 15µL de amostra e peróxido de hidrogênio (30%). As leituras espectrofotométricas foram realizadas a 240nm (71).

✓ Concentração de hidroperóxido de lipídio (LH)

O hidroperóxido de lipídio foi determinado na presença de sulfato ferroso amoniacal (Fe₂⁺) e alaranjado de xilenol, ácido sulfúrico e butilato de hidroxitolueno (BHT) em mistura de metanol 90% (72).

4.10 Determinação da expressão protéica por Western Blot

Foi realizada a determinação da expressão da proteína de interação com a tiorredoxina (TXNIP); dos marcadores de estresse oxidativo: tiorredoxina-1 (Trx-1), fator nuclear eritróide-2 (Nrf-2), glutathiona peroxidase-1 (GPx-1) e heme oxigenase-1 (HO-1); dos marcadores de apoptose: caspase-3 (formas: inativa, pró-caspase-3 e ativa, caspase-3-clivada) e Bcl-2; e dos marcadores de metabolismo energético: receptor ativado pelo proliferador de peroxissoma (PPAR- α) e coativador 1 alfa do PPAR- γ (PGC1- α) pela técnica Western Blot.

a) Extração do lisado celular total

Para determinação de todas as proteínas estudadas, exceto o Nrf-2, a extração de proteína foi realizada utilizando-se amostras de 100 mg do ventrículo esquerdo homogeneizadas com 1ml de tampão de extração contendo NaCl 100 mM, Triton X-100 1% (v/v), deoxicolato de sódio

0,5% (w/v), SDS 0,1 % (w/v), glicerol 10% (v/v), Tris 10 mM (ph 7,4), EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, ortovanadato de sódio 1 mM, NaF 10 mM e inibidores de proteases (P2714, Sigma-Aldrich). As amostras foram homogeneizadas por 10 segundos, 2 vezes em aparelho Polytron (Ika Ultra Turrax™ T25 Basic, Wilmington USA). A seguir, as amostras foram centrifugado por 20 minutos, a 12.000 rpm e a 4° C. O sobrenadante foi coletado e armazenadas em freezer a -80° C. A concentração de proteína total foi analisada pelo método de Bradford utilizando curva de BSA Protein Standard (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) como padrão (63).

b) Extração nuclear

Amostras de 60 mg de ventrículo esquerdo foram homogeneizados com 500µl de tampão de extração (10mM HEPES, 1,5mM MgCl₂, 10mM KCl, 0,5mM DTT, 0,05% NP40). As amostras foram homogeneizadas manualmente, com auxílio de bastão de vidro. Posteriormente, as amostras foram centrifugados a 3000 rpm, por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi separado (fração citoplasmática) e o pellet ressuspensionado com tampão (5mM HEPES, 1,5mM MgCl₂, 0,2mM EDTA, 0,5mM DTT, 26% glicerol (v/v)) e NaCl. As amostras foram homogeneizadas por 10 segundos, 2 vezes em aparelho Polytron (Ika Ultra Turrax™ T25 Basic, Wilmington USA). Após aguardar 30 minutos em gelo, as amostras foram novamente centrifugadas a 15.000 rpm, por 20 minutos 4°C e coletado o sobrenadante (fração nuclear), que foi utilizado para a quantificação do Nrf-2. A concentração de proteína total foi analisada pelo método de Bradford utilizando curva de BSA Protein Standard (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) como padrão (63).

c) Eletroforese em gel

Após a quantificação da concentração de proteína, as amostras foram diluídas em tampão Laemmli (Tris - HCL 240mM, SDS, 0,8%, glicerol 40%, azul debromofenol 0,02% e β-mercaptoetanol 200mM) e aquecidas a 100°C por 5 minutos. Posteriormente, as amostras (contendo 50 µg de proteína total) foram separadas por eletroforese utilizando sistema Mini-Protean 3 Electrophoresis Cell (Bio - Rad, Hercules, CA, USA). A corrida eletroforética foi realizada em gel bifásico, de empilhamento (Tris - HCL 240mM pH 6,7, poliacrilamida 40%, APS e Temed) e de resolução (Tris - HCL 240mM pH 8,9, poliacrilamida 40%, glicerol, APS e Temed) a 4° C.

A concentração do gel de empilhamento utilizada foi de 5% e a concentração do gel de resolução variou de 10 a 15%, de acordo com o peso molecular da proteína determinada. No primeiro poço do gel foi aplicado um padrão de peso molecular, Kaleidoscope Prestained Standards (Bio - Rad, Hercules, CA, USA) e nos poços seguintes os grupos foram pipetados de maneira alternada. A corrida eletroforética foi efetuada a 30 min a 50 V e 2 horas a 120 V (Power Pac HC 3.0A, Bio - Rad, Hercules, CA, USA) com tampão de corrida (Tris 0,25M, glicina 192 mM e SDS 1%).

d) Transferência e Bloqueio

Após a corrida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em sistema Mini - Trans Blot (Bio - Rad, Hercules, CA, USA) utilizando-se tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% e SDS 0,1%). Os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana foram bloqueados mediante incubação com solução de 5% de leite em pó desnatado, dissolvido em solução basal pH 8,0 (Tris 1M pH 8,0, NaCl 5M e detergente Tween 20) por 120 minutos à temperatura ambiente sob constante agitação.

e) Incubação com os Anticorpos primário e secundário

Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários específicos para cada proteína analisada, diluídos em solução basal. As membranas permaneceram incubadas durante a noite à temperatura de 4°C, sob constante agitação. Após a incubação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas em solução basal pH 8,0 e incubadas com os anticorpos secundários específicos, diluídos também em solução basal. As membranas permaneceram incubadas por 1,5 horas, à temperatura ambiente, sob agitação constante. Posteriormente a membrana foi lavada em solução basal pH 8,0 e a imunodeteção foi realizada por meio do método de quimioluminescência utilizando o Kit SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific, USA. As imagens foram fotografadas no analisador de imagens Carestream Molecular Imaging (Carestream Health, Inc, USA).

A expressão de todas as proteínas analisadas foi normalizada pela expressão da proteína constitucional glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH).

A análise das imagens foi realizada no programa de análise de imagens Image Pro-plus (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA).

Os anticorpos primários utilizados foram os seguintes:

- ✓ VDUP-1, mouse monoclonal IgG₁ (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 271238).
 - ✓ Trx-1, rabbit polyclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 20146).
 - ✓ PGC-1, rabbit polyclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 13067).
 - ✓ PPAR- α , rabbit polyclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 9000).
 - ✓ Nrf-2, rabbit polyclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 722).
 - ✓ Heme Oxygenase 1, mouse monoclonal IgG1 (Abcam, Cambridge, MA, USA, 13248).
 - ✓ Glutathione Peroxidase 1, rabbit polyclonal IgG (Abcam, Cambridge, MA, USA, 22604).
 - ✓ Caspase 3, rabbit monoclonal IgG (Cell Signaling Technology, Inc, Beverly, MA, USA, 9664).
 - ✓ Bcl-2, rabbit monoclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 492).
 - ✓ GAPDH, mouse monoclonal IgG1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 32233).
- Os Anticorpos secundários utilizados foram os seguintes:
- ✓ Goat anti-mouse IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 2005).
 - ✓ Goat anti-rabbit IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 2004).

4.11 Atividade de tiorredoxina e da tiorredoxina redutase

A atividade da tiorredoxina e da tiorredoxina redutase foi realizada por meio de ensaio de redução de insulina (73, 74). Inicialmente, 60 mg do ventrículo esquerdo foi homogeneizado com 500 μ l de tampão de extração contendo 20 nmol/l de Hepes (pH=7,9), 300 mmol/l NaCl, 100 mmol/l KCl, 10 mmol/l de EDTA, 0,01% de Triton (v/v) e 1% de Inibidor de protease (v/v) (P2714, Sigma- Aldrich). As amostras foram homogeneizadas por 10 segundos, 2 vezes em aparelho Polytron (Ika Ultra TurraxTM T25 Basic, Wilmington USA). A seguir, as amostras foram centrifugado por 20 minutos, a 12.000 rpm e a 4° C. A concentração de proteína total foi analisada pelo método de Bradford 51 utilizando curva de BSA Protein Standard (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) como padrão (63).

Para determinação da atividade da Trx, cada amostra, 50 μ g de proteína total, em um volume de 8 μ l, foi incubada com 2 μ l de tampão de ativação (100 mM de Tris-HCl (pH = 7,5); 2 mM de EDTA; 1 mg/ml de BSA; e 2 mM de DTI) a 37 ° C durante 20 minutos. As amostras foram então misturadas com 110 μ l da mistura de reação (100 mM de Tris-HCl (pH = 7,5); 2,0 mM de EDTA, 0,2 mM de NADPH; 1,0 μ g Trx redutase; e 140 μ M de insulina) e incubadas a 25 °C por 20 minutos. A absorbância foi medida a 340 nm, indicando a oxidação do NADPH em intervalos de 1 minuto, utilizando espectrofotômetro. Como controle, as amostras foram

misturadas com a mistura de reação sem insulina. As medidas de absorvância na ausência de insulina foram subtraídas das medidas de absorvância na presença de insulina gerando o delta absorvância. Posteriormente, foi realizada a área sobre a curva do delta absorvância, para apresentação dos resultados.

Para determinação da atividade da TrxR as amostras foram misturadas com 110 μ l da mistura de reação (100 mM de Tris-HCl (pH = 7,5); 2,0 mM de EDTA, 0,2 mM de NADPH; 1 μ g/ μ l de Trx; e 1mg/ml de insulina) e incubadas a 25 °C por 20 minutos. A absorvância foi medida a 340 nm, indicando a oxidação do NADPH em intervalos de 1 minuto, utilizando espectrofotômetro. Como controle, as amostras foram misturadas com a mistura de reação sem Trx. As medidas de absorvância na ausência de Trx foram subtraídas das medidas de absorvância na presença de Trx. A atividade foi calculada da diminuição na absorvância a 340nm, medido a cada 1 minuto, como sendo $\Delta 340 \times 2/6,22$. Posteriormente, foi realizada a área sobre a curva do delta absorvância, para apresentação dos resultados.

4.12 Análise estatística

Os valores obtidos são apresentados como média \pm desvio padrão (para distribuição normal) ou mediana com percentil 25 e 75 (para distribuição não normal).

Os resultados de cada variável foram submetidos à verificação da normalidade e de igualdade de variância. Quando esses requisitos foram atendidos as comparações entre os grupos foram feitas por análise de variância (ANOVA) de uma via, complementadas com o teste de Tukey. Quando um dos requisitos não foi atendido, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal Wallis complementado com o teste de Dunn.

Para avaliar a resposta dose dependente da suplementação de VitD foram utilizados testes de tendência. Quando as variáveis apresentaram distribuição normal, foi utilizado o teste Trend do Pacote estatístico GraphPad Prism. Quando as variáveis não apresentaram distribuição normal, foi realizada a Correlação de Spearman entre doses e variável analisada (75).

Resultados

5. RESULTADOS

5.1 Experimento 1

5.1.1 Peso corporal, consumo diário de ração e de vitamina D, cálcio sérico e 25 (OH) D₃ plasmático.

Não houve diferença entre os grupos para o peso corporal final e o consumo diário de ração. O consumo diário de VitD foi maior no grupo VD3 comparado ao C e foi maior no grupo VD10 comparado aos outros grupos. O aumento no consumo diário de VitD foi dose dependente (figura 1). O 25 (OH) D₃ plasmático foi maior no grupo suplementado com a maior dose de colecalciferol comparado ao C. O aumento do 25 (OH) D₃ foi dose dependente (figura 2). Os valores de cálcio sérico foram maiores nos grupos suplementados quando comparados ao C e seu aumento foi dose dependente (figura 3) (tabela 1).

Tabela 1. Peso corporal, consumo diário de ração e de vitamina D, cálcio sérico e 25 (OH) D₃ plasmático.

Variável	C	VD3	VD10	P1	P2
Peso Corporal (g)	422±26,8 (21)	429±35,6 (22)	421±31,7 (21)	0,646	0,923
Consumo diário de ração (g/day)	25,7±1,54 (21)	25,9±1,91 (22)	24,9±1,98 (21)	0,166	0,154
Consumo diário de vitamina D (UI/dia)	45,5 (44,8-48,1) ^a (21)	123 (118-128) ^b (22)	290 (283-310) ^c (22)	<0,001	<0,001
25 (OH) D ₃ (ng/ml)	15,0 (13,2-20,7) ^a (5)	25,5 (19,0-40,5) ^{ab} (5)	36,9 (34,1-39,8) ^b (5)	0,016	<0,001
Cálcio sérico (mg/dl)	8,24±1,09 ^a (9)	9,32±1,10 ^b (12)	9,44±0,51 ^b (11)	0,016	0,008

Dados expressos em média ± desvio padrão ou mediana e percentil 25 e 75, números entre parênteses indicam o número de animais em cada grupo. C: grupo controle, sem suplementação de colecalciferol; VD3: grupo suplementado com 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; VD10: grupo suplementado com 10.000UI de colecalciferol/kg de ração. 25 (OH) D₃: 25-hidroxicolecalciferol. P1: valor de p da ANOVA de 1 via ou Kruskal Wallis; P2: valor de p para teste de tendência. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos.

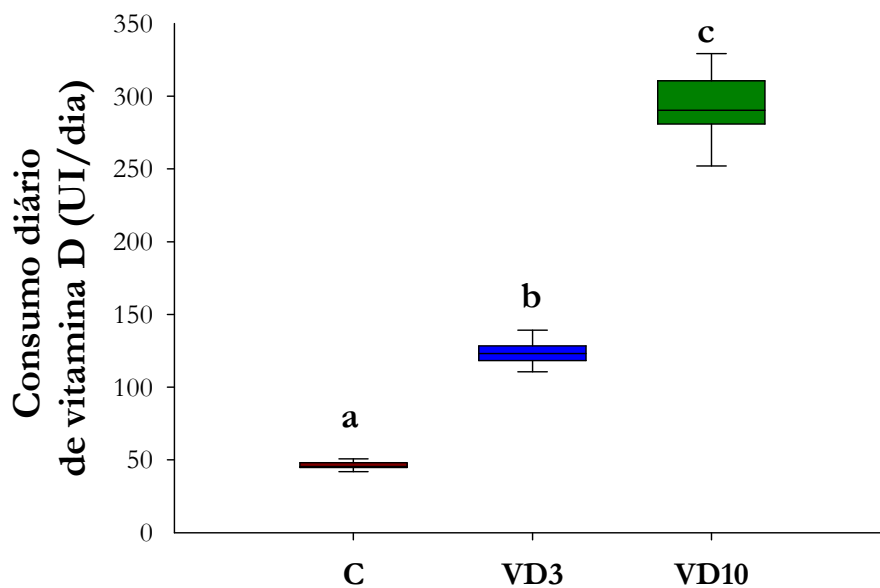


Figura 1. Consumo diário de vitamina D.

C: grupo controle, sem suplementação de colecalciferol; VD3: grupo suplementado com 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; VD10: grupo suplementado com 10.000UI de colecalciferol/kg de ração. P1: < 0,001 (valor de p Kruskal Wallis); P2: < 0,001 (valor de p para teste de tendência). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos.

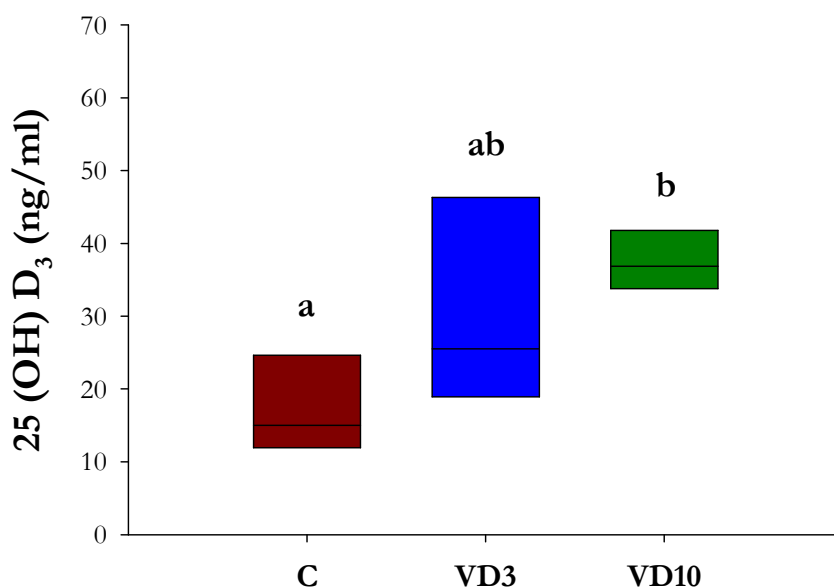


Figura 2. Concentração plasmática de 25 (OH) D₃.

C: grupo controle, sem suplementação de colecalciferol; VD3: grupo suplementado com 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; VD10: grupo suplementado com 10.000UI de colecalciferol/kg de ração. P1 = 0,016 (valor de p Kruskal Wallis); P2: < 0,001 (valor de p para teste de tendência). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos.

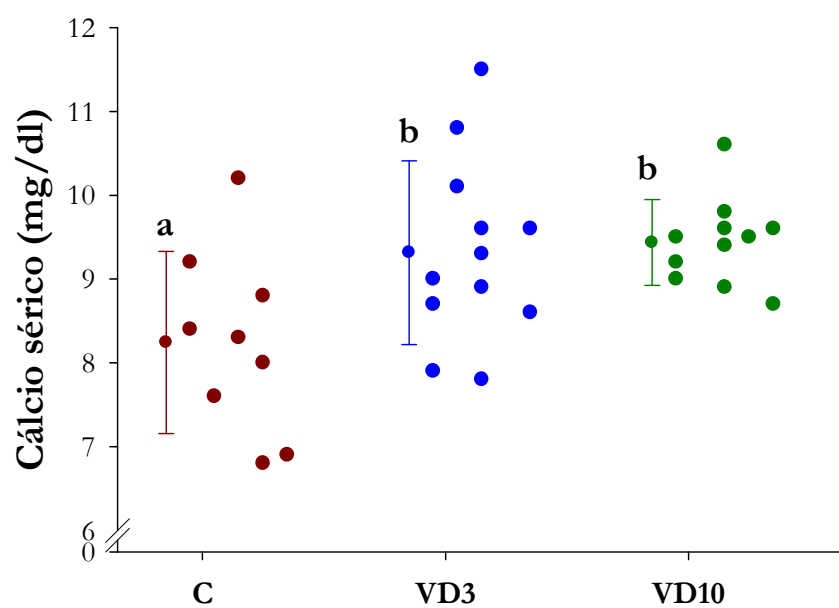


Figura 3. Concentração sérica de cálcio.

C: grupo controle, sem suplementação de colecalciferol; VD3: grupo suplementado com 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; VD10: grupo suplementado com 10.000UI de colecalciferol/kg de ração. P1 = 0,016 (valor de p ANOVA de 1 via); P2 = 0,008 (valor de p para teste de tendência). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos.

5.1.2 Expressão protéica da TXNIP e da Trx e atividade da Trx e da TrxR.

Como podemos observar na tabela 2, a expressão protéica da TXNIP foi maior no grupo suplementado com a maior dose de colecalciferol comparado aos outros grupos e seu aumento foi dose dependente (figura 4). A expressão da Trx não diferiu entre os grupos, entretanto ela apresentou uma diminuição dose dependente (figura 5). Adicionalmente, a atividade redutora da Trx foi menor no grupo VD10 comparado aos outros grupos e essa diminuição foi dose dependente (figura 6). A atividade da TrxR não foi diferente entre os grupos (tabela 2).

Tabela 2. Expressão protéica da TXNIP e da Trx e atividade da Trx e da TrxR.

Variável	C	VD3	VD10	P1	P2
TXNIP (unidade arbitrária)	0,16 (0,09-0,30) ^a (12)	0,18 (0,08-0,34) ^a (12)	0,74 (0,48-1,05) ^b (12)	0,002	<0,001
Trx (unidade arbitrária)	1,04±0,40 (12)	0,90±0,33 (12)	0,73±0,22 (11)	0,082	0,026
Atividade da Trx (DO 340 nm x minuto)	0,251±0,08 ^a (10)	0,226±0,06 ^a (10)	0,115±0,0 ^b (10)	<0,001	<0,001
Atividade da TrxR (mU/mg de proteína x minuto)	0,097 (0,096-0,098) (8)	0,097 (0,096-0,097) (9)	0,096 (0,085-0,098) (10)	0,383	0,117

Dados expressos em média ± desvio padrão ou mediana e percentil 25 e 75, números entre parênteses indicam o número de animais em cada grupo. C: grupo controle, sem suplementação de colecalciferol; VD3: grupo suplementado com 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; VD10: grupo suplementado com 10.000UI de colecalciferol/kg de ração. TXNIP: proteína de interação com a tiorredoxina; Trx: tiorredoxina; DO: densidade óptica; TrxR: tiorredoxina redutase. P1: valor de p da ANOVA de 1 via ou Kruskal Wallis; P2: valor de p para teste de tendência. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos.

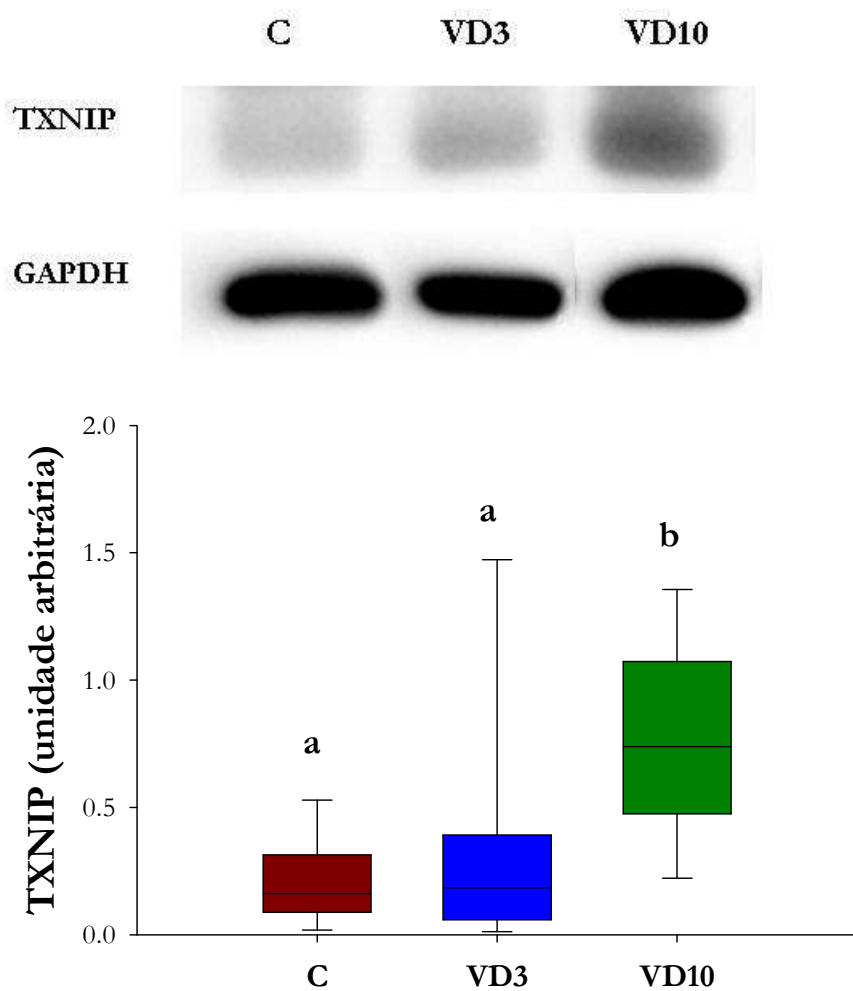


Figura 4. Expressão protéica da proteína de interação com a tiorredoxina.

C: grupo controle, sem suplementação de colesterciferol; VD3: grupo suplementado com 3.000UI de colesterciferol/kg de ração; VD10: grupo suplementado com 10.000UI de colesterciferol /kg de ração. P1 = 0,002 (valor de p Kruskal Wallis); P2: < 0,001 (valor de p para teste de tendência). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos.

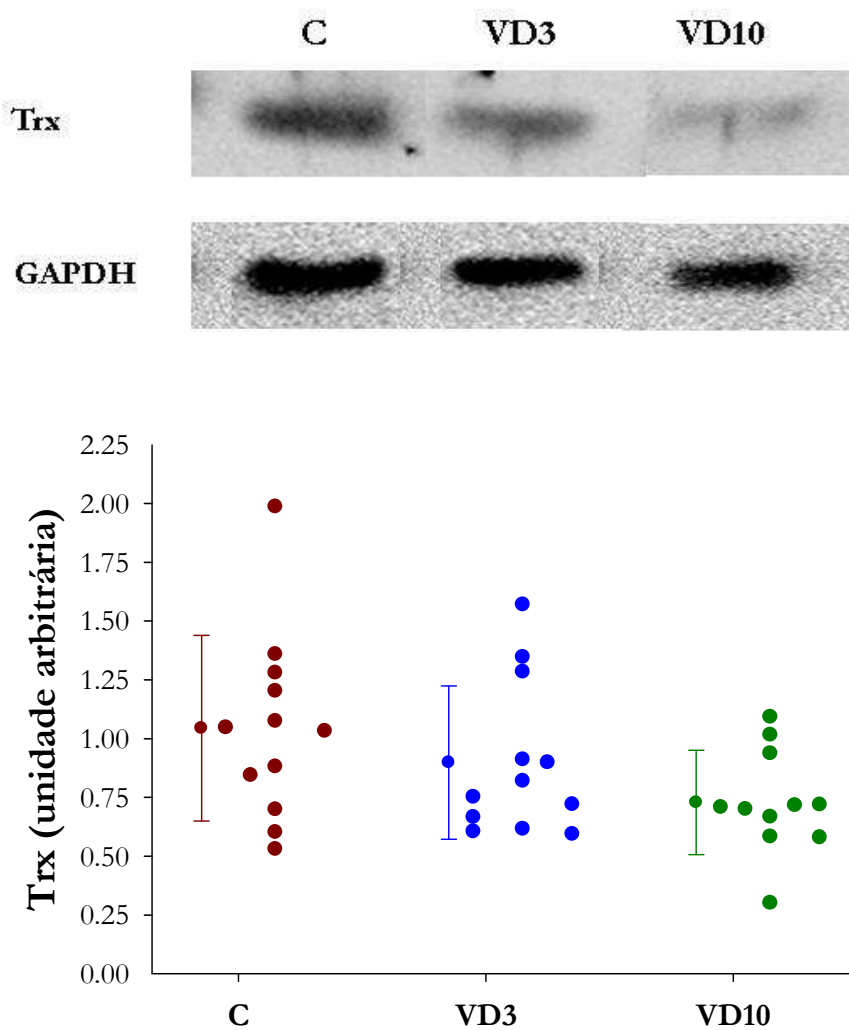


Figura 5. Expressão protéica da tiorredoxina.

C: grupo controle, sem suplementação de colecalciferol; VD3: grupo suplementado com 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; VD10: grupo suplementado com 10.000UI de colecalciferol /kg de ração. P1 = 0,082 (valor de p ANOVA de 1 via); P2 =0,026 (valor de p para teste de tendência).

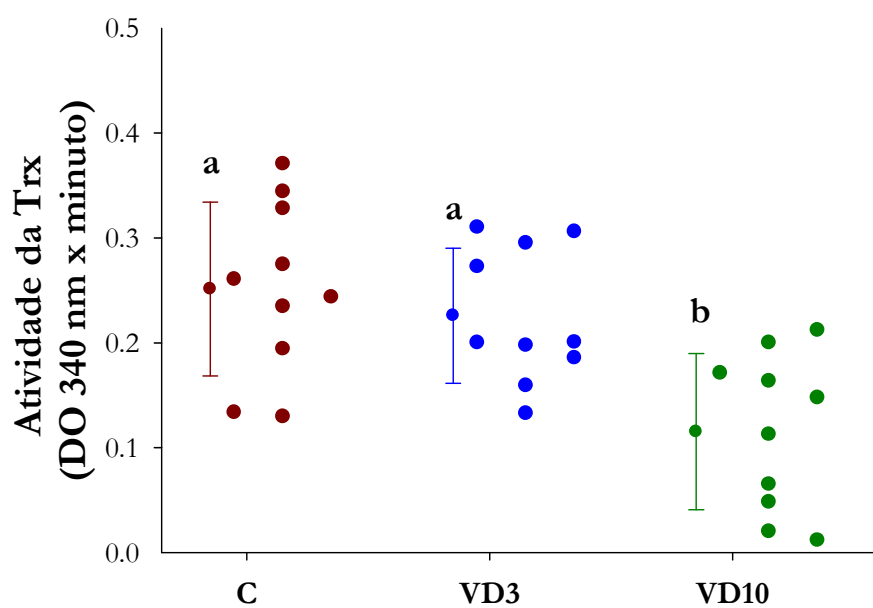


Figura 6. Atividade da tiorredoxina.

C: grupo controle, sem suplementação de colecalciferol; VD3: grupo suplementado com 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; VD10: grupo suplementado com 10.000UI de colecalciferol /kg de ração. P1 < 0,001 (valor de p ANOVA de 1 via); P2 < 0,001 (valor de p para teste de tendência). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos.

5.1.3 Marcadores de estresse oxidativo.

Os dados relativos aos marcadores de estresse oxidativo estão apresentados na tabela 3. Como podemos observar, a atividade das enzimas antioxidantes SOD (figura 7) e GPx (figura 8) foram menores nos grupos suplementados com colecalciferol. Essa diminuição foi dose dependente. Para a atividade da enzima CAT não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Os valores de LH foram maiores nos animais do grupo VD10 comparado aos outros grupos e o seu aumento foi dose dependente (figura 9).

A expressão protéica do Nrf-2 e das proteínas antioxidantes HO-1 e GPx não apresentou diferença entre os grupos.

Tabela 3. Marcadores de estresse oxidativo.

Variável	C	VD3	VD10	P1	P2
SOD (nmol/mg de proteína)	19,9 (18,6-24,5) ^a (8)	13,0 (11,8-14,0) ^b (8)	13,0 (11,8-14,2) ^b (8)	<0,001	0,001
GPx (umol/g de tecido)	40,4±6,2 ^a (8)	31,5±4,6 ^b (8)	29,7±3,1 ^b (8)	<0,001	<0,001
CAT (μmol/g de tecido)	120,9±15,5 (8)	124,6±11,1 (8)	110,9±15,8 (8)	0,165	0,178
LH (nmol/g de tecido)	143,8±13,9 ^a (8)	134,1±20,1 ^a (8)	179,6±11,8 ^b (8)	<0,001	<0,001
NRF-2 (unidade arbitrária)	1,07 (0,72-1,68) (12)	0,91 (0,62-1,10) (11)	1,36 (1,06-1,87) (12)	0,192	0,279
HO-1 (unidade arbitrária)	0,97 (0,75-1,27) (12)	0,83 (0,71-1,02) (12)	1,00 (0,86-1,62) (12)	0,271	0,117
GPx (unidade arbitrária)	1,06±0,19 (12)	0,88±0,20 (12)	0,92±0,32 (12)	0,189	0,177

Dados expressos em média ± desvio padrão ou mediana e percentil 25 e 75, números entre parênteses indicam o número de animais em cada grupo. C: grupo controle, sem suplementação de colecalciferol; VD3: grupo suplementado com 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; VD10: grupo suplementado com 10.000UI de colecalciferol/kg de ração. SOD: superóxido dismutase; GPx: glutationa peroxidase; CAT: catalase; LH: hidroperóxido de lipídio; NRF-2: fator nuclear eritróide-2, HO-1: heme oxigenase-1. P1: valor de p da ANOVA de 1 via; P2: valor de p para teste de tendência. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos.

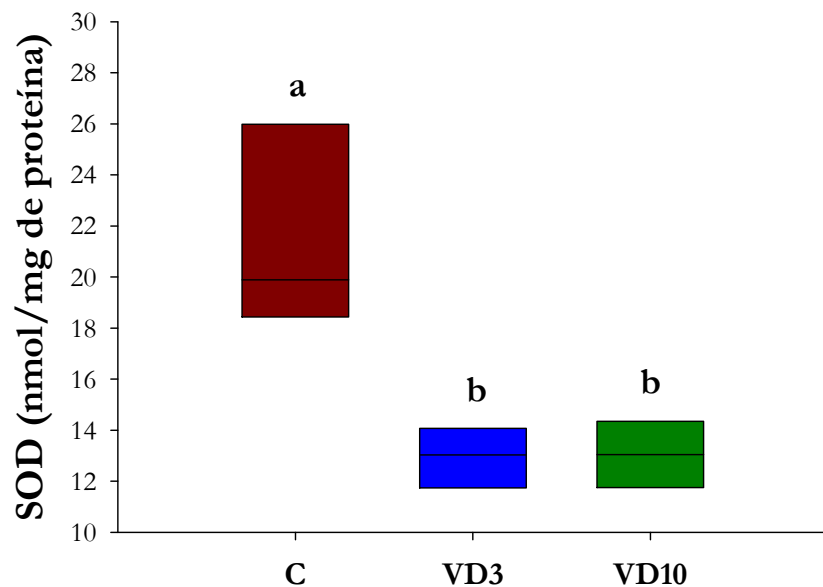


Figura 7. Atividade da superóxido dismutase.

C: grupo controle, sem suplementação de colecalciferol; VD3: grupo suplementado com 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; VD10: grupo suplementado com 10.000UI de colecalciferol/kg de ração. $P_1 < 0,001$ (valor de p Kruskal Wallis); $P_2 = 0,001$ (valor de p para teste de tendência). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos.

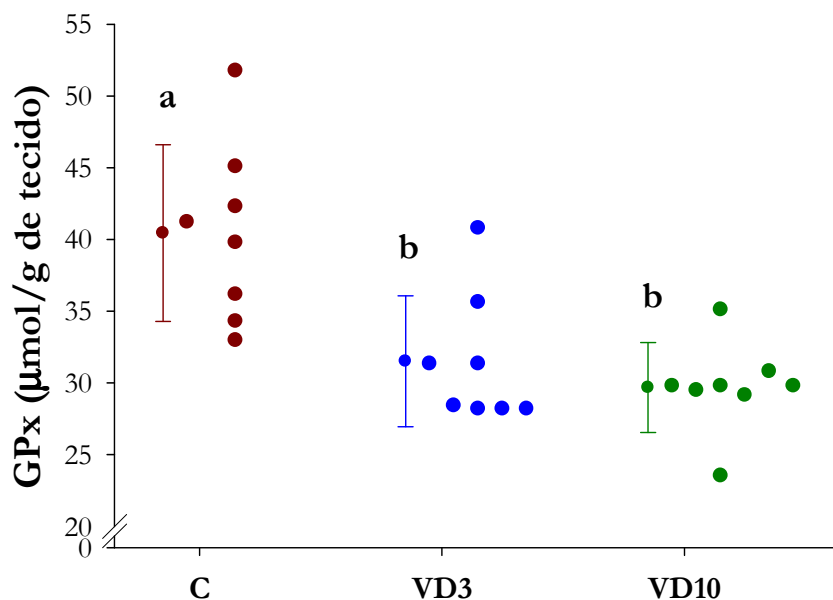


Figura 8. Atividade da glutathiona peroxidase.

C: grupo controle, sem suplementação de colecalciferol; VD3: grupo suplementado com 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; VD10: grupo suplementado com 10.000UI de colecalciferol/kg de ração. $P_1 < 0,001$ (valor de p ANOVA de 1 via); $P_2 < 0,001$ (valor de p para teste de tendência). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos.

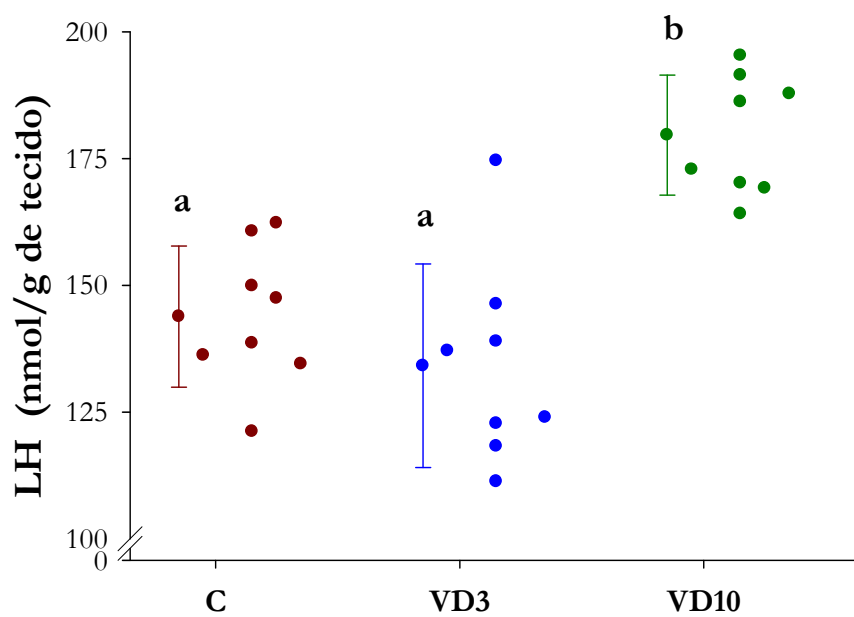


Figura 9. Hidroperóxido de lipídio.

C: grupo controle, sem suplementação de colecalciferol; VD3: grupo suplementado com 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; VD10: grupo suplementado com 10.000UI de colecalciferol/kg de ração. $P_1 < 0,001$ (valor de p ANOVA de 1 via); $P_2 < 0,001$ (valor de p para teste de tendência). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos.

5.1.4 Marcadores de apoptose e mediadores inflamatórios.

Como podemos observar na tabela 4, a expressão protéica da pró-caspase-3 não foi diferente entre os grupos estudados. Por sua vez, a expressão protéica da caspase-3-clivada foi menor no grupo VD3 comparado ao VD10. A expressão protéica da Bcl-2 foi menor no grupo suplementado com a maior dose de colecalciferol comparado aos outros grupos. Essa diminuição foi dose dependente (figura 10).

Para os marcadores inflamatórios os valores foram maiores no grupo VD10 comparado aos outros grupos, tanto para as citocinas inflamatórias, TNF- α (figura 11) e INF- γ (figura 12), como para a molécula de adesão ICAM-1 (figura 13) e citocina antiinflamatória IL-10 (figura 14). O aumento dos marcadores inflamatórios foi dose dependente (tabela 4).

Tabela 4. Marcadores de apoptose e mediadores inflamatórios.

Variável	C	VD3	VD10	P1	P2
Pró-caspase-3 (unidade arbitrária)	1,01 (0,84-1,19) (12)	0,99 (0,72-1,12) (12)	0,87 (0,56-1,22) (12)	0,697	0,339
Caspase-3-clivada (unidade arbitrária)	1,01±0,49 ^{ab} (12)	0,84±0,48 ^a (12)	1,54±0,56 ^b (12)	0,023	0,060
Bcl-2 (unidade arbitrária)	1,02±0,16 ^a (12)	0,88±0,22 ^a (12)	0,74±0,32 ^b (11)	0,027	0,008
TNF- α (pg/ mg proteína)	4,33±0,40 ^a (6)	4,52±0,29 ^a (7)	8,67±45 ^b (7)	<0,001	<0,001
INF- γ (pg/mg proteína)	7,61±0,66 ^a (6)	7,75±0,56 ^a (7)	15,0±0,86 ^b (7)	<0,001	<0,001
IL-10 (pg/mg proteína)	12,3±1,37 ^a (6)	14,8±1,45 ^a (7)	31,0±3,87 ^b (7)	<0,001	<0,001
ICAM-1(pg/mg proteína)	67,6±3,60 ^a (6)	65,8±3,48 ^a (7)	106±10,4 ^b (7)	<0,001	<0,001

Dados expressos em média \pm desvio padrão ou mediana e percentil 25 e 75, números entre parênteses indicam o número de animais em cada grupo. C: grupo controle, sem suplementação de colecalciferol; VD3: grupo suplementado com 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; VD10: grupo suplementado com 10.000UI de colecalciferol/kg de ração. Pró-caspase-3: banda inativa; Caspase-3-clivada: banda ativa; TNF- α : fator de necrose tumoral- α ; INF- γ : interferon- γ ; IL-10: interleucina-10; ICAM-1: molécula de adesão intercelular-1. P1: valor de p da ANOVA de 1 via; P2: valor de p para teste de tendência. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos.

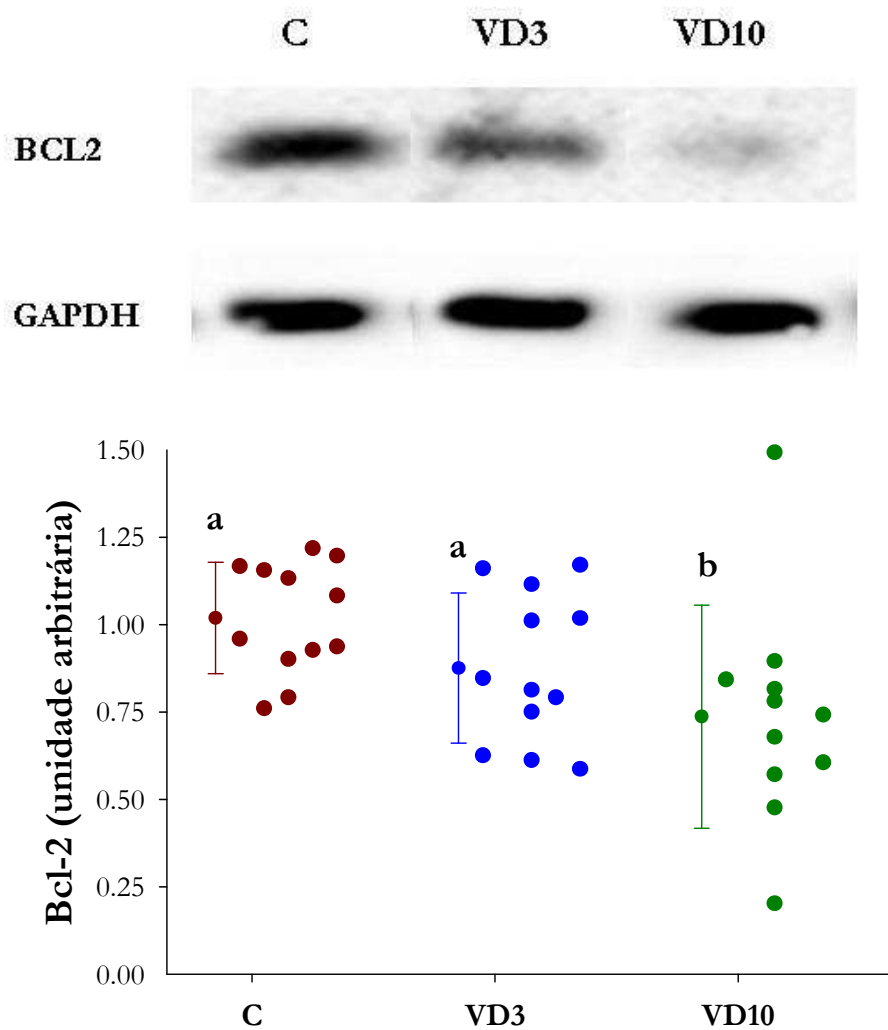


Figura 10. Expressão protéica da Bcl-2.

C: grupo controle, sem suplementação de colecalciferol; VD3: grupo suplementado com 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; VD10: grupo suplementado com 10.000UI de colecalciferol/kg de ração. P1 = 0,027 (valor de ANOVA de 1 via); P2 = 0,008 (valor de p para teste de tendência). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos.

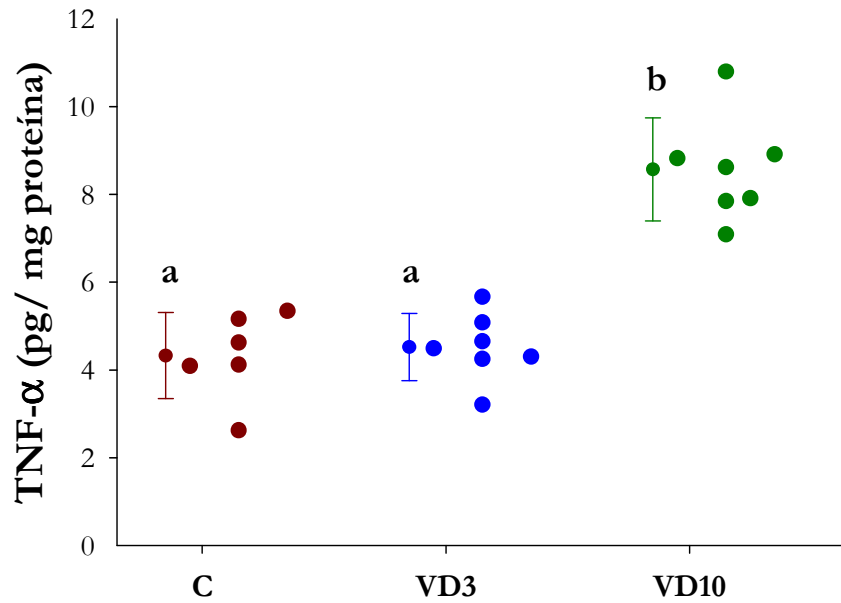


Figura 11. Fator de necrose tumoral- α .

C: grupo controle, sem suplementação de colecalciferol; VD3: grupo suplementado com 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; VD10: grupo suplementado com 10.000UI de colecalciferol/kg de ração. $P_1 < 0,001$ (valor de p ANOVA de 1 via); $P_2 < 0,001$ (valor de p para teste de tendência). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos.

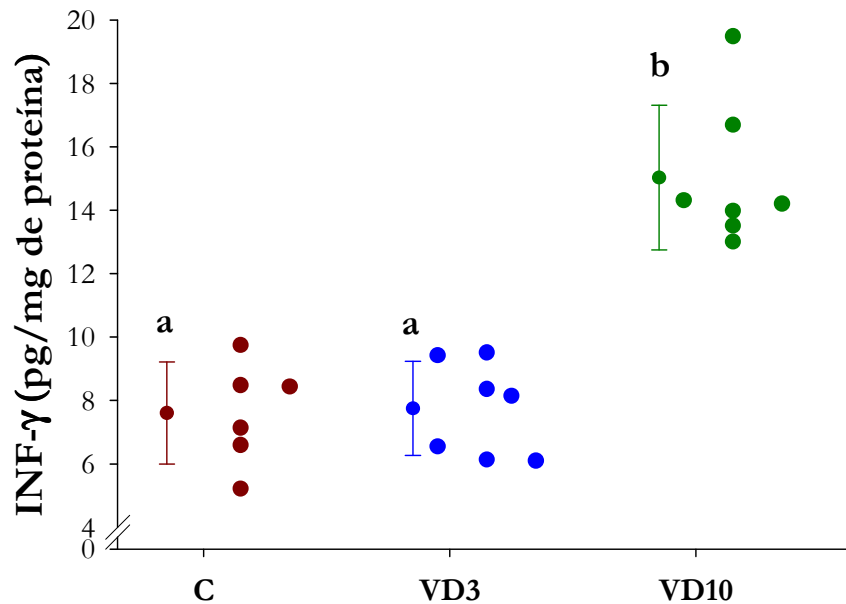


Figura 12. Interferon- γ .

C: grupo controle, sem suplementação de colecalciferol; VD3: grupo suplementado com 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; VD10: grupo suplementado com 10.000UI de colecalciferol/kg de ração. $P_1 < 0,001$ (valor de p ANOVA de 1 via); $P_2 < 0,001$ (valor de p para teste de tendência). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos.

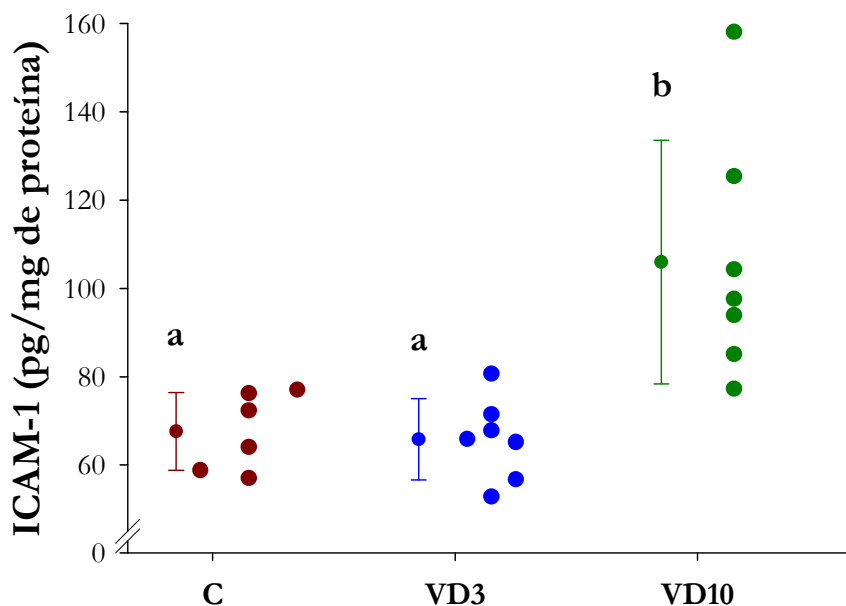


Figura 13. Molécula de adesão intercelular-1

C: grupo controle, sem suplementação de colecalciferol; VD3: grupo suplementado com 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; VD10: grupo suplementado com 10.000UI de colecalciferol/kg de ração. $P1 < 0,001$ (valor de p ANOVA de 1 via); $P2 < 0,001$ (valor de p para teste de tendência). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos.

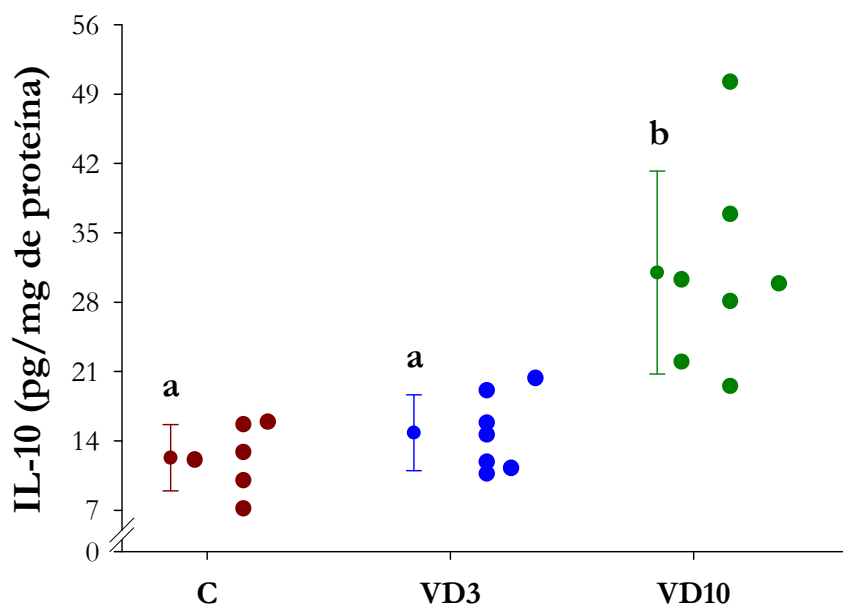


Figura 14. Interleucina-10

C: grupo controle, sem suplementação de colecalciferol; VD3: grupo suplementado com 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; VD10: grupo suplementado com 10.000UI de colecalciferol/kg de ração. $P1 < 0,001$ (valor de p ANOVA de 1 via); $P2 < 0,001$ (valor de p para teste de tendência). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos.

5.1.5 Metabolismo energético cardíaco

Os dados referentes aos marcadores do metabolismo energético cardíaco estão apresentados na tabela 5. A expressão protéica do PGC-1 α foi menor no grupo VD10 comparado ao C. A diminuição na sua expressão protéica foi dose dependente (figura 15). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos para a expressão do PPAR α .

A atividade da enzima PFK (figura 16) e da ATP sintase apresentou diferença entre os grupos, porém o teste de comparações múltiplas de Tukey não conseguiu mostrar quais grupos eram diferentes entre si. A atividade da enzima PDH (figura 17) apresentou um aumento dose dependente. Para as enzimas CS (figura 18), Complexo II (figura 19) e OHADH (figura 20), a atividades foi menor no grupo VD10 comparado aos outros grupos e todas apresentaram uma diminuição dose dependente. A atividade da enzima LDH foi maior no grupo suplementado com a maior dose de colecalciferol, quando comparado aos outros grupos. O aumento na atividade da LDH foi dose dependente (figura 21).

Tabela 5. Metabolismo energético cardíaco.

Variável	C	VD3	VD10	P1	P2
PGC-1 α (unidade arbitrária)	1,03 \pm 0,18 ^a (12)	0,91 \pm 0,17 ^{ab} (12)	0,76 \pm 0,21 ^b (11)	0,006	0,002
PPAR α (unidade arbitrária)	1,06 \pm 0,40 (12)	0,87 \pm 0,44 (12)	0,95 \pm 0,50 (11)	0,593	0,562
PFK (nmol/g de tecido)	131 \pm 23,6 ^a (6)	123 \pm 34,8 ^a (6)	170 \pm 36,4 ^a (6)	0,048	0,053
PDH (nmol/g de tecido)	317 \pm 57,9 (6)	337 \pm 42,9 (6)	382 \pm 41,6 (6)	0,088	0,034
CS (umol/g de tecido)	39,7 \pm 3,22 ^a (8)	40,4 \pm 2,75 ^a (8)	34,5 \pm 4,02 ^b (8)	0,004	0,005
Complexo II (umol/mg de tecido)	6,36 \pm 0,90 ^a (6)	6,27 \pm 1,18 ^a (6)	3,40 \pm 0,67 ^b (6)	<0,001	<0,001
ATP sintase (umol/mg de tecido)	45,4 \pm 2,96 ^a (6)	53,0 \pm 5,42 ^a (6)	44,6 \pm 8,04 ^a (6)	0,049	0,824
OHADH (nmol/mg de proteína)	69,9 \pm 10,8 ^a (8)	65,8 \pm 13,1 ^a (8)	34,4 \pm 5,14 ^b (8)	<0,001	<0,001
LDH (nmol/mg de proteína)	220 \pm 18,1 ^a (8)	209 \pm 10,0 ^a (8)	256 \pm 9,60 ^b (8)	<0,001	<0,001

Dados expressos em média \pm desvio padrão, números entre parênteses indicam o número de animais em cada grupo. C: grupo controle, sem suplementação de colecalciferol; VD3: grupo suplementado com 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; VD10: grupo suplementado com 10.000UI de colecalciferol/kg de ração. PGC-1 α : coativador-1 α do receptor ativado por proliferadores de peroxissomay; PPAR α : receptor ativado por proliferadores de peroxissomax; PFK: fosfofrutoquinase; PDH: complexo piruvato desidrogenase; CS: citrato sintase; Complex II: complexo respiratório II (succinato desidrogenase); ATP sintase: Adenosine trifosfate sintase; OHADH: 3-hidroxiacil coenzyme A desidrogenase; LDH: lactato desidrogenase. P1: valor de p da ANOVA de 1 via; P2: valor de p para teste de tendência. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos.

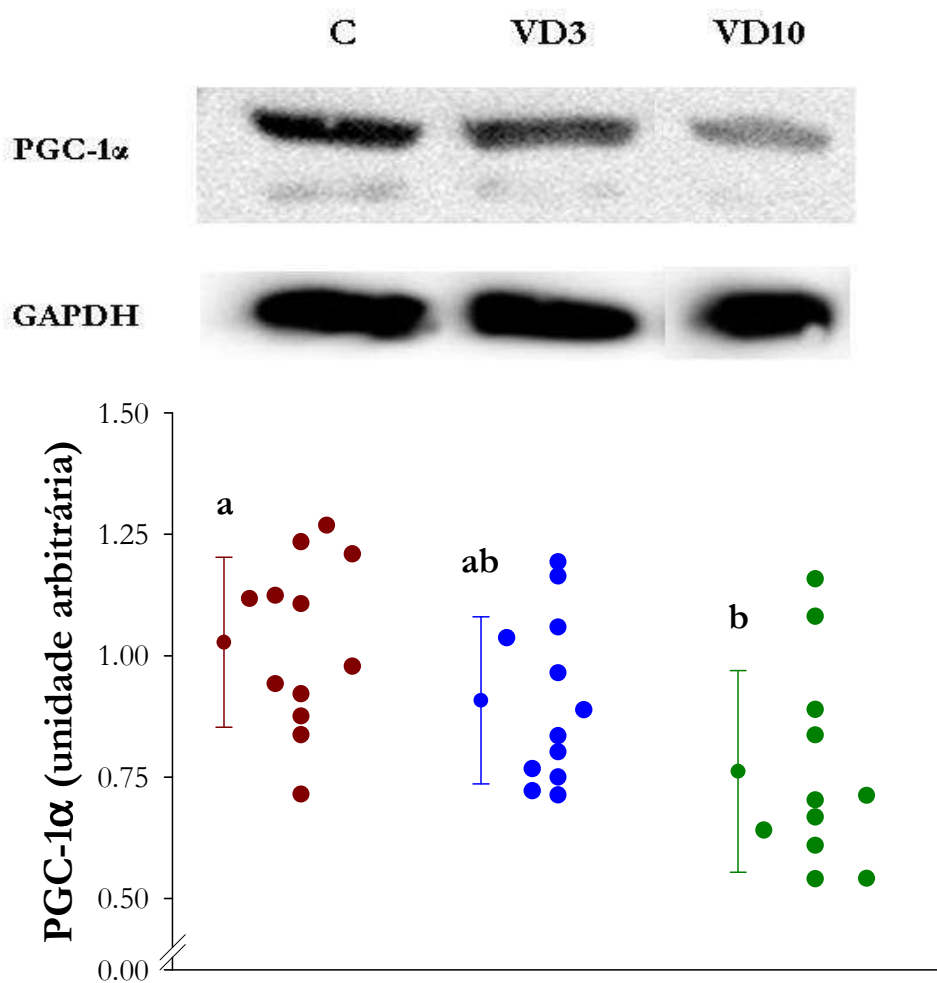


Figura 15. Expressão protéica do coativador-1 α do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma γ .

C: grupo controle, sem suplementação de colecalciferol; VD3: grupo suplementado com 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; VD10: grupo suplementado com 10.000UI de colecalciferol/kg de ração. P1= 0,006 (valor de p ANOVA de 1 via); P2 = 0,002 (valor de p para teste de tendência). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos.

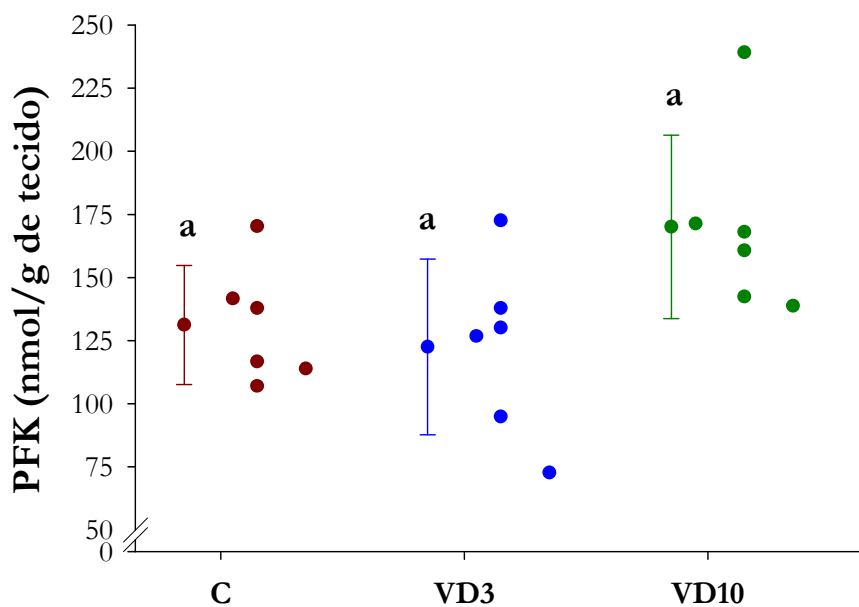


Figura 16. Atividade da enzima fosfofrutoquinase.

C: grupo controle, sem suplementação de colecalciferol; VD3: grupo suplementado com 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; VD10: grupo suplementado com 10.000UI de colecalciferol/kg de ração. P1= 0,048 (valor de p ANOVA de 1 via); P2 = 0,053 (valor de p para teste de tendência).

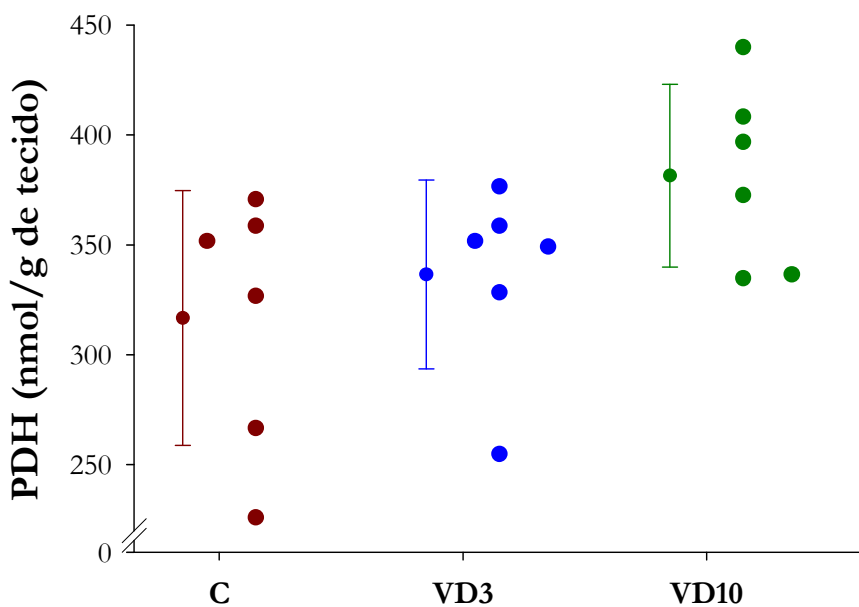


Figura 17. Atividade do complexo piruvato desidrogenase.

C: grupo controle, sem suplementação de colecalciferol; VD3: grupo suplementado com 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; VD10: grupo suplementado com 10.000UI de colecalciferol/kg de ração. P1= 0,088 (valor de p ANOVA de 1 via); P2 = 0,034 (valor de p para teste de tendência).

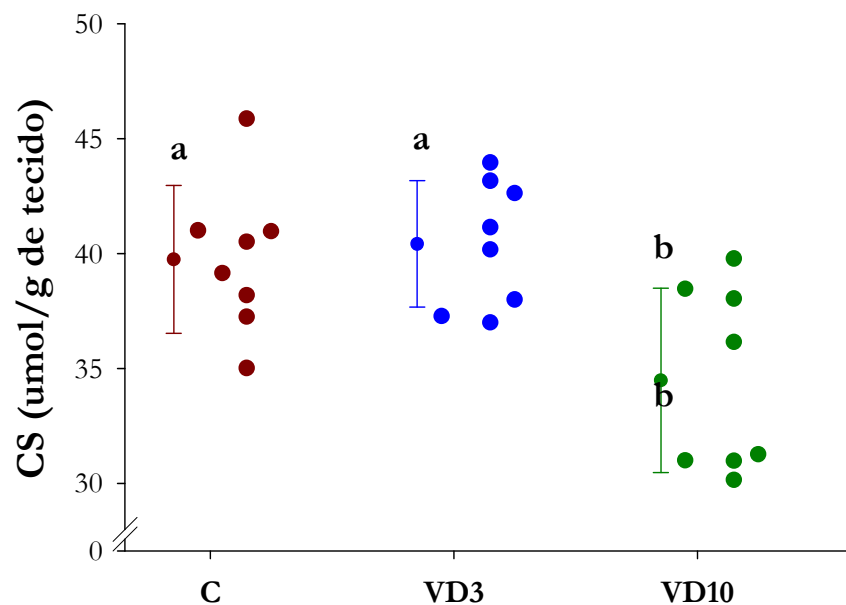


Figura 18. Atividade da enzima citrato sintase.

C: grupo controle, sem suplementação de colecalciferol; VD3: grupo suplementado com 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; VD10: grupo suplementado com 10.000UI de colecalciferol/kg de ração. P1= 0,004 (valor de p ANOVA de 1 via); P2 = 0,005 (valor de p para teste de tendência). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos.

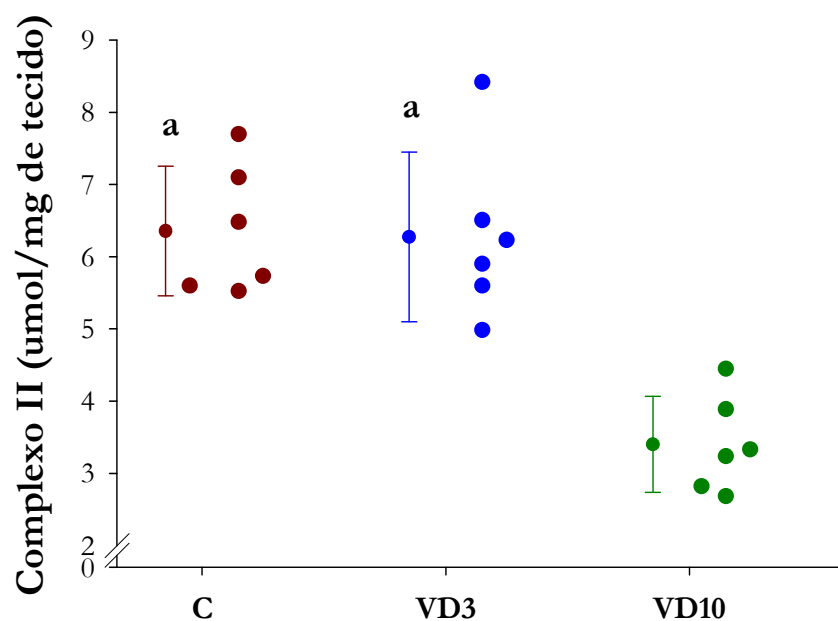


Figura 19. Atividade do complexo respiratório II.

C: grupo controle, sem suplementação de colecalciferol; VD3: grupo suplementado com 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; VD10: grupo suplementado com 10.000UI de colecalciferol/kg de ração. P1 < 0,001 (valor de p ANOVA de 1 via); P2 < 0,001 (valor de p para teste de tendência). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos.

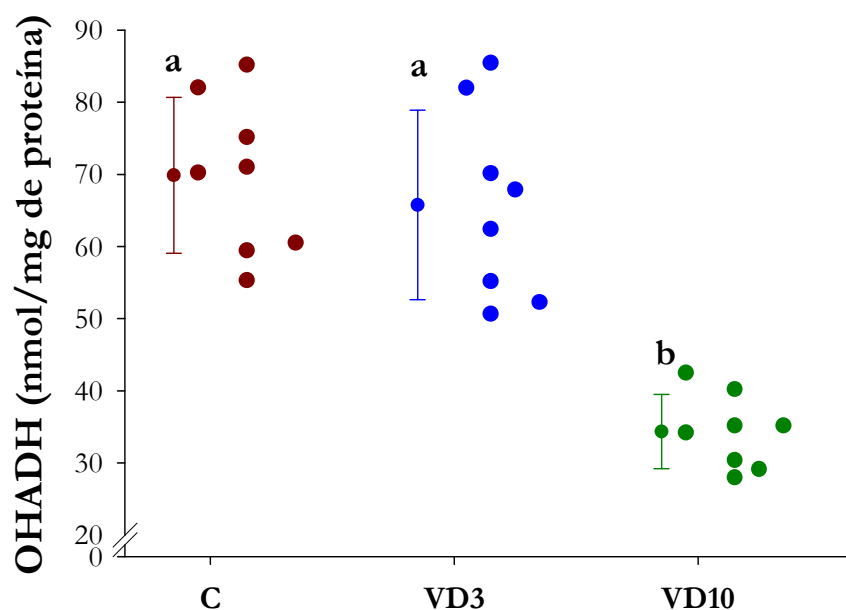


Figura 20. Atividade da enzima 3-hidroxiacil coenzyme A desidrogenase.

C: grupo controle, sem suplementação de colexiferol; VD3: grupo suplementado com 3.000UI de colexiferol/kg de ração; VD10: grupo suplementado com 10.000UI de colexiferol/kg de ração. $P_1 < 0,001$ (valor de p ANOVA de 1 via); $P_2 < 0,001$ (valor de p para teste de tendência). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos.

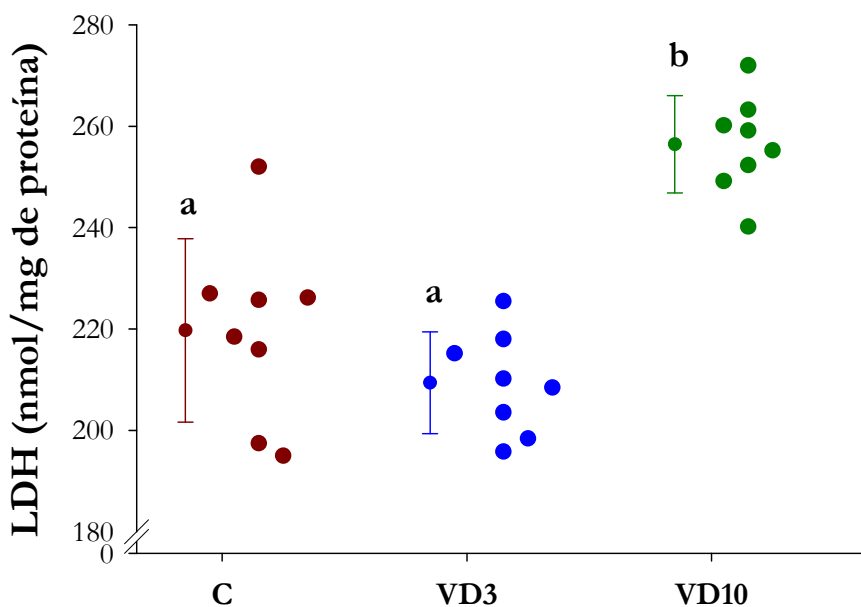


Figura 21. Atividade do complexo respiratório II.

C: grupo controle, sem suplementação de colexiferol; VD3: grupo suplementado com 3.000UI de colexiferol/kg de ração; VD10: grupo suplementado com 10.000UI de colexiferol/kg de ração. $P_1 < 0,001$ (valor de p ANOVA de 1 via); $P_2 < 0,001$ (valor de p para teste de tendência). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos.

5.1.6 Variáveis ecocardiográficas de morfologia e função

Os dados relativos às análises ecocardiográficas estão apresentados nas tabelas 6 e 7. Considerando os dados morfológicos, não houve diferença estatisticamente significativa nas variáveis quando os 3 grupos foram comparados. Para as variáveis de função, apenas a frequência cardíaca foi maior no grupo VD10 comparado ao controle. As demais variáveis de função sistólica e diastólica não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Tabela 6. Variáveis ecocardiográficas de morfologia do Experimento 1.

Variável	C (n=21)	VD3 (n=22)	VD10 (n=21)	P1	P2
AE (mm)	4,19±0,50	4,26±0,65	4,01±0,52	0,346	0,323
AE/PC (mm/kg)	9,92±1,05	9,94±1,49	9,57±1,39	0,602	0,407
AE/AO	1,14 (1,07-1,22)	1,23 (1,09-1,36)	1,19 (1,13-1,22)	0,378	0,758
Área AE (cm ²)	0,22±0,05	0,24±0,05	0,22±0,03	0,306	0,972
Área AE/PC (cm ² /kg)	0,53±0,11	0,56±0,11	0,53±0,08	0,464	0,960
DDVE (mm)	7,22±0,52	7,30±0,58	7,31±0,47	0,837	0,581
DDVE/PC (mm/kg)	17,1±1,41	17,1±1,68	17,4±1,33	0,730	0,557
DSVE (mm)	3,00±0,65	3,11±0,58	3,12±0,52	0,764	0,507
EPP (mm)	1,35±0,16	1,41±0,24	1,44±0,19	0,366	0,163
ERPP	0,37 (0,35-0,40)	0,39 (0,35-0,44)	0,41 (0,37-0,43)	0,334	0,155

Dados expressos em média \pm desvio padrão ou mediana e percentil 25 e 75, n: número de animais em cada grupo. C: grupo controle, sem suplementação de colecalciferol; VD3: grupo suplementado com 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; VD10: grupo suplementado com 10.000UI de colecalciferol /kg de ração. AE: diâmetro do átrio esquerdo; PC: peso corporal; DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo; DSVE: diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo; EPP: espessura da parede posterior; RPP: espessura relativa da parede posterior. P1: valor de p da ANOVA de 1 via ou Kruskal Wallis; P2: valor de p para teste de tendência.

Tabela 7. Variáveis ecocardiográficas de função do Experimento 1.

Variável	C (n=21)	VD3 (n=22)	VD10 (n=21)	P1	P2
FC (bpm)	303 (284-333) ^a	292 (274-313) ^{ab}	282 (263-293) ^b	0,024	0,006
DC (ml/min)	76,9 (69,3-97,3)	76,5 (64,4-85,6)	82,0 (73,8-90,3)	0,463	0,549
IC (ml/min/g)	0,20±0,05	0,18±0,05	0,20±0,05	0,341	0,931
FE	0,92±0,04	0,92±0,03	0,92±0,04	0,949	0,750
Enc (%)	58,5±8,29	57,6±6,21	57,4±6,83	0,855	0,596
Onda E (cm/s)	84,0 (76,3-90,0)	84,0 (78,0-89,0)	84,0 (74,3-89,3)	0,953	0,824
Onda A (cm/s)	57,8±11,3	53,9±10,4	56,3±13,3	0,556	0,681
E/A	1,45 (1,31-1,59)	1,57 (1,39-1,68)	1,47 (1,22-1,80)	0,284	0,737
TRIV/R-R	49,7 (44,5-58,0)	51,0 (46,7-57,4)	52,4 (49,9-59,8)	0,514	0,252
TDE (ms)	50,1±7,57	49,8±5,65	49,8±6,29	0,988	0,887

Dados expressos em média ± desvio padrão ou mediana e percentil 25 e 75, n: números de animais em cada grupo. C: grupo controle, sem suplementação de colecalciferol; VD3: grupo suplementado com 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; VD10: grupo suplementado com 10.000UI de colecalciferol/kg de ração. FC: frequência cardíaca; DC: débito cardíaco; IC: índice cardíaco; FE: fração de ejeção; Enc: porcentagem de encurtamento; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico; TRIV/R-R: TRIV normalizado para a frequência cardíaca (TRIV dividido pela raiz quadrada do R-R); TDE: tempo de desaceleração da onda E. P1: valor de p da ANOVA de 1 via ou Kruskal Wallis; P2: valor de p para teste de tendência. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos.

5.1.7 Variáveis morfométricas

Os dados relativos às variáveis morfométricas estão apresentados na tabela 8. Como podemos observar não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, para nenhuma das variáveis analisadas.

Tabela 8. Variáveis morfométricas do Experimento 1

Variável	C (n=21)	VD3 (n=22)	VD10 (n=21)	P1	P2
PVE (mg)	838±80,8	823±85,4	843±90,9	0,743	0,846
PVE/PC (mg/g)	1,97±0,15	1,92±0,13	2,01± 0,19	0,160	0,435
PVD (mg)	223±36,0	231±36,3	231±35,4	0,733	0,499
PVD/PC (mg/g)	0,53±0,07	0,54±0,06	0,55±0,06	0,599	0,325
PA (mg)	35,5±12,5	43,2±13,3	40,6±14,2	0,188	0,235
PA/PC (mg/g)	0,084±0,029	0,101±0,033	0,097±0,034	0,230	0,215

Dados expressos em média \pm desvio padrão, n: números de animais em cada grupo. C: grupo controle, sem suplementação de colecalciferol; VD3: grupo suplementado com 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; VD10: grupo suplementado com 10.000UI de colecalciferol/kg de ração. PVE: peso do ventrículo esquerdo; PC: peso corporal; PVD: peso do ventrículo direito; PA: peso dos átrios. P1: valor de p da ANOVA de 1 via; P2: valor de p para teste de tendência.

5.2 Experimento 2

5.2.1 Variáveis ecocardiográficas de morfologia e função do experimento 2

Como podemos observar na tabela 9, não houve diferença estatisticamente significativa para o PC entre os grupos estudados. Com relação às variáveis ecocardiográficas de morfologia, houve maiores valores do AE (figura 22), tanto em valores absolutos como normalizado pelo Ao (figura 23) nos grupos suplementados com colecalciferol, quando comparados ao C-4. O aumento do AE e do AE/ Ao foi dose dependente. O AE normalizado pelo PC foi maior apenas no grupo VD3-4 comparado ao C-4. O vol AE em valores absolutos (figura 24) e normalizado pelo PC (figura 25) foi maior no grupo VD10-4 comparado ao C-4 e seu aumento foi dose dependente. Para a EPP (figura 26) e ERPP (figura 27), os valores foram maiores nos grupos suplementados com colecalciferol quando comparados ao C-4. O aumento de ambas as variáveis foi dose dependente. Para as demais variáveis de morfologia não houve diferença entre os grupos.

Com relação às variáveis ecocardiográficas de função, apresentadas da tabela 10, não houve diferença estatisticamente significativa para as variáveis de função sistólica FC, DC, IC, FE, Enc. Para as variáveis de função diastólica, o TDE apresentou menores valores no grupo VD10-4 quando comparado ao VD3-4 (figura 28). A onda E tricúspide (figura 29) apresentou uma diminuição dose dependente. A razão entre as ondas E e A tricúspide foi menor no grupo VD10-4 comparado ao C-4, sendo sua diminuição dose dependente (figura 30). Para as demais variáveis de função diastólica, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. A tabela 11 apresenta os dados ecocardiográficos avaliados por doppler tissular. A razão E/E' tricúspide apresentou uma diminuição dose dependente. Para as demais variáveis de função, avaliadas pelo doppler tissular, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Tabela 9. Variáveis ecocardiográficas de morfologia do Experimento 2.

Variável	C-4 (n=14)	VD3-4 (n=16)	VD10-4 (n=16)	P1	P2
PC (g)	435 (388-466)	455 (410-467)	427 (405-447)	0,510	0,472
AE (mm)	3,80 (3,30-4,00) ^a	5,00 (4,40-5,20) ^b	4,45 (4,20-4,60) ^b	<0,001	0,006
AE/PC (mm/kg)	8,90 (7,57-11,04) ^a	11,04 (9,57-12,30) ^b	10,30 (9,84-10,79) ^{ab}	0,023	0,053
AE/Ao	1,10±0,15 ^a	1,36±0,20 ^b	1,29±0,17 ^b	<0,001	0,004
Vol AE (cm ³)	0,053 (0,057-0,060) ^a	0,067 (0,051-0,073) ^{ab}	0,073 (0,060-0,089) ^b	0,002	<0,001
Vol AE/PC (cm ³ /kg)	0,12 (0,11-0,14) ^a	0,14 (0,13-0,16) ^{ab}	0,18 (0,15-0,22) ^b	0,002	<0,001
DDVE (mm)	7,23±0,15	6,98±0,14	7,05±0,14	0,482	0,405
DDVE/PC (mm/kg)	16,8 (15,6-17,5)	15,8 (15,4-16,7)	16,5 (15,7-17,2)	0,241	0,902
DSVE (mm)	3,35 (3,10-3,60)	3,30 (3,20-3,60)	3,45 (3,10-4,00)	0,923	0,782
EPP (mm)	1,30 (1,30-1,50) ^a	1,80 (1,75-2,00) ^b	1,80 (1,65-1,80) ^b	<0,001	<0,001
ERPP	0,39±0,001 ^a	0,52±0,02 ^b	0,50±0,02 ^b	<0,001	<0,001

Dados expressos em média ± desvio padrão ou mediana e percentil 25 e 75, n: número de animais em cada grupo. C: grupo controle, sem suplementação de colecalciferol; VD3: grupo suplementado com 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; VD10: grupo suplementado com 10.000UI de colecalciferol /kg de ração. AE: diâmetro do átrio esquerdo; PC: peso corporal; DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo; DSVE: diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo; EPP: espessura da parede posterior; RPP: espessura relativa da parede posterior. P1: valor de p da ANOVA de 1 via ou Kruskal Wallis; P2: valor de p para teste de tendência. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos.

Tabela 10. Variáveis ecocardiográficas de função do Experimento 2.

Variável	C-4 (n=14)	VD3-4 (n=16)	VD10-4 (n=16)	P1	P2
FC (bpm)	274±9,06	282±8,48	275±8,48	0,776	0,959
DC (ml/min)	94,6±5,88	97,7±5,50	97,5±5,50	0,934	0,757
IC (ml/min/g)	0,20 (0,19-0,26)	0,22 (0,20-0,25)	0,20 (0,18-0,29)	0,835	0,969
FE	0,90 (0,87-0,92)	0,89 (0,87-0,91)	0,88 (0,84-0,90)	0,465	0,219
Enc (%)	53,2 (49,3-56,3)	52,6 (49,3-55,0)	50,4 (46,2-53,9)	0,465	0,219
Onda E mitral (cm/s)	83,5 (79,0-89,0)	79,0 (76,0-85,5)	82,5 (68,5-88,0)	0,638	0,456
Onda A mitral (cm/s)	53,5 (45,0-60,0)	45,5 (41,0-52,0)	54,5 (45,5-57,5)	0,261	0,864
E/A mitral	1,59±0,100	1,69±0,094	1,490,094	0,440	0,525
TRIV/R-R*	57,3 (47,0-63,4)	57,6 (45,9-64,3)	63,2 (56,2-65,4)	0,388	0,224
TDE (ms)**	56,2±2,30 ^{ab}	63,9±2,75 ^a	50,8±2,57 ^b	0,026	0,197
Onda E tricúspide (cm/s)	40,5 (29,0-48,0)	32,0 (29,5-37,5)	30,5 (25,0-36,5)	0,078	0,026
Onda A tricúspide (cm/s)	50,0±14,0	51,2±14,9	56,1±9,9	0,394	0,207
E/A tricúspide	0,67 (0,57-1,28) ^a	0,58 (0,52-0,71) ^{ab}	0,53 (0,47-0,60) ^b	0,028	0,006

Dados expressos em média ± desvio padrão ou mediana e percentil 25 e 75, n: números de animais em cada grupo. C: grupo controle, sem suplementação de colecalciferol; VD3: grupo suplementado com 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; VD10: grupo suplementado com 10.000UI de colecalciferol/kg de ração. FC: frequência cardíaca; DC: débito cardíaco; IC: índice cardíaco; FE: fração de ejeção; Enc: porcentagem de encurtamento; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico; TRIV/R-R: TRIV normalizado para a frequência cardíaca (TRIV dividido pela raiz quadrada do R-R); TDE: tempo de desaceleração da onda E mitral. P1: valor de p da ANOVA de 1 via ou Kruskal Wallis; P2: valor de p para teste de tendência. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos. * para o TRIV/R-R o número de animais por grupo é de: C-4=13; VD3-4=12; VD10-4=14. ** para o TDE o número de animais por grupo é de: C-4=10; VD3-4=7; VD10-4=8.

Tabela 11. Variáveis ecocardiográficas de função por doppler tissular do Experimento 2.

Variável	C-4 (n=14)	VD3-4 (n=16)	VD10-4 (n=16)	P1	P2
Onda A` mitral (cm/s)	4,5 (4,0-6,0)	5,0 (4,0-6,7)	5,2 (5,0-5,8)	0,420	0,204
Onda E` mitral (cm/s)	4,0 (4,0-5,0)	5,0 (4,0-5,4)	4,0 (3,8-4,9)	0,129	0,378
Onda S` mitral (cm/s)	5,52±1,11	5,36±0,72	5,11±0,64	0,408	0,188
Onda A` tricúspide (cm/s)	4,26±1,17	4,31±1,38	4,56±1,81	0,837	0,529
Onda E` tricúspide (cm/s)	4,00 (3,00-4,00)	4,00 (3,25-4,45)	4,05 (3,30-5,00)	0,698	0,415
Onda S` tricúspide (cm/s)	5,11±1,04	4,72±0,88	5,46±0,58	0,055	0,257
E'/A' mitral	0,81 (0,75-1,33)	0,87 (0,69-1,49)	0,78 (0,65-0,86)	0,217	0,134
E'/A'tricúspide	0,90 (0,75-1,25)	0,64 (0,63-1,33)	0,78 (0,64-1,71)	0,941	0,917
E/E' mitral	18,9±5,29	16,1±3,45	18,9±4,59	0,147	0,995
E/E' tricúspide	10,6±3,33	8,8±3,13	8,0±2,62	0,071	0,025

Dados expressos em média \pm desvio padrão ou mediana e percentil 25 e 75, n: números de animais em cada grupo. C: grupo controle, sem suplementação de colecalciferol; VD3: grupo suplementado com 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; VD10: grupo suplementado com 10.000UI de colecalciferol/kg de ração. Onda A' mitral: deslocamento diastólico tardio do anel mitral; Onda E'mitral: pico de velocidade de deslocamento diastólico inicial do anel mitral; Onda S'mitral: velocidade máxima de deslocamento sistólico do anel mitral; Onda A'tricúspide: deslocamento diastólico tardio do anel tricúspide; Onda E'tricúspide: pico de velocidade de deslocamento diastólico inicial do anel tricúspide; Onda S'tricúspide: velocidade máxima de deslocamento sistólico do anel tricúspide. P1: valor de p da ANOVA de 1 via ou Kruskal Wallis; P2: valor de p para teste de tendência.

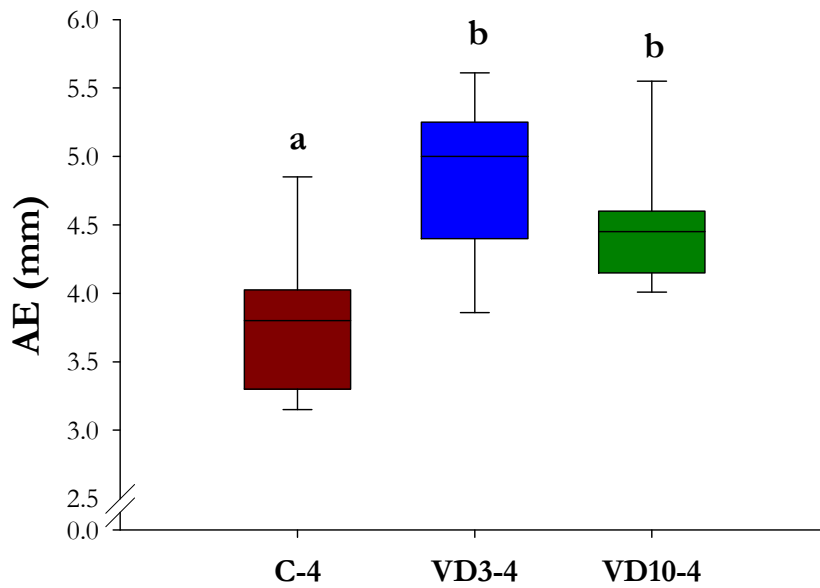


Figura 22. Diâmetro do átrio esquerdo.

C-4: grupo controle, sem suplementação de colecalciferol; VD3-4: grupo suplementado com 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; VD10-4: grupo suplementado com 10.000UI de colecalciferol/kg de ração. $P_1 < 0,001$ (valor de p ANOVA de 1 via); $P_2 = 0,006$ (valor de p para teste de tendência). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos.

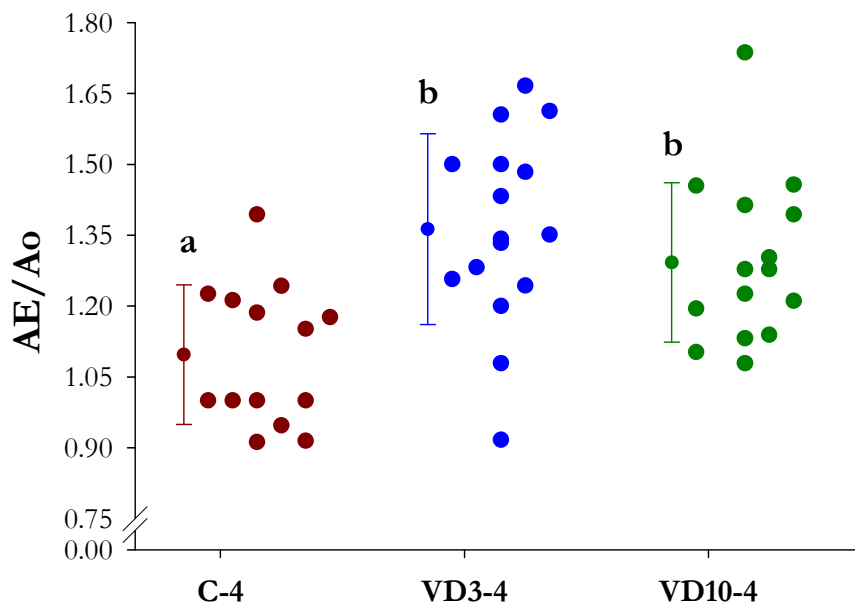


Figura 23. Diâmetro do átrio esquerdo normalizado pelo diâmetro da aorta.

C-4: grupo controle, sem suplementação de colecalciferol; VD3-4: grupo suplementado com 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; VD10-4: grupo suplementado com 10.000UI de colecalciferol/kg de ração. $P_1 < 0,001$ (valor de p ANOVA de 1 via); $P_2 = 0,004$ (valor de p para teste de tendência). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos.

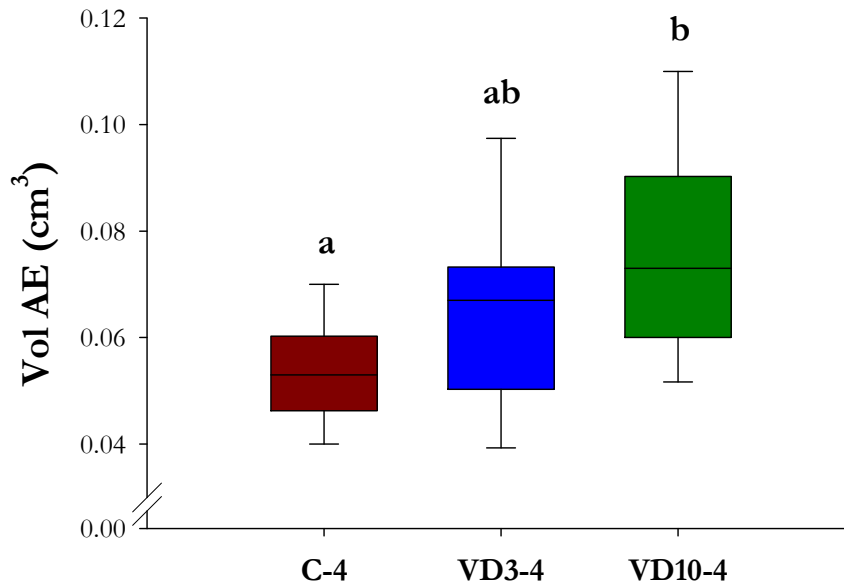


Figura 24. Volume do átrio esquerdo.

C-4: grupo controle, sem suplementação de colecalciferol; VD3-4: grupo suplementado com 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; VD10-4: grupo suplementado com 10.000UI de colecalciferol/kg de ração. P1= 0,002 (valor de p ANOVA de 1 via); P2 < 0,001 (valor de p para teste de tendência). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos.

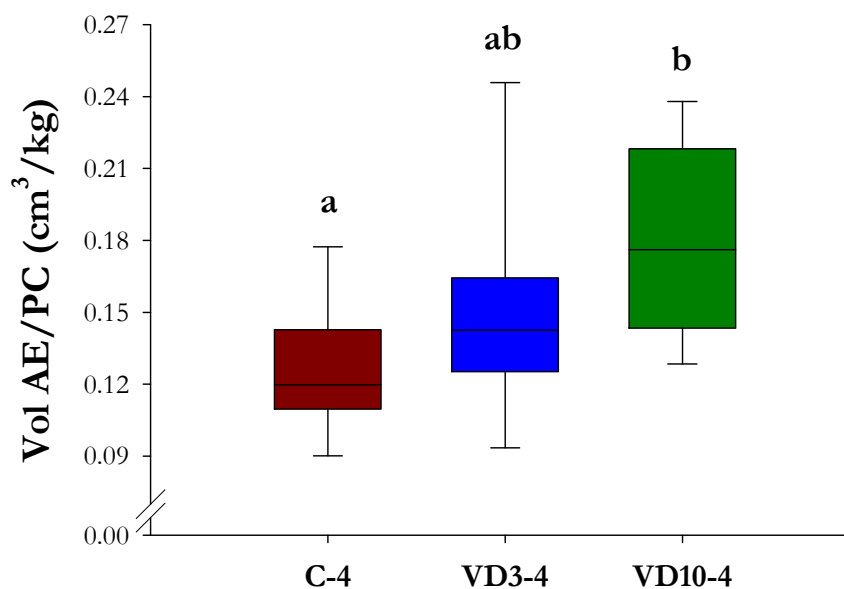


Figura 25. Volume do átrio esquerdo normalizado pelo peso corporal.

C-4: grupo controle, sem suplementação de colecalciferol; VD3-4: grupo suplementado com 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; VD10-4: grupo suplementado com 10.000UI de colecalciferol/kg de ração. P1= 0,002 (valor de p ANOVA de 1 via); P2 < 0,001 (valor de p para teste de tendência). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos.

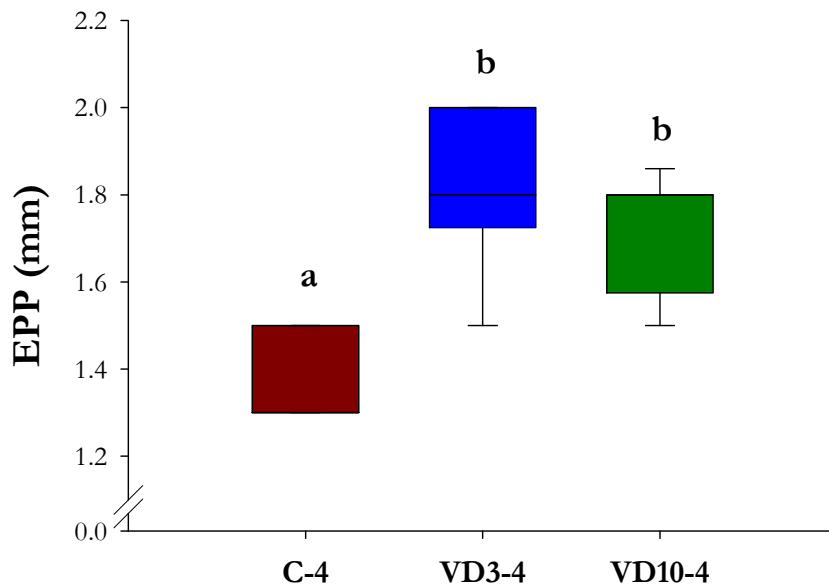


Figura 26. Espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo.

C-4: grupo controle, sem suplementação de colecalciferol; VD3-4: grupo suplementado com 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; VD10-4: grupo suplementado com 10.000UI de colecalciferol/kg de ração. $P_1 < 0,001$ (valor de p ANOVA de 1 via); $P_2 < 0,001$ (valor de p para teste de tendência). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos.

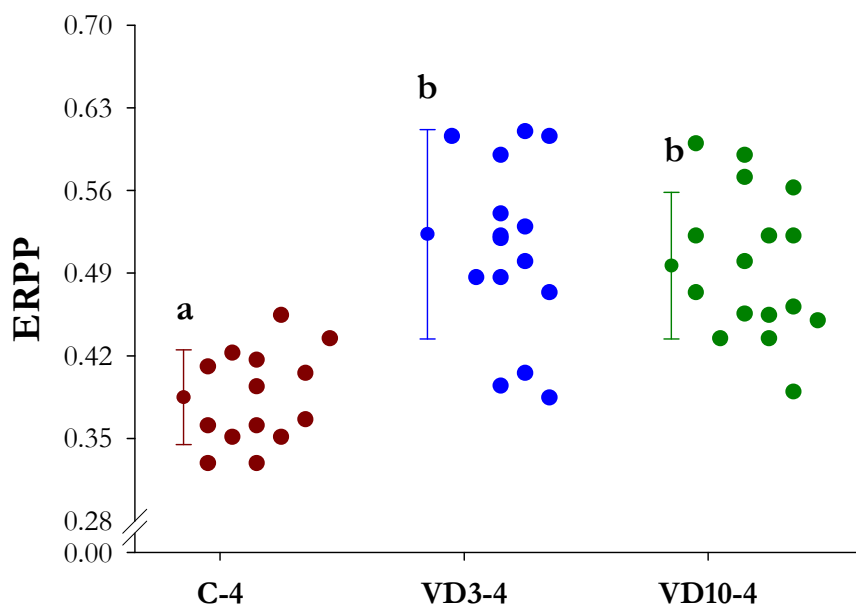


Figura 27. Espessura relativa da parede posterior do ventrículo esquerdo.

C-4: grupo controle, sem suplementação de colecalciferol; VD3-4: grupo suplementado com 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; VD10-4: grupo suplementado com 10.000UI de colecalciferol/kg de ração. $P_1 < 0,001$ (valor de p ANOVA de 1 via); $P_2 < 0,001$ (valor de p para teste de tendência). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos.

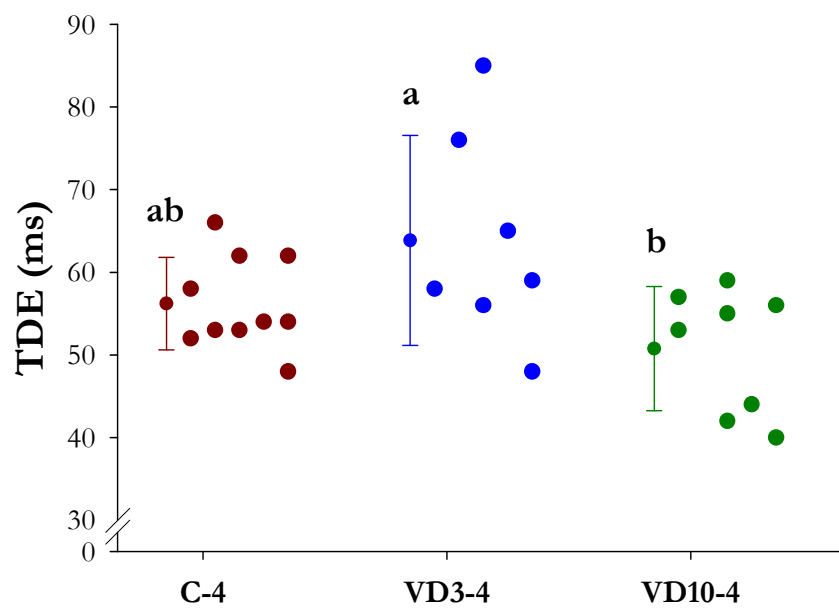


Figura 28. Tempo de desaceleração da onda E mitral.

C-4: grupo controle, sem suplementação de colecalciferol; VD3-4: grupo suplementado com 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; VD10-4: grupo suplementado com 10.000UI de colecalciferol/kg de ração. P1= 0,026 (valor de p ANOVA de 1 via); P2 = 0,197 (valor de p para teste de tendência). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos.

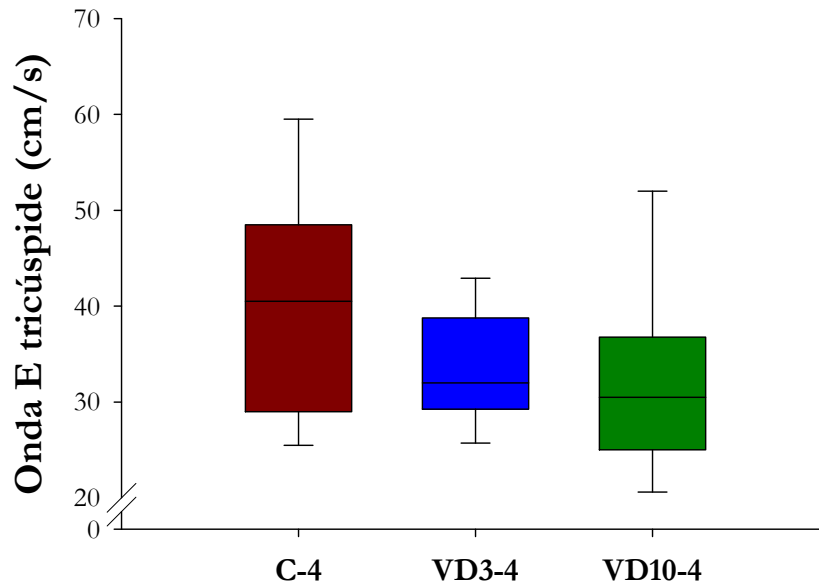


Figura 29. Onda E tricúspide.

C-4: grupo controle, sem suplementação de colecalciferol; VD3-4: grupo suplementado com 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; VD10-4: grupo suplementado com 10.000UI de colecalciferol/kg de ração. P1= 0,078 (valor de p ANOVA de 1 via); P2 = 0,026 (valor de p para teste de tendência).

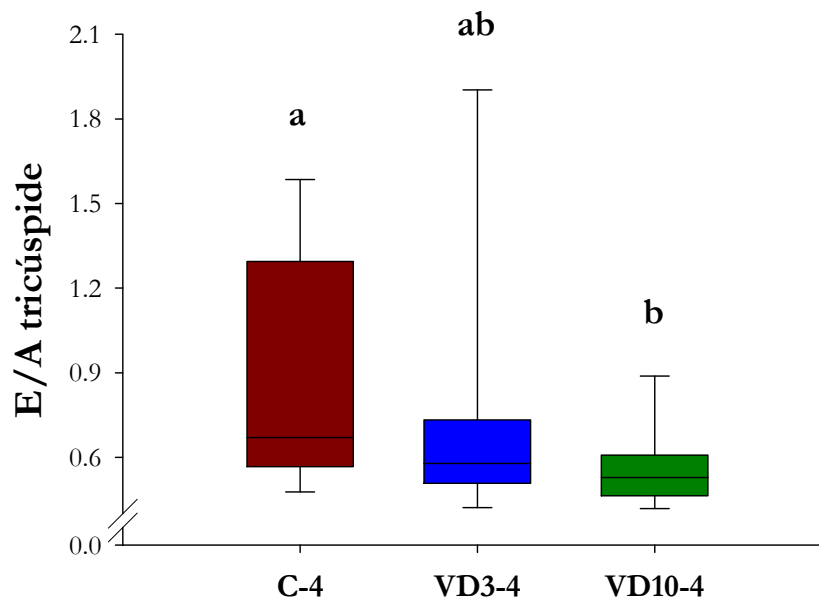


Figura 30. Onda E tricúspide/Onda A tricúspide.

C-4: grupo controle, sem suplementação de colecalciferol; VD3-4: grupo suplementado com 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; VD10-4: grupo suplementado com 10.000UI de colecalciferol/kg de ração. P1= 0,028 (valor de p ANOVA de 1 via); P2 = 0,006 (valor de p para teste de tendência). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos.

5.2.2 Variáveis morfométricas

Os dados relativos às variáveis morfométricas estão apresentados na tabela 12. Como podemos observar não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, para as variáveis PVE em valores absolutos e normalizado pelo PC, nem para a variável PVD. As variáveis PVD/PC (figura 31), PA (figura 32) e PA/PC (figura 33) foram maiores no grupo VD10-4 comparado ao C-4. Além disso, o aumento dessas variáveis foi dose dependente.

Tabela 12. Variáveis morfométricas do Experimento 2

Variável	C-4 (n=14)	VD3-4 (n=16)	VD10-4 (n=16)	P1	P2
PVE (mg)	808±108	830±101	820±80	0,821	0,735
PVE/PC (mg/g)	1,97±0,15	1,92±0,13	2,01± 0,19	0,160	0,240
PVD (mg)	196±30,4	202±17,4	210±22,7	0,249	0,101
PVD/PC (mg/g)	0,455±0,033 ^a	0,462±0,034 ^{ab}	0,496±0,050 ^b	0,014	0,007
PA (mg)	35,6±7,39 ^a	40,1±9,10 ^{ab}	45,0±9,53 ^b	0,020	0,005
PA/PC (mg/g)	0,083±0,016 ^a	0,092±0,019 ^{ab}	0,106±0,021 ^b	0,006	0,002

Dados expressos em média ± desvio padrão, n: números de animais em cada grupo. C: grupo controle, sem suplementação de colecalciferol; VD3: grupo suplementado com 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; VD10: grupo suplementado com 10.000UI de colecalciferol/kg de ração. PVE: peso do ventrículo esquerdo; PC: peso corporal; PVD: peso do ventrículo direito; PA: peso dos átrios. P1: valor de p da ANOVA de 1 via; P2: valor de p para teste de tendência. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos.

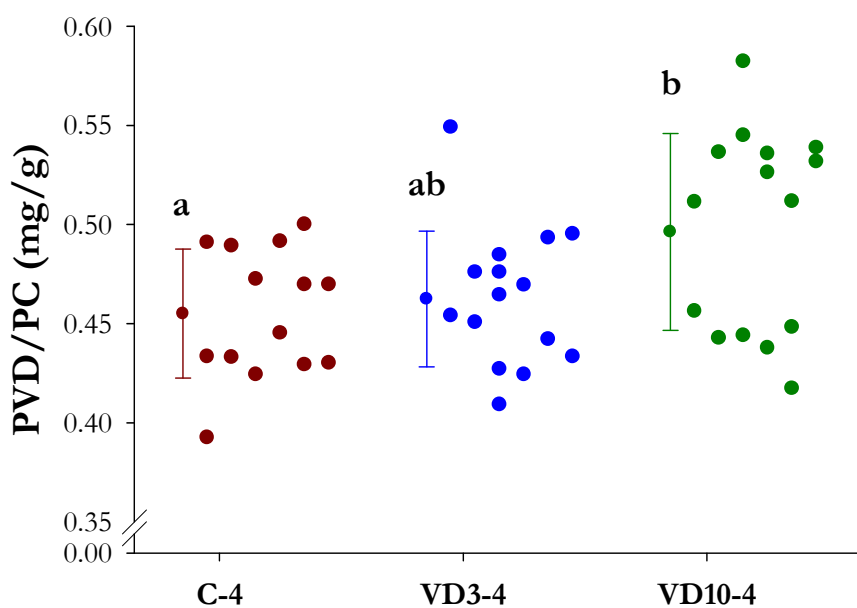


Figura 31. Peso do ventrículo direito normalizado pelo peso corporal.

C-4: grupo controle, sem suplementação de colecalciferol; VD3-4: grupo suplementado com 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; VD10-4: grupo suplementado com 10.000UI de colecalciferol/kg de ração. $P_1=0,014$ (valor de p ANOVA de 1 via); $P_2 = 0,007$ (valor de p para teste de tendência). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos.

Discussão

6. DISCUSSÃO

Este estudo mostrou que a suplementação de vitamina D (VitD) por dois meses em ratos normais está associada com o aumento da expressão da proteína de interação com a tiorredoxina (TXNIP), e consequente diminuição da atividade da tiorredoxina (Trx). Adicionalmente, os animais apresentaram remodelação cardíaca, a qual foi acompanhada de estresse oxidativo, diminuição de fatores anti-apoptóticos, aumento de mediadores inflamatórios e alteração do metabolismo energético cardíaco. Com o aumento do tempo de suplementação de VitD, por 4 meses, os animais apresentaram hipertrofia cardíaca e disfunção diastólica. A alteração das proteínas TXNIP e Trx pode ser um dos mecanismos envolvidos no processo de remodelação cardíaca observado nos animais suplementados com VitD.

O estado nutricional relativo à VitD é mensurado por meio da concentração sérica do metabólito 25 (OH) D₃ e não pela forma biologicamente ativa da VitD. O 1,25 (OH)₂ D₃ não é indicado para esse propósito devido às seguintes razões: 1) as concentrações séricas de 1,25 (OH)₂ D₃ são mantidas pelo organismo dentro de faixa normal; 2) as concentrações séricas de 25 (OH) D₃ são aproximadamente cem vezes maiores que as de 1,25 (OH)₂ D₃; e 3) a meia-vida do 1,25 (OH)₂ D₃ é de aproximadamente seis horas, enquanto a do 25 (OH) D₃, é de duas a três semanas (2, 76, 77).

Em nosso estudo, os animais suplementados com VitD apresentaram maiores valores plasmáticos de 25 (OH) D₃. Esses valores foram consistentes com dados mostrados em outros estudos, cujas doses de VitD suplementadas foram similares às nossas. (58, 78). Os animais que receberam VitD mostraram também discreto aumento do cálcio sérico. No entanto, os valores estão dentro dos limites de normocalcemia encontrados para ratos na literatura (8, 58, 78, 79). Adicionalmente, os valores de 25 (OH) D₃ e de cálcio estão abaixo dos valores que causaram sinais de toxicidade pela VitD, no estudo realizado Shepard and Deluca (58).

Estudos têm mostrado que o 1,25 (OH)₂ D₃ regula positivamente a expressão da TXNIP (39, 80). Consistente com esses estudos, nossos dados mostraram que os animais suplementados com a maior dose de colecalciferol apresentaram maior expressão da TXNIP e que seu aumento foi dose dependente. A TXNIP tem sido mostrada ser reguladora negativa endógena da proteína Trx. Ela interage com a Trx diminuindo sua atividade redutora e sua expressão (45). Sendo assim, em nosso estudo, o aumento da expressão da TXNIP nos animais suplementados com 10.000UI de colecalciferol, pode ter sido responsável pela menor da atividade redutora da Trx, observada nesses animais. O aumento da expressão da TXNIP, pode também ter levado à diminuição dose dependente da atividade da Trx e da expressão da Trx-1. Como a atividade da tiorredoxina

redutase (TrxR), não foi diferente entre os grupos, esta não teve participação na diminuição da atividade redutora da Trx.

Tanto a TXNIP quanto a Trx são responsáveis por regular diferentes vias de sinalização que podem modular a função cardíaca, tais como sinalização redox, apoptose, inflamação, metabolismo energético e crescimento celular (41, 47, 51-55). O sistema Trx é o maior sistema antioxidante do tipo tiol-dissulfeto óxido redutases das células (51, 81, 82). A Trx modula os sinais de transdução das espécies reativas (ERs) agindo de duas formas. Por exemplo, ela pode agir diretamente sobre as ERs, doando equivalentes redutores para neutralizá-las. Como acontece com o peróxido de hidrogênio. A Trx pode também modular os sinais de transdução das ERs agindo indiretamente sobre proteínas dissulfetos oxidadas e sobre antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos. Ao atuar sobre proteínas dissulfetos oxidadas ela reduz os grupos tióis dessas proteínas, que foram oxidados por ERs. Além disso, ela atua na homeostase de algumas enzimas e proteínas antioxidantes. A Trx doa equivalentes redutores para a regeneração da glutathione peroxidase (GPx), da superóxido dismutase (SOD), da glutathione oxidada (GSSG) e para a ativação da peroxirredoxina (Prx), uma importante enzima antioxidante que reduz peróxido de hidrogênio, hidroperóxido de lipídio e peroxinitrito utilizando obrigatoriamente a Trx como doador de elétrons (83, 84). Portanto, a TXNIP pode participar do balance redox no coração, desde regula a atividade e expressão da Trx.

O estado redox celular é determinado pela quantidade de ERs produzidas endogenamente pela célula e pela eficácia dos sistemas antioxidantes (85). Vários sistemas celulares produzem ERs durante o metabolismo celular normal. Para manutenção dos níveis normais dessas espécies, as células dispõem de mecanismos antioxidantes. A primeira linha de defesa é composta pelas enzimas SOD, GPx e catalase (CAT), que vão reduzir as ERs até a formação de H₂O (85). Quando ocorre um desequilíbrio entre a produção de ERs e a atividade dos sistemas antioxidantes, que favoreça o aumento das ERs, a célula encontra-se sob estresse oxidativo (EO) (86). Este estado redox conduz a danos oxidativos nas macromoléculas como, por exemplo, oxidação dos aminoácidos, quebra da cadeia e oxidação das bases do DNA, peroxidação lipídica (peroxidação dos fosfolipídios, glicolipídios e colesterol celular pelas ERs, formando hidroperóxido de lipídio), entre outros, que podem comprometer a viabilidade celular (87-89).

Em nosso estudo, os animais suplementados com VitD encontram-se sob estresse oxidativo. Isto pode ser observado pela diminuição da atividade das enzimas antioxidantes SOD e GPx e pelo aumento da peroxidação lipídica nesses animais. A diminuição da atividade das enzimas antioxidante e o aumento da peroxidação lipídica foi dose dependente. O aumento da

expressão da TXNIP, acompanhado pela diminuição da atividade redutora da Trx, observada nos animais suplementados com VitD, pode ser o mecanismo responsável pelo desequilíbrio redox observado em nosso estudo.

Semelhante aos nossos resultados, alguns estudos realizados com cultura de células tumorais e com adipócitos e células ósseas humanas, têm mostrado que o tratamento com 1,25 (OH)₂ D₃ diminui a expressão e atividade da SOD e a quantidade da glutatona reduzida. Além disso, observaram também aumento da produção de ER de oxigênio, especificamente superóxido e peróxido de hidrogênio. Estes resultados foram revertidos com pré-tratamento com antioxidantes (90-95). No entanto, esses estudos não analisaram a participação do complexo TXNIP-Trx.

Em condições de estresse oxidativo celular, em adição aos sistemas antioxidantes enzimáticos citados acima, a célula também dispõe de enzimas antioxidantes de fase II. As ERs ativam o sistema conhecido como Kelch-like ECH-associated Protein 1 (Keap-1)/Fator Nuclear Eritróide (Nrf-2), que no núcleo irá aumentar a expressão de enzimas antioxidantes de fase II, tais como heme oxigenase-1 (HO-1) e glutatona peroxidase-1 (GPx-1) (96). Sob condições basais (ausência de stress oxidativo ou outro sinal que induza a ativação do sistema) a proteína Nrf-2 encontra-se sequestrada no citosol por ação de duas moléculas de Keap-1 e, assim, inativa. O homodímero de Keap-1 serve de intermediário à ligase E3 ubiquitina (Cul3-Rbx1) que marca por ubiquitinação a proteína Nrf-2 para degradação proteossomal. Posto isto, a proteína Nrf-2 apresenta níveis basais baixos, resultantes do balanço entre a síntese de novo e a degradação proteossomal (97). Quando a célula encontra-se sob estresse oxidativo, o sistema Keap 1/Nrf-2 é ativado e o Nrf-2 se desliga do Keap-1 e migra para o núcleo, onde se liga a regiões específicas do DNA (elementos de resposta antioxidante – ARE), regulando a expressão de enzimas antioxidantes (98, 99).

Em nosso estudo, embora os animais suplementados com VitD tenham apresentado aumento do estresse oxidativo, não foi observada alteração na expressão do Nrf-2 nuclear, nem tampouco das enzimas antioxidantes HO-1 e GPx-1. Estudos têm mostrado que dependendo do agente indutor do estresse oxidativo, da intensidade e duração e do tipo de célula e seu estado fisiológico, diferentes vias de sinalização antioxidante são ativadas (100). Por exemplo, em situações de estresse oxidativo de baixa intensidade o sistema Keap-1/Nrf-2 é o principal sistema antioxidante ativado. Entretanto, situações de estresse oxidativo intermediário ativam outra via, tais como a via do Fator Nuclear Kappa B (NF-kB) e em situações de estresse oxidativo de alta intensidade os sistemas antioxidantes são oprimidos e a abertura de canais mitocondriais é estimulada, e irá induzir a apoptose (100).

A duração do estresse oxidativo também determina se o sistema Keap-1/Nrf-2 será ativado. Na doença renal aguda o sistema é ativado para diminuir o estresse oxidativo, porém, na doença renal crônica não. Ainda não se sabe ao certo qual o mecanismo que impede a ativação na doença renal crônica (101). Além disso, em algumas situações patológicas, como na hipóxia, sabe-se que o Nrf-2 não aumenta. Mecanismos reguladores como a proteína ligase 2 E3 ubiquitina (Siah2), que está ativada na hipóxia, se liga ao Nrf-2 e aumenta sua degradação, impedindo que ele atue sobre as ARE e aumente a expressão de proteínas antioxidantes. Em nosso modelo, parece haver algum mecanismo que impediu a ativação do Nrf-2 (102).

O sistema Keap-1/Nrf-2 é regulado por diferentes mecanismos. Isto é necessário para impedir os efeitos deletérios da indução prolongada de proteínas citoprotetoras (103, 104). A ativação do Nrf-2 e migração para o núcleo pode ocorrer por oxidação de resíduos de cisteína do Keap-1, fazendo com que este se desligue do Nrf-2 (105, 106), ou por fosforilação do próprio Nrf-2 por proteínas kinases (107, 108). O aumento do Nrf-2 no núcleo ativa regiões ARE do próprio Nrf-2, regulando-o positivamente e aumentando sua síntese de novo (109). Entretanto, o aumento muito intenso do Nrf-2 no núcleo ativa transcrição do Keap-1 e Cul3-Rbx1 para aumentar sua degradação e diminuir sua quantidade no núcleo (110, 111). Estudos têm mostrado que dentre as proteínas kinases responsáveis pela ativação do Nrf-2 estão as proteínas da via Fosfoinositol 3-quinase (PI3K)/Proteína Kinase B (Akt). Inibidores de PI3K inibem a translocação do Nrf-2 para o núcleo e a síntese de novo sob condição de estresse oxidativo (112). A Trx-1 tem sido mostrada interagir com a proteína Fosfatase e Tensina Homóloga (PTEN), um inibidor da via PI3K/Akt. Quando a Trx se liga ao PTEN ela impede que ele consiga inibir a via PI3K/Akt. Logo, na ausência da Trx, o PTEN fica livre, e a atividade da via PI3K/Akt é atenuada (113). Xu et al. (2013) (114) mostraram também que compostos que aumentam a oxidação da Trx podem interferir com a ativação do Keap-1. Sendo assim, a diminuição da atividade da Trx observada em nosso estudo, pode estar contribuindo para a não ativação do sistema Keap-1/Nrf-2 em nossos animais suplementados com VitD.

Além de sua extensa participação na regulação redox celular, a TXNIP e a Trx também tem sido implicadas nas alterações celulares responsáveis pela apoptose (44, 53). A Trx, além de exercer efeito anti-apoptótico, por meio de seu papel antioxidante, também regula proteínas importantes de vias pró e anti-apoptóticas. Sendo assim, sua inibição pode desregular essas vias levando à morte celular (53).

A apoptose é um processo biológico fundamental e complexo que permite que ocorra morte celular de maneira programada. A apoptose permite ao organismo remover as células indesejadas durante seu desenvolvimento, durante a homeostase normal e durante processos

patológicos (115, 116). Para a ocorrência da apoptose é necessário a interação de fatores pró e anti-apoptóticos (117). Dentre os fatores pró-apoptóticos, destacam-se as proteínas caspases. As caspases são proteases sintetizadas como precursores inativos (pró-caspases), que são ativados quando a célula recebe algum sinal de morte (118). Elas estimulam uma cascata de sinalização, por meio da clivagem de vários substratos, que vão desencadear alterações morfológicas e bioquímicas na célula, as quais irão resultar em morte celular (118, 119). Até o momento foram descritos 14 tipos de caspases. (120). Dentre elas, está a caspase-3, fator essencial para algumas das alterações morfológicas e bioquímicas que ocorrem durante a apoptose, além de ser efetor final de várias vias de sinalização para morte celular (119, 121). A regulação da apoptose também depende da concentração de proteínas, como Bax e Bcl-2. A formação de dímeros Bax-Bax cria poros na membrana mitocondrial e facilita a liberação de citocromo C. O citocromo C é uma proteína localizada na mitocôndria, que é liberada no interior da célula onde interage com pró-caspases estimulando, por sua vez, a apoptose. Já a formação de dímeros Bcl-2-Bax previne a formação destes poros, inibindo apoptose (122). A homeostasia celular é mantida pelo equilíbrio entre a quantidade de proteínas anti-apoptóticas e pró-apoptóticas. Em nosso estudo nós observamos menor expressão da Bcl-2 nos animais suplementados com a maior dose de colecalciferol, além de uma diminuição dose dependente da expressão dessa proteína. Porém, não observamos alteração da caspase-3 nos animais suplementados com VitD quando comparados ao controle.

Estudo realizado por Minn et al (2005) (123) mostrou que a TXNIP regula negativamente a expressão gênica da Bcl-2, podendo ser esse um dos mecanismos que levou à diminuição da Bcl-2 em nosso estudo.

Além disso, estudos realizados com células tumorais tratadas com VitD mostraram que ela aumenta a apoptose dessas células, exercendo efeito antitumoral (95, 124-127). Um dos mecanismos envolvidos no efeito pró-apoptótico da VitD podem ter sido dependentes do estresse oxidativo gerado nessas células (95, 124, 125). As ER provocam morte celular por ativação das vias de morte (como por exemplo, as vias das caspases) e/ou por danificar componentes celulares importantes, tais como DNA, proteínas mitocondriais e lisossomos.

Outra mecanismo observado foi a diminuição da expressão da Bcl-2 (126). A diminuição na expressão da Bcl-2 levou a mudanças do potencial de membrana e no metabolismo mitocondrial, culminando com a morte celular. De fato, quando o gene da Bcl-2 foi superexpresso, a apoptose induzida pela VitD foi bloqueada (126, 127). Esses resultados mostram que a regulação da função mitocondrial pela Bcl-2 pode também ser um fator importante na modulação da apoptose pela VitD. Além da participação da Bcl-2, na apoptose

induzida por VitD, alguns trabalhos com células tumorais também analisaram a participação das vias das caspases. Os autores mostraram que a VitD pode induzir apoptose de maneira dependente e independente da via das caspases (95, 124, 125, 127). Em alguns modelos essa via não foi ativada ou não foi crucial na indução da apoptose, ou seja, quando a atividade da caspase-3 foi inibida, isso não bloqueou a indução da apoptose pela VitD (124). Portanto, em nosso estudo, a diminuição da expressão da Bcl-2, pode ser fator crucial na indução de apoptose dos cardiomiócitos, mesmo sem alteração da caspase-3.

Sendo assim, os mecanismos envolvidos na alteração de marcadores de apoptose, mediados pelo tratamento com a VitD, podem estar relacionados tanto com o aumento da expressão da TXNIP, a qual regula negativamente a Bcl-2, como com o aumento da interação TXNIP-Trx. Isso levaria à diminuição da Trx reduzida e conseqüentemente ao aumento do EO e indução da apoptose. De fato, estudo *in vivo*, com células epiteliais humanas, mostrou que o tratamento com VitD aumenta a expressão da TXNIP e conseqüentemente diminui a atividade da Trx, ativando assim a apoptose. A ativação da apoptose foi relacionada com o aumento do EO e com a diminuição da expressão da Bcl-2 (53).

É bem conhecido que a VitD exerce um importante papel na modulação do sistema imune e da resposta inflamatória (128). Em nosso estudo, nós observamos maiores valores de mediadores pró e anti-inflamatórios e da molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) nos animais suplementados com a maior dose de colecalciferol, além de um aumento dose dependente desses mediadores. Estudos mostraram que a Trx exerce efeito anti-inflamatório atuando sobre diferentes tipos de células imunes. Além disso, ela regula fatores de transcrição que modulam a produção de citocinas inflamatórias e de moléculas de adesão (52). Por outro lado, a TXNIP possui ação inflamatória ativando diretamente inflamassomas (129) e células imunes como os linfócitos T Natural Killer (130). Além disso, a TXNIP também está associada a processos inflamatórios em diferentes patologias (131). Sendo assim, a alteração das proteínas TXNIP e Trx pode ter sido o mecanismo que levou ao aumento das citocinas inflamatórias e da ICAM-1 em nossos animais suplementados com VitD.

Adicionalmente, sabe-se que VitD induz a produção de citocinas dos linfócitos T Helper 2, dentre elas a interleucina-10 (IL-10) (132, 133). Isso explica o aumento dose dependente da IL-10 nos animais suplementados com VitD.

O músculo cardíaco necessita de alta produção de ATP, a qual é realizada de maneira eficiente pelas mitocôndrias. Sob condições aeróbias, 90% da produção de ATP é derivada da oxidação de ácidos e formação de Acetil-Coenzima A, que será oxidada no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) (134). Entretanto, durante o processo de remodelação cardíaca a oxidação

de ácidos graxos diminui, e o suprimento de Acetil-Coenzima A para o TCA é derivado da oxidação da glicose. Posteriormente, o TCA também é prejudicado e apenas a oxidação da glicose pela via glicolítica é responsável pela geração de ATP (135). Essas mudanças levam ao prejuízo na produção de energia para o coração e conseqüentemente à disfunção cardíaca (136). Essas alterações no metabolismo podem ser mediadas por dois importantes fatores de transcrição, os maiores reguladores da biogênese e respiração mitocondrial, são eles o coativador-1 α do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma γ (PGC-1 α) e receptor ativado por proliferadores de peroxissoma α (PPAR α) (137, 138).

PGC-1 α é um coativador transcricional que se liga ao PPAR α e ao receptor rexinóide (RXR) formando um complexo que irá atuar sobre regiões específicas do DNA regulando a transcrição de enzimas da β -oxidação de ácidos graxos e da cadeia transportadora de elétrons (ETC), além de inibir, a oxidação de piruvato (137, 138). Ambos os fatores de transcrição são altamente expressos no coração (138-141) e a deleção específica do PPAR- α (142-144) ou PGC-1 α (145) leva a diminuição da oxidação de ácidos graxos e disfunção cardíaca (136).

Em nosso estudo nós observamos diminuição da expressão do PGC-1 α nos animais suplementados com 10.000 UI de coelcalciferol. Esses animais também apresentaram diminuição da β -oxidação ácidos graxos, do TCA, e da ETC. Por outro lado, houve aumento da via glicolítica. Essas alterações podem ter ocorrido devido a uma menor ativação do PPAR- α por seu cofactor PGC-1 α , o que pode ter levado à diminuição das enzimas da β -oxidação ácidos graxos, do TCA, e da ETC.

Estudos têm mostrado que outra importante via de sinalização regulada pelas proteínas TXNIP e Trx é o metabolismo energético. Tanto a TXNIP como a TRx parecem modular os fatores PGC-1 α e PPAR α (40, 54, 146, 147). Estudos realizados com camundongos com o gene da TXNIP deletado no coração mostraram que ocorre aumento da expressão do PGC-1 α e da atividade do PPAR α , além de diminuição da oxidação de glicose e aumento da oxidação de ácidos graxos (40, 42). Adicionalmente, estudos realizados com camundongos transgênicos que superexpressam a Trx no coração, mostraram resultados semelhantes (147). Em nosso modelo, temos uma situação contrária. A TXNIP está superexpressa e em conseqüência a Trx está diminuída. Portanto, as alterações na expressão do PGC-1 α e conseqüentemente nas enzimas do metabolismo podem estar sendo mediadas pelo complexo TXNIP/Trx.

Em resumo, em nosso estudo, a suplementação de VitD levou ao aumento da expressão da TXNIP. Conseqüentemente houve diminuição da atividade da Trx. O aumento da expressão da TXNIP, juntamente com a diminuição da atividade da Trx pode ter levado ao EO, aumento dos mediadores inflamatórios, diminuição do marcador anti-apoptótico Bcl-2, e alteração do

metabolismo energético cardíaco. Essas alterações metabólicas e moleculares poderiam resultar na mudança da morfologia cardíaca e na deterioração da capacidade funcional do coração (148, 149). Entretanto, o estudo morfológico realizado por meio de ecocardiograma nos animais suplementados por 2 meses com VitD não mostrou alterações de morfologia e função cardíaca. Por sua vez, quando aumentamos o tempo de suplementação com VitD (4 meses), os animais apresentaram maiores valores de espessura da parede posterior do VE e da espessura relativa da parede posterior do VE, todos comparados ao controle. Essas alterações caracterizam a ocorrência de hipertrofia ventricular esquerda nos animais suplementados com VitD.

Em relação aos efeitos da suplementação de VitD nas variáveis funcionais, em nosso estudo os animais não apresentaram nenhuma alteração na função sistólica. Entretanto, a função diastólica foi pior nos animais suplementados com VitD, o que pode ser observado pelo aumento dose dependente do diâmetro e volume do AE, tanto em valores absolutos como normalizados; e pelo peso dos átrios, também em valores absolutos e normalizado pelo PC. Estudos têm mostrado que a dilatação do AE está relacionada à disfunção diastólica do VE (150, 151). Alterações no relaxamento e na complacência do VE promovem elevação da pressão de enchimento do VE. Conseqüentemente, ocorre elevação da pressão no AE para manter o enchimento ventricular. O aumento da tensão parietal leva à dilatação da câmara atrial. Portanto, o tamanho do AE pode funcionar como marcador da cronicidade da disfunção diastólica (150, 151).

Outras variáveis ecocardiográficas utilizadas para caracterizar a diástole ventricular são os componentes de velocidade do fluxo mitral que incluem: a velocidade de enchimento rápido precoce (onda E), velocidade de contração atrial (onda A) e o TDE (152, 153). Alterações precoces do relaxamento ventricular, ou seja, da função diastólica, são caracterizadas por alongamento do TDE. No entanto, com a piora da função diastólica, o TDE é restaurado, criando um padrão "pseudonormal" apesar anormalidades moderadas do relaxamento ventricular. Com a progressão da disfunção, o relaxamento ventricular continua diminuindo e a pressão de enchimento do VE aumentando, resultando em encurtamento do TDE (152, 153). Esses padrões de alteração no TDE podem estar ocorrendo nos nossos animais suplementados com VitD, uma vez que os valores de TDE foram maiores nos animais do grupo VD3-4 e voltaram a diminuir nos animais do grupo VD10-4. Essas mudanças representariam o início de uma disfunção diastólica no grupo VD3-4 e uma piora da função diastólica, com padrão "pseudonormal", no grupo VD10-4.

Os ventrículos direito e esquerdo estão intimamente relacionados devido à base anatômica da sua morfologia, e ao fato de estarem contidos no interior do pericárdio. Sendo

assim, alterações na função do VE, podem ser transmitidas ao lado direito do coração, podendo resultar em alterações secundárias na morfologia e função do VD (154). A massa muscular do VD é de aproximadamente um sexto da massa muscular do VE, sendo assim, o VD é menos resistente a alterações de pressão e volume. Com aumento crônico da pressão no VE e AE, o VD dilata e desenvolve hipertrofia muscular (154). Com o aumento do VD ocorre dilatação do anel da valva tricúspide e regurgitação tricúspide, podendo levar a alterações da função diastólica do VD (155). Em nosso estudo os animais suplementados com VitD apresentaram alteração dose dependente da morfologia do VD, caracterizada pelo aumento dose dependente do PVD normalizado pelo PC, sendo os maiores valores observado no grupo VD10-4 comparado ao C-4. Além disso, esses animais apresentaram também piora da função diastólica do VD, observada pela diminuição dose dependente da onda E tricúspide e da razão E/A tricúspide, sendo os valores menores no grupo VD10-4 comparado ao C.

Portanto, podemos observar em nosso trabalho, que a suplementação de VitD em excesso, porém em doses não tóxicas, foi um processo de agressão contínua. Inicialmente resultou em alterações metabólicas e moleculares, e com o aumento do tempo de duração, levou a alterações de morfologia e piora da função, tanto do VE como do VD, as quais caracterizam o processo de remodelação cardíaca. Além disso, a intensidade das alterações observadas foi dose dependente. O mecanismo que pode estar envolvido nas mudanças ocorridas é o aumento da expressão da TXNIP e conseqüente diminuição da atividade e expressão da Trx.

Conclusões

7. CONCLUSÕES

A suplementação de vitamina D leva à remodelação cardíaca com aparecimento de estresse oxidativo, diminuição de marcadores anti-apoptóticos, aumento de mediadores inflamatórios e alteração do metabolismo energético cardíaco. Com o aumento do tempo de suplementação de vitamina D ocorre hipertrofia cardíaca com disfunção diastólica. As alterações nas proteínas TXNIP e Trx podem ser o mecanismo envolvido nesse processo.

Referências

8. REFERÊNCIAS

1. James WP. 22nd Marabou Symposium: the changing faces of vitamin D. *Nutr Rev.* 2008 May;66(5):286-90.
2. Lips P. Vitamin D physiology. *Prog Biophys Mol Biol.* 2006 Sep;92(1):4-8.
3. Holick MF. Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. *J Clin Invest.* 2006 Aug;116(8):2062-72.
4. Holick MF, Garabedian M. Vitamin D: photobiology, metabolism, mechanism of action, and clinical applications. In: Favus MJ, editor. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism.* Washington, DC: American Society for Bone and Mineral Research; 2006. p. 129-37.
5. DeLuca HF. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr.* 2004 Dec;80(6 Suppl):1689S-96S.
6. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005 Jul;289(1):F8-28.
7. Somjen D, Weisman Y, Kohen F, Gayer B, Limor R, Sharon O, et al. 25-hydroxyvitamin D3-1 α -hydroxylase is expressed in human vascular smooth muscle cells and is upregulated by parathyroid hormone and estrogenic compounds. *Circulation.* 2005;111(13):1666-71.
8. O'Connell TD, Giacherio DA, Jarvis AK, Simpson RU. Inhibition of cardiac myocyte maturation by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Endocrinology.* 1995 Feb;136(2):482-8.
9. O'Connell TD, Weishaar RE, Simpson RU. Regulation of myosin isozyme expression by vitamin D3 deficiency and 1,25-dihydroxyvitamin D3 in the rat heart. *Endocrinology.* 1994 Feb;134(2):899-905.
10. Kimball S, Fuleihan Gel H, Vieth R. Vitamin D: a growing perspective. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2008;45(4):339-414.
11. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med.* 2007 Jul 19;357(3):266-81.
12. Pittas AG, Lau J, Hu FB, Dawson-Hughes B. The role of vitamin D and calcium in type 2 diabetes. A systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 Jun;92(6):2017-29.
13. Hewison M. Vitamin D and innate immunity. *Curr Opin Investig Drugs.* 2008 May;9(5):485-90.

14. Assalin HB, Rafacho BP, Santos PP, Ardisson LP, Roscani MG, Chiuso-Minicucci F, et al. Impact of the length of vitamin d deficiency on cardiac remodeling. *Circ Heart Fail*. 2013 Jul 1;6(4):809-16.
15. Weng S, Sprague JE, Oh J, Riek AE, Chin K, Garcia M, et al. Vitamin D deficiency induces high blood pressure and accelerates atherosclerosis in mice. *PLoS One*. 2013;8(1):e54625.
16. Seker T, Gur M, Kuloglu O, Kalkan GY, Sahin DY, Turkoglu C, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D is associated with both arterial and ventricular stiffness in healthy subjects. *J Cardiol*. 2013 Dec;62(6):361-5.
17. Forman JP, Scott JB, Ng K, Drake BF, Suarez EG, Hayden DL, et al. Effect of vitamin D supplementation on blood pressure in blacks. *Hypertension*. 2013 Apr;61(4):779-85.
18. Andrukhova O, Slavic S, Zeitz U, Riesen SC, Heppelmann MS, Ambrisko TD, et al. Vitamin D is a regulator of endothelial nitric oxide synthase and arterial stiffness in mice. *Mol Endocrinol*. 2014 Jan;28(1):53-64.
19. Scragg R, Sowers M, Bell C. Serum 25-hydroxyvitamin D, ethnicity, and blood pressure in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Hypertens*. 2007 Jul;20(7):713-9.
20. Pilz S, Marz W, Wellnitz B, Seelhorst U, Fahrleitner-Pammer A, Dimai HP, et al. Association of vitamin D deficiency with heart failure and sudden cardiac death in a large cross-sectional study of patients referred for coronary angiography. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008 Oct;93(10):3927-35.
21. Saraiva GL, Cendoroglo MS, Ramos LR, Araujo LM, Vieira JG, Maeda SS, et al. [Prevalence of vitamin D deficiency, insufficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly inpatients and living in the community of the city of Sao Paulo, Brazil]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2007 Apr;51(3):437-42.
22. Peters BS, dos Santos LC, Fisberg M, Wood RJ, Martini LA. Prevalence of vitamin D insufficiency in Brazilian adolescents. *Ann Nutr Metab*. 2009;54(1):15-21.
23. Pilz S, Tomaschitz A. Vitamin D status: to be considered in heart failure patients! *Eur J Heart Fail*. 2011 Jun;13(6):595-6.
24. Zittermann A, Schleithoff SS, Koerfer R. Vitamin D and vascular calcification. *Curr Opin Lipidol*. 2007 Feb;18(1):41-6.
25. Rosen CJ. Clinical practice. Vitamin D insufficiency. *N Engl J Med*. 2011 Jan 20;364(3):248-54.

26. Santos PP, Rafacho BP, Goncalves Ade F, Jaldin RG, Nascimento TB, Silva MA, et al. Vitamin D induces increased systolic arterial pressure via vascular reactivity and mechanical properties. *PLoS One*. 2014;9(6):e98895.
27. Goncalves AF, Santos PP, Rafacho BP, Batista DF, Azevedo PS, Minicucci MF, et al. Vitamin D supplementation intensifies cardiac remodeling after experimental myocardial infarction. *Int J Cardiol*. 2014 Oct 20;176(3):1225-6.
28. Haffner D, Hocher B, Muller D, Simon K, Konig K, Richter CM, et al. Systemic cardiovascular disease in uremic rats induced by 1,25(OH)2D3. *J Hypertens*. 2005 May;23(5):1067-75.
29. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol*. 2000 Mar 1;35(3):569-82.
30. Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev*. 1999 Jan;79(1):215-62.
31. Opie LH, Commerford PJ, Gersh BJ, Pfeffer MA. Controversies in ventricular remodeling. *Lancet*. 2006 Jan 28;367(9507):356-67.
32. Stanley WC, Recchia FA, Lopaschuk GD. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev*. 2005 Jul;85(3):1093-129.
33. Fieser LF, M. F. Vitamin D. *Steroids*. New York: Reinhold; 1985. p. 90-168.
34. Calvo MS, Whiting SJ, Barton CN. Vitamin D intake: a global perspective of current status. *J Nutr*. 2005 Feb;135(2):310-6.
35. Holick MF. Vitamin D: its role in cancer prevention and treatment. *Prog Biophys Mol Biol*. 2006 Sep;92(1):49-59.
36. DeLuca HF. The metabolism, physiology, and function of vitamin D. In: Kumar R, editor. *Vitamin D: Basic and Clinical Aspects*. Boston: M. Nijhoff Publishers; 1984.
37. Feldman D, Pike JW, Glorieux FH. *Vitamin D*. London: Elsevier Academic Press; 2005.
38. Mizwicki MT, Norman AW. The vitamin D sterol-vitamin D receptor ensemble model offers unique insights into both genomic and rapid-response signaling. *Sci Signal*. 2009;2(75):re4.
39. Chen KS, DeLuca HF. Isolation and characterization of a novel cDNA from HL-60 cells treated with 1,25-dihydroxyvitamin D-3. *Biochim Biophys Acta*. 1994 Sep 13;1219(1):26-32.
40. Sheth SS, Castellani LW, Chari S, Wagg C, Thippavong CK, Bodnar JS, et al. Thioredoxin-interacting protein deficiency disrupts the fasting-feeding metabolic transition. *J Lipid Res*. 2005 Jan;46(1):123-34.

41. Wang Y, De Keulenaer GW, Lee RT. Vitamin D(3)-up-regulated protein-1 is a stress-responsive gene that regulates cardiomyocyte viability through interaction with thioredoxin. *J Biol Chem*. 2002 Jul 19;277(29):26496-500.
42. Oka S, Yoshihara E, Bizen-Abe A, Liu W, Watanabe M, Yodoi J, et al. Thioredoxin binding protein-2/thioredoxin-interacting protein is a critical regulator of insulin secretion and peroxisome proliferator-activated receptor function. *Endocrinology*. 2009 Mar;150(3):1225-34.
43. Filby CE, Hooper SB, Sozo F, Zahra VA, Flecknoe SJ, Wallace MJ. VDUP1: a potential mediator of expansion-induced lung growth and epithelial cell differentiation in the ovine fetus. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006 Feb;290(2):L250-8.
44. Welsh J, Wietzke JA, Zinser GM, Smyczek S, Romu S, Tribble E, et al. Impact of the Vitamin D3 receptor on growth-regulatory pathways in mammary gland and breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2002 Dec;83(1-5):85-92.
45. Nishiyama A, Matsui M, Iwata S, Hirota K, Masutani H, Nakamura H, et al. Identification of thioredoxin-binding protein-2/vitamin D(3) up-regulated protein 1 as a negative regulator of thioredoxin function and expression. *J Biol Chem*. 1999 Jul 30;274(31):21645-50.
46. Patwari P, Higgins LJ, Chutkow WA, Yoshioka J, Lee RT. The interaction of thioredoxin with Txnip. Evidence for formation of a mixed disulfide by disulfide exchange. *J Biol Chem*. 2006 Aug 4;281(31):21884-91.
47. Nordberg J, Arner ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med*. 2001 Dec 1;31(11):1287-312.
48. Taniguchi Y, Taniguchi-Ueda Y, Mori K, Yodoi J. A novel promoter sequence is involved in the oxidative stress-induced expression of the adult T-cell leukemia-derived factor (ADF)/human thioredoxin (Trx) gene. *Nucleic Acids Res*. 1996 Jul 15;24(14):2746-52.
49. Spyrou G, Enmark E, Miranda-Vizuete A, Gustafsson J. Cloning and expression of a novel mammalian thioredoxin. *J Biol Chem*. 1997 Jan 31;272(5):2936-41.
50. Miranda-Vizuete A, Ljung J, Damdimopoulos AE, Gustafsson JA, Oko R, Pelto-Huikko M, et al. Characterization of Sptrx, a novel member of the thioredoxin family specifically expressed in human spermatozoa. *J Biol Chem*. 2001 Aug 24;276(34):31567-74.
51. Ago T, Sadoshima J. Thioredoxin and ventricular remodeling. *J Mol Cell Cardiol*. 2006 Nov;41(5):762-73.

52. Ahsan MK, Lekli I, Ray D, Yodoi J, Das DK. Redox regulation of cell survival by the thioredoxin superfamily: an implication of redox gene therapy in the heart. *Antioxid Redox Signal*. 2009 Nov;11(11):2741-58.
53. Yu Y, Xing K, Badamas R, Kuszynski CA, Wu H, Lou MF. Overexpression of thioredoxin-binding protein 2 increases oxidation sensitivity and apoptosis in human lens epithelial cells. *Free Radic Biol Med*. 2013 Apr;57:92-104.
54. Yoshioka J, Chutkow WA, Lee S, Kim JB, Yan J, Tian R, et al. Deletion of thioredoxin-interacting protein in mice impairs mitochondrial function but protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury. *J Clin Invest*. 2012 Jan 3;122(1):267-79.
55. Yoshioka J, Schulze PC, Cupesi M, Sylvan JD, MacGillivray C, Gannon J, et al. Thioredoxin-interacting protein controls cardiac hypertrophy through regulation of thioredoxin activity. *Circulation*. 2004 Jun 1;109(21):2581-6.
56. IOM. (Institute of Medicine). *Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D*. Washington, DC: The National academies Press; 2011.
57. Hrubec Z, Neel JV. The National Academy of Sciences--National Research Council Twin Registry: ten years of operation. *Prog Clin Biol Res*. 1978;24 Pt B:153-72.
58. Shepard RM, Deluca HF. Plasma Concentrations of Vitamin D3 and Its Metabolites in the Rat as Influenced by Vitamin D, or 25-Hydroxyvitamin D3 Intake. *Arch Biochem Biophys*. 1980;202(1):43-53.
59. Sahn DJ, DeMaria A, Kisslo J, Weyman A. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation*. 1978 Dec;58(6):1072-83.
60. Watson LE, Sheth M, Denyer RF, Dostal DE. Baseline echocardiographic values for adult male rats. *J Am Soc Echocardiogr*. 2004 Feb;17(2):161-7.
61. Slama M, Ahn J, Peltier M, Maizel J, Chemla D, Varagic J, et al. Validation of echocardiographic and Doppler indexes of left ventricular relaxation in adult hypertensive and normotensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005 Sep;289(3):H1131-6.
62. Aksnes L. A simplified high-performance liquid chromatographic method for determination of vitamin D3, 25-hydroxyvitamin D2 and 25-hydroxyvitamin D3 in human serum. *Scand J Clin Lab Invest*. 1992 May;52(3):177-82.
63. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7;72:248-54.

64. Cassina A, Radi R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem Biophys*. 1996 Apr 15;328(2):309-16.
65. Wilkinson JH, Withycombe WA. Organ specificity and lactate-dehydrogenase activity. Some properties of human spermatozoal lactate dehydrogenase. *Biochem J*. 1965 Dec;97(3):663-8.
66. Bass A, Brdiczka D, Eyer P, Hofer S, Pette D. Metabolic differentiation of distinct muscle types at the level of enzymatic organization. *Eur J Biochem*. 1969 Sep;10(2):198-206.
67. Fischer JC, Ruitenbeek W, Berden JA, Trijbels JM, Veerkamp JH, Stadhouders AM, et al. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin Chim Acta*. 1985 Nov 29;153(1):23-36.
68. Desai VG, Weindruch R, Hart RW, Feuers RJ. Influences of age and dietary restriction on gastrocnemius electron transport system activities in mice. *Arch Biochem Biophys*. 1996 Sep 1;333(1):145-51.
69. Ewing JF, Janero DR. Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator. *Anal Biochem*. 1995 Dec 10;232(2):243-8.
70. Nakamura M, Hojoda S, Hayashi K. Purification and properties of rats liver glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta*. 1974;358:251-61.
71. Aebi H. *Methods of enzymatic analysis*. 2 ed. New York: Verlag chemie Weinheim; 1974.
72. Jiang ZY, Woollard AC, Wolff SP. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids*. 1991 Oct;26(10):853-6.
73. Yamamoto M, Yang G, Hong C, Liu J, Holle E, Yu X, et al. Inhibition of endogenous thioredoxin in the heart increases oxidative stress and cardiac hypertrophy. *J Clin Invest*. 2003 Nov;112(9):1395-406.
74. Schutze N, Fritsche J, Ebert-Dumig R, Schneider D, Kohrle J, Andreesen R, et al. The selenoprotein thioredoxin reductase is expressed in peripheral blood monocytes and THP1 human myeloid leukemia cells--regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and selenite. *Biofactors*. 1999;10(4):329-38.
75. Chagas CE, Bassoli BK, de Souza CA, Deminice R, Jordao Junior AA, Paiva SA, et al. Folic acid supplementation during early hepatocarcinogenesis: cellular and molecular effects. *Int J Cancer*. 2011 Nov 1;129(9):2073-82.
76. Schuch NJ, Garcia VC, Martini LA. [Vitamin D and endocrine diseases]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2009 Jul;53(5):625-33.

77. Eisman JA, Hamstra AJ, Kream BE, DeLuca HF. A sensitive, precise, and convenient method for determination of 1,25-dihydroxyvitamin D in human plasma. *Arch Biochem Biophys.* 1976 Sep;176(1):235-43.
78. Weishaar RE, Simpson RU. Vitamin D3 and cardiovascular function in rats. *J Clin Invest.* 1987 Jun;79(6):1706-12.
79. Cardus A, Panizo S, Parisi E, Fernandez E, Valdivielso JM. Differential effects of vitamin D analogs on vascular calcification. *J Bone Miner Res.* 2007 Jun;22(6):860-6.
80. Han SH, Jeon JH, Ju HR, Jung U, Kim KY, Yoo HS, et al. VDUP1 upregulated by TGF-beta1 and 1,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits tumor cell growth by blocking cell-cycle progression. *Oncogene.* 2003 Jun 26;22(26):4035-46.
81. Nakamura H, Nakamura K, Yodoi J. Redox regulation of cellular activation. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:351-69.
82. Watson WH, Yang X, Choi YE, Jones DP, Kehrer JP. Thioredoxin and its role in toxicology. *Toxicol Sci.* 2004 Mar;78(1):3-14.
83. Das KC, Lewis-Molock Y, White CW. Elevation of manganese superoxide dismutase gene expression by thioredoxin. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1997 Dec;17(6):713-26.
84. Inarrea P, Moini H, Han D, Rettori D, Aguilo I, Alava MA, et al. Mitochondrial respiratory chain and thioredoxin reductase regulate intermembrane Cu,Zn-superoxide dismutase activity: implications for mitochondrial energy metabolism and apoptosis. *Biochem J.* 2007 Jul 1;405(1):173-9.
85. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1):44-84.
86. Halliwell B. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res.* 1999 Oct;31(4):261-72.
87. Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis.* 2000 Mar;21(3):361-70.
88. Stadtman ER, Levine RL. Protein oxidation. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;899:191-208.
89. Yla-Herttuala S. Oxidized LDL and atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* 1999 Jun 30;874:134-7.
90. Sun X, Zemel MB. 1Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 modulation of adipocyte reactive oxygen species production. *Obesity (Silver Spring).* 2007 Aug;15(8):1944-53.
91. Ravid A, Rocker D, Machlenkin A, Rotem C, Hochman A, Kessler-Ickson G, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 enhances the susceptibility of breast cancer cells to doxorubicin-induced oxidative damage. *Cancer Res.* 1999 Feb 15;59(4):862-7.

92. Koren R, Rucker D, Kotestiano O, Liberman UA, Ravid A. Synergistic anticancer activity of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) and immune cytokines: the involvement of reactive oxygen species. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2000 Jun;73(3-4):105-12.
93. Bondza-Kibangou P, Millot C, Dufer J, Millot JM. Modifications of cellular autofluorescence emission spectra under oxidative stress induced by 1 alpha,25dihydroxyvitamin D(3) and its analog EB1089. *Technol Cancer Res Treat.* 2004 Aug;3(4):383-91.
94. Somjen D, Katzburg S, Grafi-Cohen M, Knoll E, Sharon O, Posner GH. Vitamin D metabolites and analogs induce lipoxygenase mRNA expression and activity as well as reactive oxygen species (ROS) production in human bone cell line. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2011 Jan;123(1-2):85-9.
95. Chen WJ, Huang YT, Wu ML, Huang TC, Ho CT, Pan MH. Induction of apoptosis by vitamin D2, ergocalciferol, via reactive oxygen species generation, glutathione depletion, and caspase activation in human leukemia Cells. *J Agric Food Chem.* 2008 May 14;56(9):2996-3005.
96. Nioi P, McMahon M, Itoh K, Yamamoto M, Hayes JD. Identification of a novel Nrf2-regulated antioxidant response element (ARE) in the mouse NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene: reassessment of the ARE consensus sequence. *Biochem J.* 2003 Sep 1;374(Pt 2):337-48.
97. Kobayashi A, Kang MI, Okawa H, Ohtsuji M, Zenke Y, Chiba T, et al. Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol Cell Biol.* 2004 Aug;24(16):7130-9.
98. Surh YJ, Kundu JK, Na HK. Nrf2 as a master redox switch in turning on the cellular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals. *Planta Med.* 2008 Oct;74(13):1526-39.
99. Tkachev VO, Menshchikova EB, Zenkov NK. Mechanism of the Nrf2/Keap1/ARE signaling system. *Biochemistry (Mosc).* 2011 Apr;76(4):407-22.
100. Lushchak VI. Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2011 Mar;153(2):175-90.
101. Saito H. Toxicopharmacological perspective of the Nrf2-Keap1 defense system against oxidative stress in kidney diseases. *Biochem Pharmacol.* 2013 Apr 1;85(7):865-72.
102. Baba K, Morimoto H, Imaoka S. Seven in absentia homolog 2 (Siah2) protein is a regulator of NF-E2-related factor 2 (Nrf2). *J Biol Chem.* 2013 Jun 21;288(25):18393-405.

103. Kwak MK, Kensler TW. Targeting NRF2 signaling for cancer chemoprevention. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2010 Apr 1;244(1):66-76.
104. Zhang DD. The Nrf2-Keap1-ARE signaling pathway: The regulation and dual function of Nrf2 in cancer. *Antioxid Redox Signal.* 2010 Dec 1;13(11):1623-6.
105. Fourquet S, Guerois R, Biard D, Toledano MB. Activation of NRF2 by nitrosative agents and H₂O₂ involves KEAP1 disulfide formation. *J Biol Chem.* 2010 Mar 12;285(11):8463-71.
106. Holland R, Fishbein JC. Chemistry of the cysteine sensors in Kelch-like ECH-associated protein 1. *Antioxid Redox Signal.* 2010 Dec 1;13(11):1749-61.
107. Karapetian RN, Evstafieva AG, Abaeva IS, Chichkova NV, Filonov GS, Rubtsov YP, et al. Nuclear oncoprotein prothymosin alpha is a partner of Keap1: implications for expression of oxidative stress-protecting genes. *Mol Cell Biol.* 2005 Feb;25(3):1089-99.
108. Piccirillo S, Filomeni G, Brune B, Rotilio G, Ciriolo MR. Redox mechanisms involved in the selective activation of Nrf2-mediated resistance versus p53-dependent apoptosis in adenocarcinoma cells. *J Biol Chem.* 2009 Oct 2;284(40):27721-33.
109. Giudice A, Arra C, Turco MC. Review of molecular mechanisms involved in the activation of the Nrf2-ARE signaling pathway by chemopreventive agents. *Methods Mol Biol.* 2010;647:37-74.
110. Lee OH, Jain AK, Papusha V, Jaiswal AK. An auto-regulatory loop between stress sensors INrf2 and Nrf2 controls their cellular abundance. *J Biol Chem.* 2007 Dec 14;282(50):36412-20.
111. Kaspar JW, Jaiswal AK. An autoregulatory loop between Nrf2 and Cul3-Rbx1 controls their cellular abundance. *J Biol Chem.* 2010 Jul 9;285(28):21349-58.
112. Nakaso K, Yano H, Fukuhara Y, Takeshima T, Wada-Isoe K, Nakashima K. PI3K is a key molecule in the Nrf2-mediated regulation of antioxidative proteins by hemin in human neuroblastoma cells. *FEBS Lett.* 2003 Jul 10;546(2-3):181-4.
113. Meuillet EJ, Mahadevan D, Berggren M, Coon A, Powis G. Thioredoxin-1 binds to the C2 domain of PTEN inhibiting PTEN's lipid phosphatase activity and membrane binding: a mechanism for the functional loss of PTEN's tumor suppressor activity. *Arch Biochem Biophys.* 2004 Sep 15;429(2):123-33.
114. Xu Y, Fang F, Miriyala S, Crooks PA, Oberley TD, Chaiswing L, et al. KEAP1 Is a Redox Sensitive Target That Arbitrates the Opposing Radiosensitive Effects of Parthenolide in Normal and Cancer Cells. *Cancer Research.* 2013 Jul 15;73(14):4406-17.

115. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. 1995 Mar 10;267(5203):1456-62.
116. Jacobson MD, Weil M, Raff MC. Programmed cell death in animal development. *Cell*. 1997 Feb 7;88(3):347-54.
117. Saraste A, Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res*. 2000 Feb;45(3):528-37.
118. Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci*. 1997 Aug;22(8):299-306.
119. Boatright KM, Salvesen GS. Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol*. 2003 Dec;15(6):725-31.
120. Miura M. Apoptotic and nonapoptotic caspase functions in animal development. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(10).
121. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*. 1997 Aug 15;326 (Pt 1):1-16.
122. Borner C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol*. 2003 Jan;39(11):615-47.
123. Minn AH, Pise-Masison CA, Radonovich M, Brady JN, Wang P, Kendzioriski C, et al. Gene expression profiling in INS-1 cells overexpressing thioredoxin-interacting protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Oct 28;336(3):770-8.
124. Narvaez CJ, Welsh J. Role of mitochondria and caspases in vitamin D-mediated apoptosis of MCF-7 breast cancer cells. *J Biol Chem*. 2001 Mar 23;276(12):9101-7.
125. Weitsman GE, Koren R, Zuck E, Rotem C, Liberman UA, Ravid A. Vitamin D sensitizes breast cancer cells to the action of H₂O₂: mitochondria as a convergence point in the death pathway. *Free Radic Biol Med*. 2005 Jul 15;39(2):266-78.
126. Blutt SE, McDonnell TJ, Polek TC, Weigel NL. Calcitriol-induced apoptosis in LNCaP cells is blocked by overexpression of Bcl-2. *Endocrinology*. 2000 Jan;141(1):10-7.
127. Mathiasen IS, Lademann U, Jaattela M. Apoptosis induced by vitamin D compounds in breast cancer cells is inhibited by Bcl-2 but does not involve known caspases or p53. *Cancer Res*. 1999 Oct 1;59(19):4848-56.
128. Matsuoka LY, Wortsman J, Chen TC, Holick MF. Compensation for the interracial variance in the cutaneous synthesis of vitamin D. *J Lab Clin Med*. 1995 Nov;126(5):452-7.
129. Zhou R, Tardivel A, Thorens B, Choi I, Tschopp J. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat Immunol*. 2010 Feb;11(2):136-40.

130. Jeong M, Piao ZH, Kim MS, Lee SH, Yun S, Sun HN, et al. Thioredoxin-interacting protein regulates hematopoietic stem cell quiescence and mobilization under stress conditions. *J Immunol*. 2009 Aug 15;183(4):2495-505.
131. Watanabe R, Nakamura H, Masutani H, Yodoi J. Anti-oxidative, anti-cancer and anti-inflammatory actions by thioredoxin 1 and thioredoxin-binding protein-2. *Pharmacol Ther*. 2010 Sep;127(3):261-70.
132. Wortsman J, Matsuoka LY, Chen TC, Lu Z, Holick MF. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *Am J Clin Nutr*. 2000 Sep;72(3):690-3.
133. Holick MF. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr*. 2004 Dec;80(6 Suppl):1678S-88S.
134. Jafri MS, Dudycha SJ, O'Rourke B. Cardiac energy metabolism: models of cellular respiration. *Annu Rev Biomed Eng*. 2001;3:57-81.
135. van Bilsen M, Smeets PJ, Gilde AJ, van der Vusse GJ. Metabolic remodelling of the failing heart: the cardiac burn-out syndrome? *Cardiovasc Res*. 2004 Feb 1;61(2):218-26.
136. Barger PM, Kelly DP. Fatty acid utilization in the hypertrophied and failing heart: molecular regulatory mechanisms. *Am J Med Sci*. 1999 Jul;318(1):36-42.
137. Finck BN, Kelly DP. PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *J Clin Invest*. 2006 Mar;116(3):615-22.
138. Huss JM, Kelly DP. Nuclear receptor signaling and cardiac energetics. *Circ Res*. 2004 Sep 17;95(6):568-78.
139. Desvergne B, Michalik L, Wahli W. Transcriptional regulation of metabolism. *Physiol Rev*. 2006 Apr;86(2):465-514.
140. Finck BN, Kelly DP. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 (PGC-1) regulatory cascade in cardiac physiology and disease. *Circulation*. 2007 May 15;115(19):2540-8.
141. Madrazo JA, Kelly DP. The PPAR trio: regulators of myocardial energy metabolism in health and disease. *J Mol Cell Cardiol*. 2008 Jun;44(6):968-75.
142. Cheng L, Ding G, Qin Q, Huang Y, Lewis W, He N, et al. Cardiomyocyte-restricted peroxisome proliferator-activated receptor-delta deletion perturbs myocardial fatty acid oxidation and leads to cardiomyopathy. *Nat Med*. 2004 Nov;10(11):1245-50.
143. Arany Z, Novikov M, Chin S, Ma Y, Rosenzweig A, Spiegelman BM. Transverse aortic constriction leads to accelerated heart failure in mice lacking PPAR-gamma coactivator 1alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Jun 27;103(26):10086-91.

144. Luptak I, Balschi JA, Xing Y, Leone TC, Kelly DP, Tian R. Decreased contractile and metabolic reserve in peroxisome proliferator-activated receptor-alpha-null hearts can be rescued by increasing glucose transport and utilization. *Circulation*. 2005 Oct 11;112(15):2339-46.
145. Arany Z, He H, Lin J, Hoyer K, Handschin C, Toka O, et al. Transcriptional coactivator PGC-1 alpha controls the energy state and contractile function of cardiac muscle. *Cell Metab*. 2005 Apr;1(4):259-71.
146. Minn AH, Hafele C, Shalev A. Thioredoxin-interacting protein is stimulated by glucose through a carbohydrate response element and induces beta-cell apoptosis. *Endocrinology*. 2005 May;146(5):2397-405.
147. Ago T, Yeh I, Yamamoto M, Schinke-Braun M, Brown JA, Tian B, et al. Thioredoxin1 upregulates mitochondrial proteins related to oxidative phosphorylation and TCA cycle in the heart. *Antioxid Redox Signal*. 2006 Sep-Oct;8(9-10):1635-50.
148. Devereux RB. Therapeutic options in minimizing left ventricular hypertrophy. *Am Heart J*. 2000 Jan;139(1 Pt 2):S9-14.
149. Ciardullo AV, Azzolini L, Bevini M, Cadioli T, Daghighi MM, Guidetti P, et al. A diagnosis of left ventricular hypertrophy on ECG is associated with a high cardiovascular risk: findings from a 40- to 69-year-old cohort in general practice. *Fam Pract*. 2004 Feb;21(1):63-5.
150. Simek CL, Feldman MD, Haber HL, Wu CC, Jayaweera AR, Kaul S. Relationship between left ventricular wall thickness and left atrial size: comparison with other measures of diastolic function. *J Am Soc Echocardiogr*. 1995 Jan-Feb;8(1):37-47.
151. Tsang TS, Barnes ME, Gersh BJ, Bailey KR, Seward JB. Left atrial volume as a morphophysiologic expression of left ventricular diastolic dysfunction and relation to cardiovascular risk burden. *Am J Cardiol*. 2002 Dec 15;90(12):1284-9.
152. Appleton CP, Hatle LK, Popp RL. Relation of transmitral flow velocity patterns to left ventricular diastolic function: new insights from a combined hemodynamic and Doppler echocardiographic study. *J Am Coll Cardiol*. 1988 Aug;12(2):426-40.
153. Hurrell DG, Oh JK, Mahoney DW, Miller FA, Jr., Seward JB. Short deceleration time of mitral inflow E velocity: prognostic implication with atrial fibrillation versus sinus rhythm. *J Am Soc Echocardiogr*. 1998 May;11(5):450-7.
154. Lindqvist P, Calcuttea A, Henein M. Echocardiography in the assessment of right heart function. *Eur J Echocardiogr*. 2008 Mar;9(2):225-34.

155. Ribeiro A, Lindmarker P, Juhlin-Dannfelt A, Johnsson H, Jorfeldt L. Echocardiography Doppler in pulmonary embolism: right ventricular dysfunction as a predictor of mortality rate. *Am Heart J.* 1997 Sep;134(3):479-87.