



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

Matheus Augusto Callegari

**Influência do sexo e do tempo sobre a remodelação cardíaca
induzida pela suplementação de vitamina D**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, Campus de Botucatu, para a obtenção do
título de Mestre em Fisiopatologia em Clínica
Médica.

Orientador: Prof. Titular Sergio Alberto Rupp de Paiva

Coorientadora: Profa. Dra. Priscila Portugal dos Santos

**Botucatu
2021**

Matheus Augusto Callegari

Influência do sexo e do tempo sobre a remodelação
cardíaca induzida pela suplementação de vitamina D

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus de
Botucatu, para a obtenção do título de Mestre
em Fisiopatologia em Clínica Médica.

Orientador: Prof. Titular Sergio Alberto Rupp de Paiva

Coorientadora: Prof. Dra. Priscila Portugal dos Santos

Botucatu

2021

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

Callegari, Matheus Augusto.

Influência do sexo e do tempo sobre a remodelação
cardíaca induzida pela suplementação de vitamina D /
Matheus Augusto Callegari. - Botucatu, 2021

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de
Botucatu

Orientador: Sergio Alberto Rupp de Paiva

Coorientador: Priscila Portugal dos Santos

Capes: 40101002

1. Ratos Wistar. 2. Nutrição. 3. Remodelação
ventricular. 4. Suplementos nutricionais. 5. Vitamina D.

Palavras-chave: Nutrição; Rato; Remodelação cardíaca;
Vitamina D.

Dedicatória

À minha família, pelas oportunidades que me foram dadas para estudar.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Sergio Alberto Rupp de Paiva pela confiança deposita em mim durante a condução desse trabalho. Agradeço por toda atenção, respeito, amizade e por me ensinar ciência de boa qualidade.

À Profa. Dra. Priscila Portugal dos Santos pela amizade, conselhos, dedicação e atenção. Todo seu apoio foi determinante para o meu desenvolvimento durante o mestrado.

Aos professores Bertha Furlan Polegato, Leonardo Antonio Mamede Zornoff, Marcos Ferreira Minicucci e Paula Schmidt Azevedo Gaiolla por todas as contribuições ao longo do projeto e oportunidades que me foram dadas.

A todos os colegas do Laboratório de Remodelação Cardíaca e Nutrição (RECAN) por todo auxílio em experimentos, amizade e companheirismo. É uma pena que a pandemia de COVID-19 tenha interrompido nossos encontros diários. Espero que em breve possamos tomar muitos lanches da tarde juntos (com muito suco e bolo!).

À minha família, por serem minha base, me permitirem lutar pelos meus sonhos e entenderem minhas ausências ao longo desses últimos anos.

À Juliana Sartori Lunardi, por ser minha companheira de vida, apoiar minhas decisões e me estimular à novos desafios.

A todos os moradores e ex-moradores da República Paracetamal por serem minha segunda família e se fazerem presentes nos momentos mais alegres e também difíceis da minha vida.

À Fabio Manoel Lopes que muito me ensinou sobre dedicação, preparo e paixão pela excelência, aspectos que carrego em todas as minhas atividades. Hoje, mais do que nunca, consigo entender que tudo que me ensinou se aplica a todos os aspectos da vida.

Aos funcionários da Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPLEX) por todo auxílio prestado no desenvolvimento do trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro por meio de bolsa de estudos (Processo 2019/15581-5).

*“(...) cantamos porque o rio está soando
e quando soa o rio / soa o rio
cantamos porque o cruel não tem nome
embora tenha nome seu destino*

*cantamos pela infância e porque tudo
e porque algum futuro e porque o povo
cantamos porque os sobreviventes
e nossos mortos querem que cantemos*

*cantamos porque o grito só não basta
e já não basta o pranto nem a raiva
cantamos porque cremos nessa gente
e porque venceremos a derrota (...)”*

(Por que cantamos – Mario Benedetti)

Resumo

CALLEGARI, M. A. **Influência do sexo e do tempo sobre a remodelação cardíaca induzida pela suplementação de vitamina D.** 2021. 64 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2021.

A deficiência de vitamina D (VitD) é considerada problema de saúde pública. Por conta disso, profissionais têm incentivado suplementação de VitD. Contudo, VitD possui curva dose-resposta bifásica na fisiopatologia cardiovascular, sendo que tanto deficiências como excessos podem ser prejudiciais. Estudo conduzido anteriormente por nosso grupo de pesquisa mostrou que a suplementação de doses excessivas não hipercalcêmicas de VitD por 2 meses em ratos Wistar machos resultou em processo de agressão ao coração por meio de estresse oxidativo (EO). O EO pode ativar diferentes vias a depender de sua intensidade e duração. Assim, é necessário definir quais as vias envolvidas no processo, bem como em que momento ocorrem o início das alterações. Outra importante questão é se se essas alterações também ocorrem no sexo feminino, visto que o metabolismo da VitD parece ser diferente entre homens e mulheres. O presente trabalho teve como objetivo avaliar se a suplementação de vitamina D leva a diferentes alterações cardíacas em ratos machos e fêmeas e se essas são dependentes do tempo. Para isso, foram utilizados 72 ratos Wistar machos e 72 ratos Wistar fêmeas pesando, aproximadamente, 250g e 200g, respectivamente. Os animais machos e fêmeas foram alocados para receber ração padrão sem e com a suplementação de VitD (+10000 UI/kg de ração) e distribuídos em grupos de acordo com o tempo de duração da suplementação (20, 40 e 60 dias). Desta maneira, foram formados 12 grupos (n=12). Após o período experimental, os animais foram eutanasiados e realizada coleta de materiais para análises. A comparação entre grupos foi feita por ANOVA de três vias levando em consideração os fatores sexo, suplementação e tempo. Houve diferença entre os sexos em relação ao peso corporal e consumo de ração que foram maiores nos animais machos. A avaliação bioquímica mostrou que a suplementação de VitD promoveu aumento de cálcio sérico de forma tempo dependente, mas que não caracterizou hipercalcemia. Os animais suplementados com VitD também apresentaram valores maiores de heme oxigenase-1 e alteração no comportamento das proteínas envolvidas na via do NF-kB e de apoptose celular. Esses dados mostram que a suplementação de vitamina D em doses excessivas leva a alterações bioquímicas e moleculares no coração provavelmente por EO de média intensidade e que o tempo de suplementação é fator importante para a observação dessas alterações.

Palavras-chave: remodelação cardíaca; nutrição; rato; NF-kB.

Abstract

CALLEGARI, M. A. **Influence of sex and time on cardiac remodeling induced by vitamin D supplementation.** 2021. 64 f. Dissertation (Masters) - Faculty of Medicine of Botucatu, São Paulo State University, Botucatu, 2021.

Vitamin D (VitD) deficiency is considered a public health problem. As a consequence, health professionals have encouraged the supplementation of VitD. However, VitD has a biphasic dose-response curve in cardiovascular pathophysiology, and deficiencies and excesses can be harmful. A previous study conducted by our research group showed that VitD supplementation in excessive doses for 2 months in male Wistar rats resulted in a process that is aggressive to the heart through oxidative stress (OS). OS can activate different pathways depending on their intensity and duration. Thus, it is necessary to define which paths are involved in the process, as well as when the changes start. Another important question is whether these changes also occur in females, as the metabolism of VitD appears to be different between both sexes. The present work aimed to evaluate whether vitamin D supplementation leads to different cardiac changes in male and female rats and whether these are time-dependent. For this, 72 male Wistar rats and 72 female Wistar rats weighing approximately 250g and 200g, respectively, were used. The animals were allocated to receive standard chow without and with VitD supplementation (+10000 UI / kg of feed) and distributed into groups according to the duration of supplementation (20, 40, and 60 days). Therefore, 12 groups were formed (n = 12). After the experimental period, the animals were euthanized and the material was collected for analysis. The comparison between groups was made by three-factor ANOVA, taking into account the factors sex, supplementation, and time. There were differences between the sexes for body weight and feed intake which were higher in male animals. The biochemical evaluation showed that VitD supplementation promoted a time-dependent increase in serum calcium, but that it did not characterize hypercalcemia. In addition, the animals also presented higher values of heme oxygenase-1 and alteration in the behavior of proteins involved in the NF- κ B pathway and cellular apoptosis. These data show that vitamin D supplementation in excessive doses leads to biochemical and molecular changes in the heart, probably due to medium OS intensity and that the supplementation time is an important factor for the observation of these changes.

Keywords: cardiac remodeling; nutrition; mouse; NF- κ B.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	9
2. HIPÓTESES.....	12
3. OBJETIVOS.....	13
4. MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1. Delineamento Experimental	13
4.2. Preparo das rações.....	14
4.3. Doses de vitamina D utilizadas.....	14
4.4. Coleta de material biológico	15
4.5. Determinação sérica de Cálcio e Fósforo séricos.....	16
4.6. Atividade de tiorredoxina.....	16
4.7. Determinação do malondialdeído (MDA)	17
4.8. Determinação da expressão proteica por Western blot.....	17
4.9. Análise estatística.....	20
5. RESULTADOS.....	21
5.1. Peso corporal dos animais, consumo diário de ração, cálcio sérico e fósforo sérico	21
5.2. Estudo morfométrico do coração	27
5.3. Determinação do malondialdeído (MDA)	29
5.4. Determinação da atividade da tiorredoxina (Trx).....	31
5.5. Análise de expressão das proteínas da via HO-1, GPx-1 e Keap-1/Nrf-2	34
5.5. Análise de expressão das proteínas da via do Fator Nuclear Kappa B.....	37
5.6. Análise de expressão de proteínas das vias apoptóticas BAX, Bcl-2 e AIF.....	45
6. DISCUSSÃO.....	48
7. CONCLUSÃO	55
8. REFERÊNCIAS.....	56

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos grande ênfase tem sido dada ao estudo da vitamina D (VitD). Embora apresente esse nome, a VitD pode ser melhor classificada como pró-hormônio, porque possui estrutura esteróide lipossolúvel que lhe permite desempenhar ações endócrinas, parácrinas e autócrinas. Além disso, sua obtenção pode ocorrer por meio de síntese endógena ou ingestão de alimentos, diferentemente das demais vitaminas, que, por definição, só podem ser obtidas por meio da alimentação¹.

A VitD apresenta duas formas químicas principais: colecalciferol (Vitamina D₃), obtida por meio da exposição da pele de animais aos raios solares; e ergocalciferol (Vitamina D₂), produzido somente por plantas e leveduras. A síntese cutânea representa a maior fonte de VitD em indivíduos saudáveis suprimindo, aproximadamente, 80% da necessidade diária, sendo o restante obtido pelo consumo de alimentos fontes de origem animal e vegetal. Entre os principais alimentos fontes de VitD podemos destacar peixes gordurosos (salmão, atum, sardinha), ovos, cogumelos e alimentos fortificados².

A produção do colecalciferol nos animais acontece por meio da desestabilização de moléculas de 7-deidrocolesteol (7-DHC) presentes na epiderme por raios ultravioletas (UVB), produzindo substância denominada pré-colecalciferol. Em seguida, por meio de isomerização resultante da ação da temperatura, a mesma é convertida em colecalciferol. Porém, o colecalciferol não representa a forma ativa da VitD, sendo que, para desempenhar suas ações no organismo, é necessário que ocorram processos de ativação por meio de hidroxilações por enzimas. Para isso, a VitD é transportada na corrente sanguínea por meio da proteína transportadora de VitD (*D-binding protein* - DBP) até o fígado, onde é hidroxilada pela enzima 25-hidroxilase, produzindo o 25-hidroxicolecalciferol (25(OH)D₃). A segunda etapa de ativação consiste em nova hidroxilação pela enzima 1-alfa-hidroxilase, que é expressa por ampla gama de tecidos e tipos celulares, como rim, cardiomiócitos e macrófagos, formando 1,25-di-hidroxivitamina D (1,25(OH)D₃), o metabólito ativo da VitD^{3,4}.

Após esse processo de síntese/ingestão e ativação, a 1,25(OH)D₃ circula pela corrente sanguínea também ligada à DBP e atua sobre células alvo por meio do receptor da vitamina D (VDR). Após o reconhecimento da VitD pelo VDR, ocorre a ligação e internalização do mesmo para dentro da célula que é reconhecido pelo receptor rexinóide (RXR) formando dímero, o que permite ações sobre a transcrição gênica no núcleo celular por meio de acoplamento à elementos de resposta à vitamina D (*vitamin D response element* – VDRE)⁵. A ativação do VDRE parece

regular a expressão de grande número de genes o que coloca a VitD como importante regulador de diversas ações biológicas^{6,7}.

As ações da VitD podem ser definidas em clássicas e não clássicas. As ações clássicas dizem respeito ao metabolismo do cálcio e fósforo e suas comorbidades, como osteoporose e osteomalácia^{8,9}, sendo essas as primeiras atividades descritas da VitD no organismo. De forma mais recente, descobriu-se que quase todos os tipos celulares possuem VDR, sendo possíveis alvos de ações biológicas da VitD definidas como não-clássicas. Entre as ações não-clássicas de VitD podemos destacar seu papel sobre o sistema imunológico atuando na resposta inflamatória, multiplicação e diferenciação celular e na regulação da função cardíaca⁸.

Ao mesmo tempo em que tais descobertas se mostram animadoras, estudos epidemiológicos observaram alta prevalência de deficiência de VitD na população, sendo considerada problema de saúde pública¹⁰. Até pouco tempo pensava-se que a deficiência de VitD estaria concentrada em países com baixa exposição a raios UVB, mas atualmente sabe-se que a deficiência de VitD também é relacionada a outros fatores de ordem comportamental e clínica, entre eles o aumento da idade, pigmentação da pele, obesidade e problemas nos processos de absorção e metabolização da vitamina¹¹⁻¹³. A partir dessas constatações iniciou-se intenso debate sobre quais são os valores séricos ideais de VitD e o quanto é necessário de vitamina para atingir tal necessidade.

A recomendação diária de VitD varia conforme a idade, sendo que o Institute of Medicine (IOM) recomenda 600UI para adultos saudáveis e 800UI para pessoas com mais de 70 anos, o que, segundo o IOM, é suficiente para manter os valores séricos de VitD dentro da concentração desejável de 20 ng/ml¹⁴. Porém, essa recomendação tem sido questionada por outras entidades tendo em vista que a maioria dos estudos apontam que concentrações mais altas de VitD, entre 30-50 ng/ml, parecem oferecer maior benefício para a saúde, sendo necessárias quantidades maiores de VitD ao dia¹⁵⁻¹⁷. Diante desse cenário de alta prevalência de deficiência/insuficiência e dos múltiplos benefícios da VitD houve aumento da procura por suplementos desse nutriente, tanto por meio de automedicação como também pela prescrição de profissionais de saúde para prevenção e tratamento de doenças. Porém, não é incomum observarmos prescrições de doses acima da quantidade de ingestão máxima tolerável diária (UL), atualmente fixada em 4000 UI/dia¹⁴. Isso se mostra preocupante, pois, embora possua papel primordial no funcionamento e desenvolvimento cardíaco, a VitD parece possuir dose-resposta bifásica na fisiopatologia cardiovascular, sendo que, tanto a deficiência como doses

excessivas, podem causar alterações cardiovasculares prejudiciais¹⁸⁻¹⁹. Contudo, os mecanismos envolvidos nesses processos ainda não são totalmente estabelecidos.

Nosso laboratório tem se dedicado ao estudo da influência da VitD no processo de remodelação cardíaca. A remodelação cardíaca diz respeito a alterações no tamanho, geometria, função e massa do coração como resultado de variações moleculares, celulares e intersticiais no tecido cardíaco em resposta a uma determinada agressão que, ao longo do tempo, podem culminar em disfunção cardíaca²⁰. Em estudo desenvolvido por Santos (2016)²¹ foi observado que a suplementação excessiva de VitD, porém em doses não hipercalcêmicas, por 2 meses em ratos Wistar machos provocou aumento do estresse oxidativo no tecido cardíaco por meio da diminuição da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx-1), bem como aumento de hidroperóxido de lipídio (HL), além de aumento de mediadores inflamatórios (fator de necrose tumoral- α , interferon- γ , interleucina-10 e molécula de adesão intercelular-1) e da expressão da proteína pró apoptótica caspase-3-clivada²¹. Em um segundo momento de avaliação aos 4 meses, os animais evoluíram com hipertrofia cardíaca e disfunção diastólica²¹. Esses resultados mostram que a suplementação de doses excessivas de VitD parece desempenhar processo de agressão contínuo no tecido cardíaco por meio de estresse oxidativo, acarretando remodelação cardíaca. Contudo, ainda restam dúvidas sobre em qual momento se iniciam as alterações, pois essas podem ter iniciado em períodos mais precoces, bem como se há participação de outras vias metabólicas no processo fisiopatológico.

O sistema antioxidante celular é finamente regulado e dependente de uma série de fatores, como duração, intensidade e tipo de agente indutor que ativam de forma gradual diferentes vias antioxidantes²². Por exemplo, em condições de estresse oxidativo de baixa intensidade ocorre a ativação do sistema antioxidante Kelch-like ECH-associated Protein 1 (Keap-1)/Fator Nuclear Eritróide (Nrf-2) que atua como fator de transcrição de enzimas antioxidantes, como glutathione peroxidase, heme-oxigenase e tiorexodina redutase²². Já em situações de estresse oxidativo de média intensidade ocorre a ativação da via do Fator Nuclear-kB (NF-kB) que também possui ações a nível nuclear e participa da transcrição de enzimas antioxidantes e proteínas inflamatórias, como ciclooxygenase-2 e citocinas. Quando o estresse é de alta intensidade o sistema antioxidante é suprimido e há abertura de canais mitocondriais e estímulo de proteínas pró-apoptóticas, como caspase-3 e fator indutor de apoptose (AIF)^{22,23}. Levando em consideração que a agressão provocada por altas doses de VitD parece ser processo de agressão contínuo, é possível que o tempo de suplementação seja fator determinante sobre

quais vias serão ativadas na remodelação cardíaca, em que quanto maior o tempo de suplementação maior o estresse oxidativo.

Outra importante dúvida é se essas alterações também ocorrem no sexo feminino, pois estudos clínicos têm mostrado que o metabolismo da VitD parece ser diferente entre os sexos. É descrito que mulheres apresentam menores valores séricos de VitD²⁴, maiores concentrações de DBP²⁵ e menor variação sazonal das concentrações desta vitamina em relação aos homens²⁶. Ainda não se sabe ao certo o porquê dessa diferença no metabolismo entre os sexos, mas as principais hipóteses dizem respeito a diferenças hormonais e na quantidade de tecido adiposo. Em relação aos hormônios, enquanto homens apresentam maiores quantidades de hormônios andrógenos, como a testosterona, as mulheres possuem maiores concentrações de estrógeno e progesterona. A VitD parece regular positivamente a produção desses hormônios nos dois sexos, mas tem sido especulado que o estrógeno possa participar da conversão de 25(OH)D3 em 1,25(OH)D3 permitindo uma resposta amplificada da VitD pelo organismo²⁷. Quanto ao tecido adiposo esse serve como reservatório de VitD devido ao caráter lipossolúvel da vitamina que pode ser sequestrada pelos adipócitos²⁸. É sabido que a quantidade e distribuição dos depósitos de gordura são diferentes entre os sexos, sendo que mulheres apresentam maior quantidade de tecido adiposo e com concentração na região subcutânea enquanto homens possuem menor quantidade de tecido adiposo com maior concentração na região visceral²⁹. Essas diferenças no tecido adiposo entre os sexos podem ser decisivas no sequestro de VitD e, conseqüentemente, no desempenho da vitamina no organismo. Sendo assim, é necessário verificar se as repercussões causadas pela suplementação de doses excessivas de VitD também ocorrem no sexo feminino e se essa é diferente da apresentada por animais machos.

2. HIPÓTESES

Diante do apresentado, levantamos duas hipóteses de pesquisa:

- i) A suplementação com dose excessiva não hipercalcêmica de VitD acarreta em agressão de baixa, média e alta intensidade ao coração com diferentes respostas bioquímicas e moleculares em diferentes tempos;
- ii) Animais do sexo feminino suplementadas com dose excessiva não hipercalcêmica de VitD apresentam respostas bioquímicas e moleculares diferentes de animais do sexo masculino.

3. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é avaliar se a suplementação de vitamina D leva a diferentes alterações cardíacas em ratos machos e fêmeas e se essas alterações são dependentes do sexo e do tempo de suplementação.

4. MATERIAL E MÉTODOS

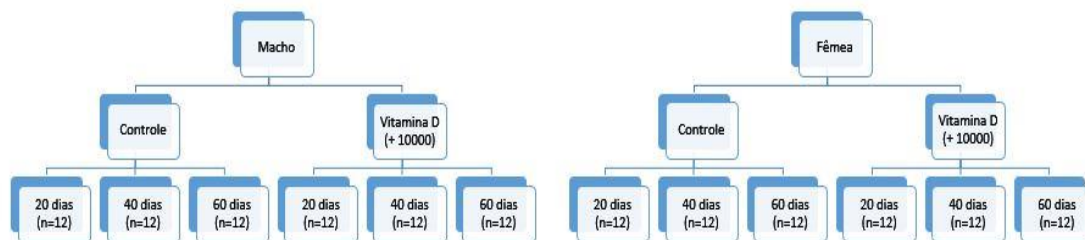
4.1. Delineamento Experimental

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP) (Projeto nº 1296/2019).

Foram utilizados 72 ratos Wistar machos e 72 ratos Wistar fêmeas com peso aproximado de 250g e 200g, respectivamente. Os animais foram acondicionados no Biotério da Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX) da Faculdade de Medicina – UNESP, Botucatu.

Os animais foram alocados para receber ração padrão sem e com a suplementação de VitD (10000 UI/kg de ração) e distribuídos em grupos de acordo com o tempo de duração da suplementação (20, 40 e 60 dias) e sexo (machos e fêmeas). Aqueles que não receberam suplementação foram denominados como controles (C) e os que receberam suplementação de VitD foram denominados como Vitamina D (VD). Desta maneira, foram formados 12 grupos (n=12): C20M, C20F, C40M, C40F, C60M, C60F, VD20M, VD20F, VD40M, VD40F, VD60M e VD60F (onde M = ratos machos; F = ratas fêmeas; C = ração padrão sem suplementação de vitamina D; VD = ração padrão com suplementação de vitamina D; 20, 40 e 60 = tempo de duração da suplementação em dias).

Os animais foram colocados em gaiolas individuais com livre acesso à água e expostos a ciclo claro-escuro de 12h, à temperatura ambiente de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$. A ingestão alimentar foi monitorada três vezes por semana, sendo que todos os animais receberam a mesma quantidade de ração, e o peso corporal (PC) medido semanalmente. Foi realizado enriquecimento ambiental utilizando as técnicas de Gozzer et al. (2018)³⁰, que são uso de objetos como bolas, canos de PVC, rolhas, chocalhos e objetos de plástico. Após o período determinado, os animais foram eutanasiados e realizada coleta de material biológico para análises.

Figura 1 - Delineamento experimental

Fonte: elaborado pelo autor

4.2. Preparo das rações

A ração utilizada para o grupo controle e para a fabricação da ração suplementada 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 foi de 220g de proteína, 40g de gordura, 100g de mineral, 80g de fibra, e 1800 UI de VitD. Para o preparo da ração suplementada, primeiramente o colecalciferol (Sigma-Aldrich, MO, USA) foi diluído em óleo de milho (10 ml/kg de ração), e posteriormente adicionado à ração triturada. Em seguida, 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).

4.3. Doses de vitamina D utilizadas

O Institute of Medicine (IOM) realizou uma revisão para identificar as Dietary Reference Intakes (DRIs) para VitD em seres humanos. Nas DRIs foi definida que a necessidade média estimada (EAR) de VitD é de 400 UI/dia e que o limite superior tolerável (valor acima do qual podem ocorrer efeitos deletérios - UL) é dez vezes maior (4.000 UI/dia)³¹. Porém, informações sobre as necessidades de VitD em ratos são limitadas. O National Research Council (NRC) recomenda a quantidade de 1.000UI de VitD por kg de ração para ratos³². Entretanto, não foi definido concentração máxima de tolerância de ingestão de VitD em ratos. Com base nisso, as doses de VitD utilizadas em nosso experimento foram definidas a partir do estudo de Santos (2016)²¹, que suplementou valores 10 vezes maiores dos estabelecidos pela NRC (10.000 UI/kg de ração). Neste estudo os ratos do sexo masculino consumiram, em média,

25g de ração²¹. Assim, sabendo que cada grama de ração fornece 1,8 UI de VitD; a ração ofereceu 45 UI e a suplementação na ração ofertou 250 UI/dia, totalizando 295 UI/dia de VitD. Contudo, animais do sexo feminino consomem valores menores de ração diariamente. Na experiência de nossa instituição, animais Wistar do sexo feminino consomem em média 17g de ração ao dia. A diferença de consumo médio diário de ração entre machos e fêmeas é de 8g, então a diferença de consumo diário de VitD entre os sexos é de 14 UI. Dessa forma, a suplementação na ração dos animais do sexo feminino foi de 264,4 UI/dia (250 UI + 14 UI de VitD). A correção da quantidade de VitD teve o intuito de assegurar que ambos os grupos suplementados consumissem a mesma quantidade de VitD (295 UI).

Shepard & DeLuca³³ mostraram que ratos suplementados com doses acima de 1.000UI de VitD por dia (~40.000UI/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. As doses usadas em nosso estudo não atingiram a dose de 1.000UI/dia considerada tóxica por Shepard & DeLuca (1980)³³. Além disso, estudo anterior realizado em nosso laboratório mostrou que essas doses de VitD não causaram hipercalcemia³⁴. Portanto, as doses usadas no presente estudo são consideradas excessivas, porém não hipercalcêmicas.

4.4. Coleta de material biológico

Os animais foram eutanasiados com dose excessiva de tiopental sódico (180 mg/kg) por via intraperitoneal e posteriormente decapitados. Foram então coletados o sangue em tubo sem heparina, totalizando 3 ml de soro. Posteriormente, o tórax dos animais foi aberto e o coração coletado integralmente e dissecado em ventrículos e átrios.

O sangue foi centrifugado a 3.000 rpm por 20 min a 4°C. O soro obtido foi congelado a -80°C para dosagem de cálcio, fósforo e 25 (OH) D₃.

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

4.5. Determinação sérica de Cálcio e Fósforo séricos

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.

A dosagem de fósforo inorgânico foi realizada por método colorimétrico (teste kit Laborlab, Laborlab Produtos para Laboratório, SP, Brasil). O fosfato inorgânico presente no soro reage em meio ácido com molibdato e obtém-se o complexo fosfomolibdato, que é reduzido pelo ácido ascórbico a azul de molibdeno, desenvolvendo-se a cor em meio arsenito/citrato. O arsenito/citrato combina-se com o excesso de molibdato impedindo sua reação posterior com o fosfato liberado dos estéreis lábeis. A cor obtida foi medida entre 620 e 650 nm.

4.6. Atividade de tioredoxina

A atividade da Trx foi realizada por meio de ensaio de redução de insulina³⁵. Inicialmente, 60 mg do ventrículo esquerdo foi homogeneizado com 500 µl 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 em aparelho Polytron (Ika Ultra TurraxTM T25 Basic, Wilmington USA). A seguir, as amostras foram centrifugadas por 20 min, a 12.000 rpm e a 4° C. A concentração de proteína total foi analisada pelo método de Bradford utilizando curva de BSA Protein Standard (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) como padrão³⁶.

Para determinação da atividade da Trx, cada amostra, 20 µg de proteína total, em um volume de 5 µl, foi pipetada em duplicata em placa de Elisa de 96 poços. Todas as amostras foram incubadas com 1 µl de tampão de ativação (50 mM de HEPES; 1 mM EDTA; 1 mg/ml de BSA; 1,75 mM DTT) a 37°C durante 15 min. Posteriormente, as amostras foram misturadas com 16,5 µl de solução com insulina (660 mM de NADPH; 3 mM de EDTA; 0,3 mM de insulina). Em seguida, foi pipetado em um conjunto de amostras 2,5 µl de HEPES e no segundo conjunto de amostras 2,5 µl de TrxR. Todas as amostras foram incubadas à 37°C por 30 minutos. Após esse período, foi adicionada solução de guanidina/DTNB e realizada leitura em

espectrofotômetro à 412 nm. A atividade TrxR foi quantificada pela diferença da absorbância entre o poço contendo Trx e o poço controle.

4.7. Determinação do malondialdeído (MDA)

Para a quantificação do MDA no tecido cardíaco, 100 mg do VE foi homogeneizado com 1 ml de tampão salina fosfato (PBS) em 2 séries de 120 segundos em banho de gelo e posteriormente centrifugadas por 5 min a 10.000 rpm a 4° C. Posteriormente, 250 µL de sobrenadante foram adicionados a 750 µL de ácido tricloroacético a 10% para precipitação de proteínas. As amostras foram centrifugadas (3000 rpm, durante 5 minutos; Eppendorf® Centrifuge 5804-R, Hamburgo, Alemanha) e o sobrenadante retirado. Foi adicionado ácido tiobarbitúrico (TBA) na proporção de 0,67% (1:1) e as amostras foram aquecidas por 60 minutos a 100°C. O MDA reage com TBA na proporção 1:2 (MDA:TBA). Após o resfriamento, foi realizada leitura a 535nm no leitor de microplacas Spectra Max 190 (Molecular Devices®, Sunnyvale, CA, EUA). A concentração de MDA foi obtida pelo coeficiente de extinção molar ($1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e a absorção das amostras e o resultado final relatado em nmol/g de proteína^{37,38}.

4.8. Determinação da expressão proteica por Western blot

Western blot foi realizado para determinação da expressão protéica da via antioxidante Keap-1/Nrf-2 (expressão do Keap-1, Nrf-2, glutathione peroxidase-1 (GPx-1) e heme oxigenase-1 (HO-1)) e do Fator Nuclear Kappa B (NF-κB) (IκB e subunidade p65 do NF-κB); para avaliação das vias de apoptose (expressão da BAX, Bcl-2 e do AIF).

a) Extração e fracionamento subcelular.

Amostras do VE foram homogeneizados com tampão A contendo 20 mM HEPES-KOH, pH 7,5, 10 mM de KCl, 1,5 mM MgCl₂, 1 mM de EDTA, 1 mM de EGTA, 10 mM de benzamidina, 1 mM de ditiotretol, 250 mM de sacarose, além de protease e inibidores de fosfatase, em aparelho Polytron (Ika Ultra Turrax™ T25 Basic, Wilmington USA) e posteriormente fracionadas por centrifugação diferencial. Resumidamente, o homogenato foi centrifugado duas vezes a 500 g durante 5 min a 4°C, e o pellet (considerada a fração nuclear)

foi ressuspensionado em tampão A, sonificado 2 vezes de 10s, e armazenado a -80°C . O sobrenadante foi novamente centrifugado, a 10.000 g por 30 min a 4°C . O pellet (considerado a fração mitocondrial) foi ressuspensionado em tampão A, sonificado, e armazenado a -80°C . O sobrenadante será novamente centrifugado a 100.000 g durante 1 h a 4°C . O sobrenadante resultante será considerado a fração citoplasmática e armazenado a -80°C ³⁹. A concentração de proteína total foi analisada pelo método de Bradford utilizando curva de BSA Protein Standard (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) como padrão³⁶.

b) 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 min. Posteriormente, as amostras (contendo 50 μg de proteína total) foram separadas por eletroforese utilizando sistema Mini-Protean 3 ElectrophoresisCell (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%).

c) Transferência e Bloqueio

Após a corrida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em sistema Mini - TransBlot (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 min à temperatura ambiente sob constante agitação.

d) 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 90 minutos à temperatura ambiente sob agitação constante. Posteriormente a membrana foi lavada em solução basal pH 8,0 e a imunodeteção realizada por meio do método de quimioluminescência utilizando o Kit Super Signal 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: Keap1, mouse monoclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 515432); 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, mouse monoclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 133160); p-I κ B- α , rabbit polyclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 101713); I κ B total, mouse monoclonal IgG1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 1643); Ser 536 p-p65 NF- κ B, rabbit polyclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 33020); NF- κ B total, rabbit polyclonal IgG (Santa Cruz

Biotechnology, Inc, Europe, sc 7151); Bax, mouse monoclonal IgG (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA, 6A7); Bcl-2, rabbit monoclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 492); AIF mouse monoclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 13116); GAPDH, mouse monoclonal IgG1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 32233).

Os Anticorpos secundários utilizados foram: Goat anti-mouseIgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 2005); Goat anti-rabbitIgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 2004).

4.9. Análise estatística

Os valores obtidos são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Os resultados de cada variável foram submetidos à verificação da normalidade e de igualdade de variância. No caso de a variável não ter passado a normalidade ou a igualdade de variância, estas foram submetidas à melhor transformação matemática. Como nosso estudo leva em consideração a influência de três fatores (suplementação, sexo e tempo) e de suas interações sobre os parâmetros avaliados, optou-se pela utilização de Anova de 3 vias.

O teste Anova de três vias avaliou os efeitos de cada fator sobre as variáveis estudadas, independentemente do efeito do outro fator, bem como a interação de cada dois fatores (suplementação x sexo; suplementação x tempo e sexo x tempo) e a interação entre os três fatores (suplementação, sexo e tempo). Quando ocorre interação significativa entre os fatores ($p < 0,05$), torna-se importante identificar os grupos que apresentam diferença entre si. Para tanto, utilizou-se o teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak. No caso de interação entre os fatores, os dados foram representados em gráficos de barra tridimensionais, de modo a permitir a visualização dos seis grupos (quando a interação de cada dois fatores) e dos doze grupos (quando a interação for dos três fatores), em que cores diferentes indicam diferença significativa entre os grupos. Já em caso de diferença significativa levando em consideração apenas o fator suplementação os dados foram apresentados em gráficos de barras bidimensional.

5. RESULTADOS

O presente trabalho teve como objetivo avaliar se a suplementação de vitamina D em doses excessivas leva a diferentes alterações cardíacas em ratos machos e fêmeas e se essas são dependentes do tempo. Sendo assim, as comparações relacionadas somente ao sexo dos animais e tempo não respondem ao objetivo do trabalho, visto que essas dizem respeito a diferenças fisiológicas e estruturais entre os animais. Assim, será dada ênfase aos dados relacionados à influência da suplementação de VitD e de suas interações com os demais fatores. Quando os fatores sexo e tempo forem determinantes para o entendimento da influência da suplementação de VitD sobre as variáveis, esses serão descritos e posteriormente discutidos.

5.1. Peso corporal dos animais, consumo diário de ração, cálcio sérico e fósforo sérico

Os dados de peso corporal final, consumo diário de ração, cálcio sérico e fósforo sérico são apresentados na Tabela 1. Houve interação entre os fatores sexo e tempo para peso corporal final ($p < 0,001$). Quanto a relação do tempo, observou-se que o peso corporal final de ambos os sexos aumentou com o passar do tempo, sendo que entre os machos o peso corporal diferiu em todos os tempos, ao passo que entre as fêmeas não houve diferença nos tempos 40 e 60 dias (Figura 2). Em relação as diferenças dos sexos, os animais machos apresentaram valores de peso superiores em relação a animais fêmeas em todos os tempos (Figura 3).

Foi observada diferença entre os sexos em relação ao consumo de ração (Tabela 1). Esse resultado era previsto, pois, fisiologicamente, animais fêmeas consomem menos alimento em relação aos animais machos. Os resultados mostram que os machos consumiram, aproximadamente, 25g de ração e as fêmeas 17g (Figura 4). Esses achados se mostram importantes, pois os ajustes das doses de suplementação de VitD na ração foram realizadas tendo como base as mesmas médias de consumo.

Em relação à análise bioquímica, nossos dados mostram interação entre os fatores suplementação e tempo para a variável cálcio sérico (Tabela 1). Primeiramente, observa-se que os animais VD no tempo 20 dias exibiram valores maiores de cálcio sérico em relação aos animais suplementados nos demais tempos, não sendo esse padrão observado entre os controles (Figura 5). Além disso, animais VD no tempo 20 dias apresentam valores maiores de cálcio sérico em relação aos animais do grupo controle do respectivo tempo (Figura 6). Dessa maneira, a suplementação de VitD alterou o comportamento do cálcio sérico, ocorrendo aumento no

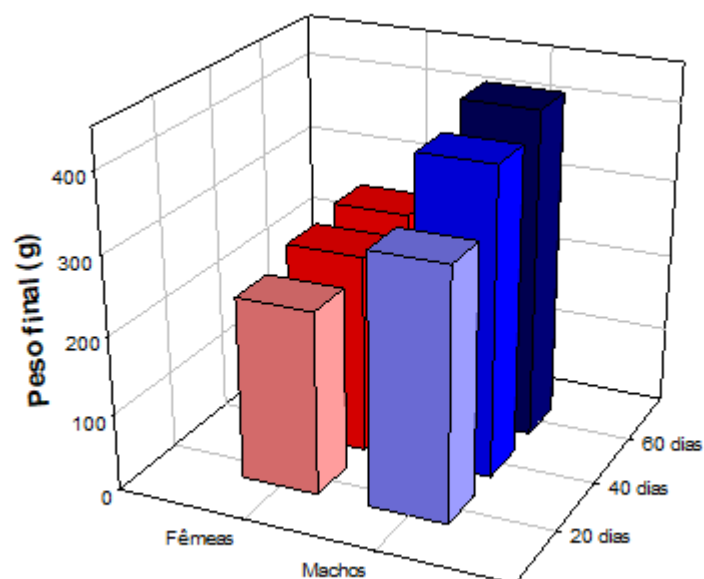
período inicial da suplementação (20 dias) e posterior queda e estabilização para valores similares ao do grupo controle nos outros tempos (40 e 60 dias). Esse comportamento não se repetiu na avaliação de fósforo sérico, sendo observada apenas diferença nos valores exibidos entre os sexos, portanto, apenas diferença fisiológica ($p < 0,001$).

Tabela 1. Peso corporal dos animais, consumo diário de ração e parâmetros bioquímicos.

Variável	Peso final (g)	Consumo de ração (g/dia)	Cálcio sérico (mg/dl)	Fósforo sérico (mg/dl)
C20M	320±20	25,1±0,9	11,1±0,5	7,76±0,67
C40M	398±21	26,0±2,2	10,9±0,6	7,28±1,18
C60M	420±23	25,7±1,2	11,0±0,5	7,32±0,65
VD20M	327±23	25,3±1,3	11,5±1,0	7,70±0,76
VD40M	393±25	25,7±2,2	11,3±0,4	7,07±0,61
VD60M	424±34	25,7±1,5	10,9±0,4	7,31±0,68
C20F	235±13	16,7±1,1	10,8±0,8	6,28±0,78
C40F	259±16	17,1±1,1	10,7±1,0	6,58±1,17
C60F	265±14	17,7±1,0	11,1±0,4	6,22±0,71
VD20F	237±15	16,9±1,2	11,4±0,8	5,97±0,79
VD40F	254±11	17,3±0,9	10,6±0,5	6,10±1,23
VD60F	266±14	17,1±1,6	10,8±0,3	6,21±0,78
P (sexo)	<0,001	<0,001	0,097	<0,001
P (suplementação)	0,813	0,824	0,137	0,242
P (tempo)	<0,001	0,081	0,026	0,579
P (sexo x suplementação)	0,598	0,985	0,409	0,557
P (sexo x tempo)	<0,001*	0,799	0,255	0,121
P (suplementação x tempo)	0,470	0,664	0,045&	0,663
P (sexo x suplementação x tempo)	0,964	0,619	0,617	0,917

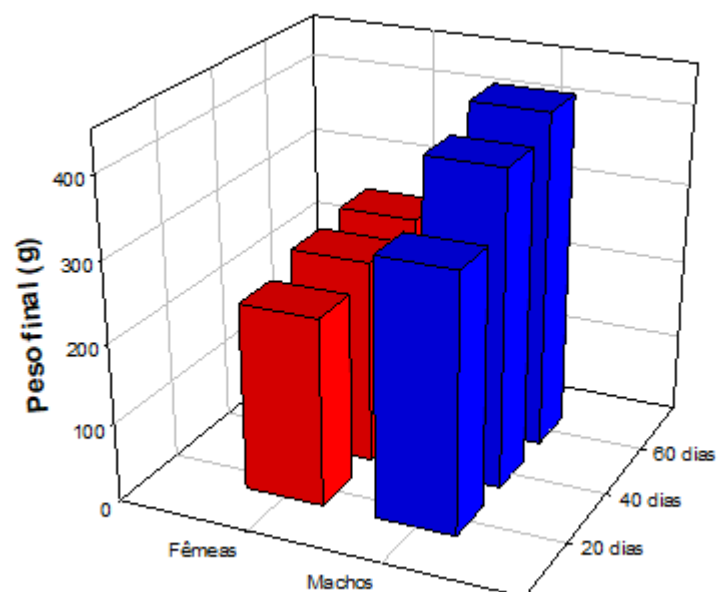
Dados expressos em média ± desvio padrão, n: números de animais em cada grupo. C20M: grupo controle animais machos, sem suplementação de colecalciferol por 20 dias; C40M: grupo controle animais machos, sem suplementação de colecalciferol por 40 dias; C60M: grupo controle animais machos, sem suplementação de colecalciferol por 60 dias; VD20M: grupo de animais machos com suplementação de colecalciferol por 20 dias; VD40M: grupo de animais machos com suplementação de colecalciferol por 40 dias; VD60M: grupo de animais machos com suplementação de colecalciferol por 60 dias; C20F: grupo controle animais fêmeas, sem suplementação de colecalciferol por 20 dias; C40F: grupo controle animais fêmeas, sem suplementação de colecalciferol por 40 dias; C60F: grupo controle animais fêmeas, sem suplementação de colecalciferol por 60 dias; VD20F: grupo de animais fêmeas com suplementação de colecalciferol por 20 dias; VD40F: grupo de animais fêmeas com suplementação de colecalciferol por 40 dias; VD60F: grupo de animais fêmeas com suplementação de colecalciferol por 60 dias. * Machos > Fêmeas nos tempos 20, 40 e 60 dias; Machos 20 dias < Machos 40 dias < Machos 60 dias; Fêmeas 20 dias < Fêmeas 40 dias = Fêmeas 60 dias. & C20 < VD20; VD20 > VD40 = VD60; C20 = C40 = C60.

Figura 2. Influência do sexo sobre peso corporal final (g). Comparação de animais machos e fêmeas nos diferentes tempos.



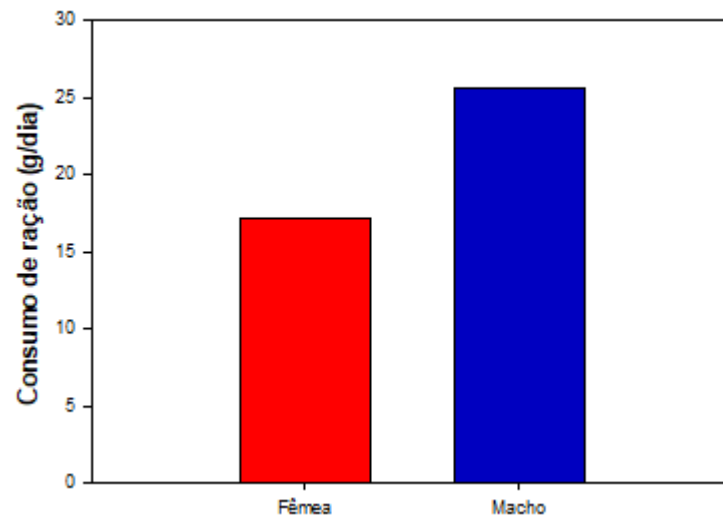
Tonalidades de cores diferentes indicam diferença significativa dentro dos tempos em cada sexo. Valores expressos em média.

Figura 3. Influência do sexo sobre peso corporal final (g). Comparação entre animais machos e fêmeas nos diferentes tempos.



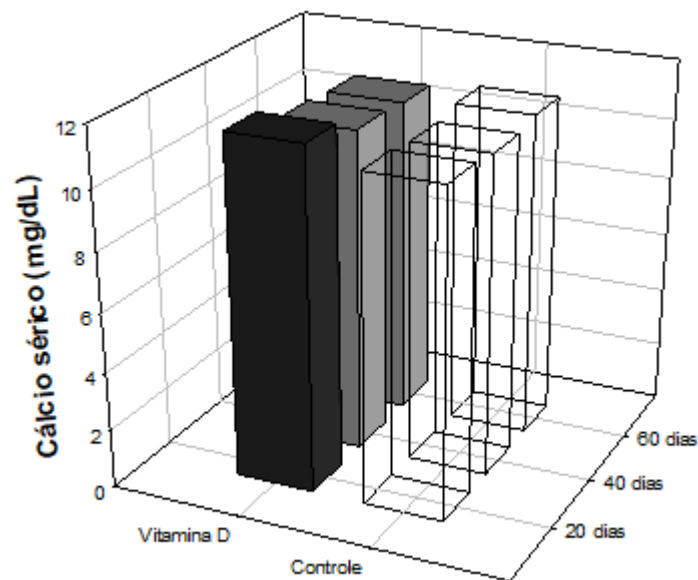
Cores diferentes indicam diferença significativa entre os sexos em cada tempo. Valores expressos em média.

Figura 4. Influência do sexo sobre consumo de ração (g/dia). Comparação de animais machos e fêmeas.



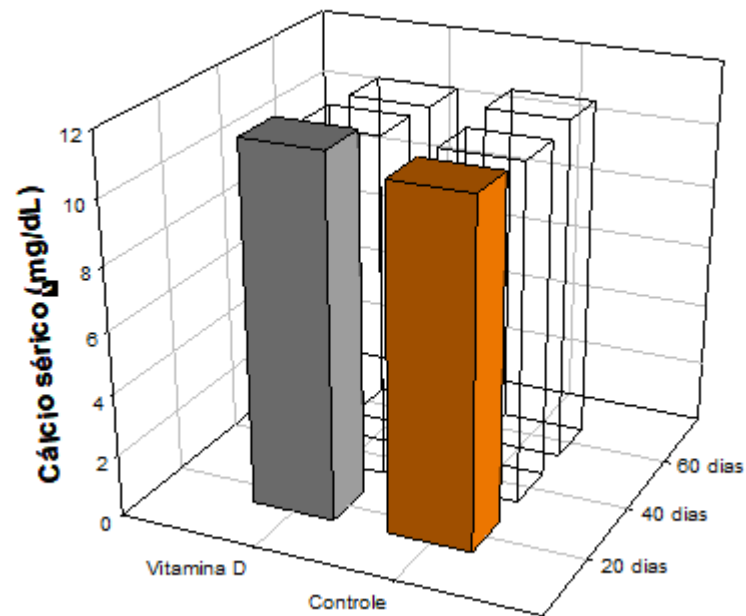
Cores diferentes indicam diferença significativa entre os sexos. Valores expressos em média.

Figura 5. Influência da suplementação de vitamina D sobre cálcio sérico nos diferentes tempos. Comparação de animais suplementados com vitamina D e animais controle nos diferentes tempos.



Tonalidades de cores diferentes indicam diferença significativa dentro dos tempos no grupo Vitamina D. Valores expressos em média.

Figura 6. Influência da suplementação de vitamina D sobre cálcio sérico nos diferentes tempos. Comparação entre animais suplementados com vitamina D e animais controle em cada tempo.



Cores diferentes indicam diferença significativa entre grupos Controle e Vitamina D no tempo 20 dias. Valores expressos em média.

5.2. Estudo morfométrico do coração

Não foram observadas alterações nas variáveis morfométricas do coração após a suplementação de VitD (Tabela 2). As diferenças observadas dizem respeito a influência exercida pelo sexo e tempo. Dessa maneira, as alterações observadas são apenas de ordem anatômica e de desenvolvimento dos animais.

Tabela 2. Variáveis morfométricas do coração

Variável	VE (g)	VE/PC (g/kg)	VD (g)	VD/PC (g/kg)	A (g)	A/PC (g/kg)
C20M (n= 12)	0,72±0,04	2,25±0,17	0,20±0,02	0,63±0,02	0,05±0,01	0,16±0,03
C40M (n= 12)	0,85±0,07	2,13±0,11	0,23±0,02	0,59±0,06	0,08±0,04	0,12±0,02
C60M (n= 12)	0,85±0,08	2,03±0,2	0,21±0,03	0,50±0,07	0,05±0,01	0,11±0,02
VD20M(n= 12)	0,72±0,06	2,21±0,15	0,21±0,03	0,64±0,09	0,05±0,01	0,14±0,02
VD40M (n= 12)	0,80±0,07	2,04±0,13	0,23±0,04	0,59±0,10	0,05±0,02	0,13±0,03
VD60M (n= 12)	0,86±0,07	2,04±0,19	0,21±0,02	0,49±0,07	0,05±0,01	0,11±0,03
C20F (n= 12)	0,54±0,04	2,31±0,11	0,14±0,02	0,60±0,08	0,03±0,01	0,14±0,01
C40F (n= 12)	0,59±0,05	2,26±0,12	0,14±0,02	0,55±0,09	0,03±0,01	0,12±0,02
C60F (n= 12)	0,60±0,03	2,27±0,09	0,15±0,01	0,57±0,04	0,03±0,01	0,10±0,02
VD20F (n= 12)	0,54±0,05	2,28±0,16	0,13±0,02	0,55±0,07	0,04±0,01	0,15±0,04
VD40F (n= 12)	0,57±0,03	2,24±0,14	0,14±0,02	0,56±0,08	0,03±0,01	0,13±0,03
VD60F (n= 12)	0,61±0,06	2,30±0,19	0,15±0,01	0,56±0,04	0,03±0,01	0,12±0,03
P (sexo)	<0,001	<0,001	<0,001	0,505	<0,001	0,952
P (suplementação)	0,477	0,350	0,621	0,521	0,485	0,457
P (tempo)	<0,001	0,001	0,003	<0,001	0,030	<0,001
P (sexo x suplementação)	0,780	0,542	0,644	0,596	0,158	0,103
P (sexo x tempo)	0,003	0,013	0,006	<0,001	0,218	0,998
P (suplementação x tempo)	0,199	0,514	0,954	0,689	0,838	0,566
P (sexo x suplementação x tempo)	0,755	0,897	0,639	0,651	0,763	0,618

Dados expressos em média ± desvio padrão, n: números de animais em cada grupo. C20M: grupo controle animais machos, sem suplementação de colecalciferol por 20 dias; C40M: grupo controle animais machos, sem suplementação de colecalciferol por 40 dias; C60M: grupo controle animais machos, sem suplementação de colecalciferol por 60 dias; VD20M: grupo de animais machos com suplementação de colecalciferol por 20 dias; VD40M: grupo de animais machos com suplementação de colecalciferol por 40 dias; VD60M: grupo de animais machos com suplementação de colecalciferol por 60 dias; C20F: grupo controle animais fêmeas, sem suplementação de colecalciferol por 20 dias; C40F: grupo controle animais fêmeas, sem suplementação de colecalciferol por 40 dias; C60F: grupo controle animais fêmeas, sem suplementação de colecalciferol por 60 dias; VD20F: grupo de animais fêmeas com suplementação de colecalciferol por 20 dias; VD40F: grupo de animais fêmeas com suplementação de colecalciferol por 40 dias; VD60F: grupo de animais fêmeas com suplementação de colecalciferol por 60 dias; VE: peso do ventrículo esquerdo; PC: peso corporal; VD: peso do ventrículo direito; A: peso dos átrios.

5.3. Determinação do malondialdeído (MDA)

A Tabela 8 mostra os valores obtidos na avaliação do malondialdeído (MDA) que se constitui em importante marcador de estresse oxidativo. Foi observada diferença entre os sexos, mas esses não foram dependentes da suplementação de VitD e do tempo, sendo apenas diferença fisiológica entre os animais.

Tabela 3. Determinação do malondialdeído (MDA)

Variável	MDA (nmol/mg de proteína)
C20M (n= 10)	3,54±1,08
C40M (n= 11)	3,41±0,57
C60M (n= 11)	3,60±0,27
VD20M (n= 12)	3,29±0,66
VD40M (n= 11)	3,20±0,40
VD60M (n= 11)	3,44±1,02
C20F (n= 10)	3,50±0,89
C40F (n= 9)	3,31±0,35
C60F (n= 11)	4,14±0,69
VD20F (n= 9)	3,91±1,03
VD40F (n= 12)	3,64±0,76
VD60F (n= 9)	3,83±1,05
P (sexo)	0,027
P (suplementação)	0,829
P (tempo)	0,098
P (sexo x suplementação)	0,210
P (sexo x tempo)	0,691
P (suplementação x tempo)	0,582
P (sexo x suplementação x tempo)	0,443

Dados expressos em média ± desvio padrão, n: números de animais em cada grupo. C20M: grupo controle animais machos, sem suplementação de colecalciferol por 20 dias; C40M: grupo controle animais machos, sem suplementação de colecalciferol por 40 dias; C60M: grupo controle animais machos, sem suplementação de colecalciferol por 60 dias; VD20M: grupo de animais machos com suplementação de colecalciferol por 20 dias; VD40M: grupo de animais machos com suplementação de colecalciferol por 40 dias; VD60M: grupo de animais machos com suplementação de colecalciferol por 60 dias; C20F: grupo controle animais fêmeas, sem suplementação de colecalciferol por 20 dias; C40F: grupo controle animais fêmeas, sem suplementação de colecalciferol por 40 dias; C60F: grupo controle animais fêmeas, sem suplementação de colecalciferol por 60 dias; VD20F: grupo de animais fêmeas com suplementação de colecalciferol por 20 dias; VD40F: grupo de animais fêmeas com suplementação de colecalciferol por 40 dias; VD60F: grupo de animais fêmeas com suplementação de colecalciferol por 60 dias;

5.4. Determinação da atividade da tiorredoxina (Trx)

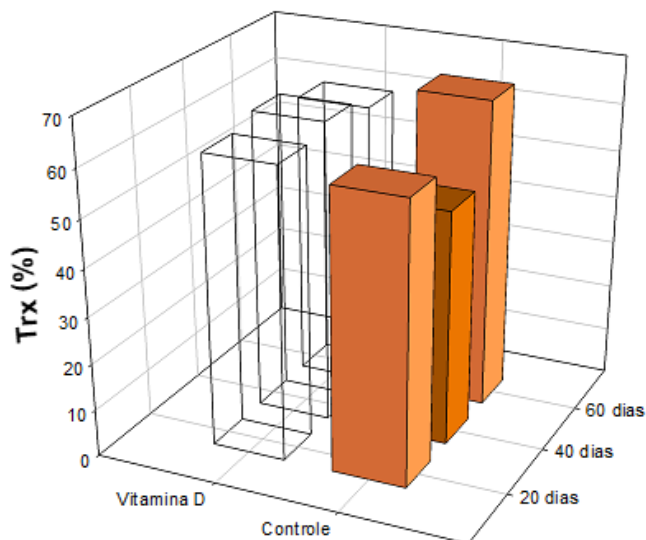
A Tabela 7 apresenta os dados da determinação da atividade da tiorredoxina (Trx). Houve interação dos fatores suplementação e tempo ($p=0,007$). Os animais do grupo controle mostraram menor atividade de Trx no tempo 40 dias (Figura 7). Já os animais do grupo VD exibiram comportamento distinto no tempo sem apresentar diferença na atividade de Trx (Figura 7). Com isso, foi observada diferença significativa entre o controle e o grupo suplementado no tempo 40 dias que denota maior atividade de Trx no grupo VD (Figura 8).

Tabela 4. Determinação da atividade da tiorredoxina (Trx).

Variável	Trx (%)
C20M (n= 8)	62±0,10
C40M (n= 7)	47±0,17
C60M (n= 8)	76±0,15
VD20M (n= 8)	63±0,06
VD40M (n= 8)	65±0,09
VD60M (n= 7)	67±0,06
C20F (n= 8)	56±0,22
C40F (n= 8)	53±0,10
C60F (n= 8)	55±0,05
VD20F (n= 7)	60±0,08
VD40F (n= 8)	62±0,14
VD60F (n= 8)	54±0,10
P (sexo)	0,005
P (suplementação)	0,233
P (tempo)	0,108
P (sexo x suplementação)	0,832
P (sexo x tempo)	0,006
P (suplementação x tempo)	0,007*
P (sexo x suplementação x tempo)	0,364

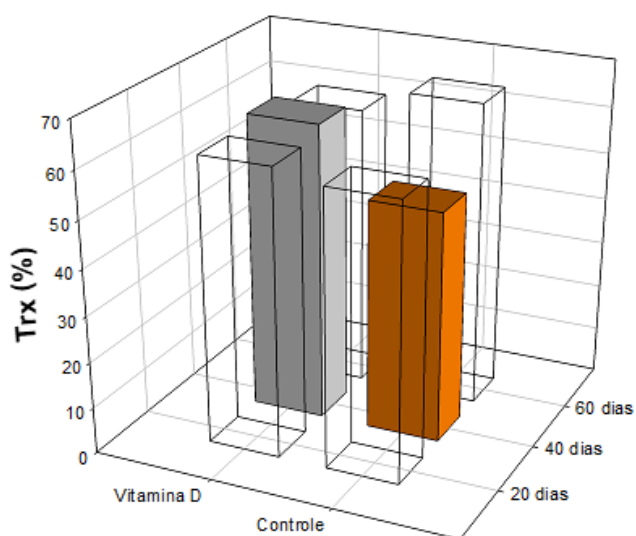
Dados expressos em média ± desvio padrão, n: números de animais em cada grupo. C20M: grupo controle animais machos, sem suplementação de colecalciferol por 20 dias; C40M: grupo controle animais machos, sem suplementação de colecalciferol por 40 dias; C60M: grupo controle animais machos, sem suplementação de colecalciferol por 60 dias; VD20M: grupo de animais machos com suplementação de colecalciferol por 20 dias; VD40M: grupo de animais machos com suplementação de colecalciferol por 40 dias; VD60M: grupo de animais machos com suplementação de colecalciferol por 60 dias; C20F: grupo controle animais fêmeas, sem suplementação de colecalciferol por 20 dias; C40F: grupo controle animais fêmeas, sem suplementação de colecalciferol por 40 dias; C60F: grupo controle animais fêmeas, sem suplementação de colecalciferol por 60 dias; VD20F: grupo de animais fêmeas com suplementação de colecalciferol por 20 dias; VD40F: grupo de animais fêmeas com suplementação de colecalciferol por 40 dias; VD60F: grupo de animais fêmeas com suplementação de colecalciferol por 60 dias. * C40 > C20 = C60; C40 < VD40; VD20 = VD40 = VD60

Figura 7. Influência da suplementação de vitamina D sobre atividade da tioredoxina nos diferentes tempos. Comparação de animais suplementados com vitamina D e animais controle nos diferentes tempos.



Tonalidades de cores diferentes indicam diferença significativa dentro dos tempos nos grupos Controle e Vitamina D. Valores expressos em média.

Figura 8. Influência da suplementação de vitamina D sobre atividade da tioredoxina nos diferentes tempos. Comparação entre animais suplementados com vitamina D e animais controle nos diferentes tempos.



Cores diferentes indicam diferença significativa entre Controle e Vitamina D no tempo 40 dias. Valores expressos em média.

5.5. Análise de expressão das proteínas da via HO-1, GPx-1 e Keap-1/Nrf-2

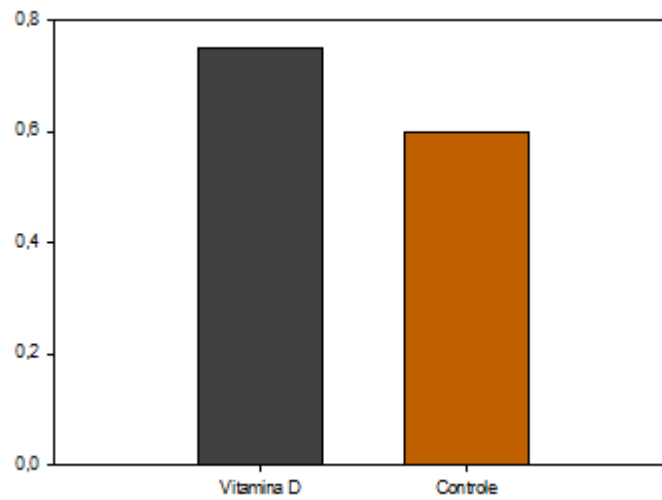
A Tabela 5 apresenta dados da análise de proteínas envolvidas nas vias antioxidantes. A suplementação de VitD alterou de forma significativa o comportamento de HO-1, ocorrendo aumento de sua expressão no grupo suplementado ($p = 0,015$) (Tabela 5 e Figura 9). Também foi observada interação entre os fatores sexo e suplementação na variável GPx-1 ($p=0,032$). Contudo, o teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak não foi capaz de mostrar diferença significativa de GPx-1 entre os sexos e nos grupos controle e VD. Dessa forma, animais machos e fêmeas possuem tendência de alteração de GPx-1 com a suplementação de VitD, com aumento nos animais machos e diminuição nas fêmeas (Tabela 5). As proteínas do complexo Keap-1/Nrf-2 não foram influenciadas pela suplementação de VitD sendo apenas diferenças fisiológicas referentes ao sexo e tempo de avaliação dos animais (Tabela 5).

Tabela 5. Expressão das proteínas antioxidantes HO-1, GPx-1, Keap-1 e Nrf-2

Variável	HO-1 (unidade arbitrária)	GPx-1 (unidade)	Keap-1 (unidade arbitrária)	Nrf-2 (unidade arbitrária)
C20M (n=8)	0,46±0,25	2,52±0,29	1,91±0,44	0,684±0,18
C40M (n=8)	0,30±0,10	2,66±0,21	2,03±0,75	0,511±0,20
C60M (n=8)	0,55±0,22	2,58±0,25	1,80±0,18	0,550±0,22
VD20M (n=9)	0,57±0,20	2,77±0,69	2,02±0,55	0,823±0,27
VD40M (n=8)	0,45±0,30	2,84±0,26	1,92±0,55	0,511±0,32
VD60M (n=9)	0,60±0,40	2,67±0,29	1,67±0,48	0,554±0,20
C20F (n=8)	0,51±0,34	2,51±0,39	2,54±0,68	0,529±0,16
C40F (n=8)	0,77±0,31	2,82±0,71	2,81±0,57	0,670±0,25
C60F (n=8)	1,01±0,18	2,92±0,36	2,51±0,81	0,616±0,29
VD20F (n=8)	0,64±0,21	2,27±0,29	2,26±0,38	0,440±0,26
VD40F (n=8)	0,76±0,23	2,46±0,57	2,77±0,75	0,614±0,20
VD60F (n=9)	1,47±0,54	2,85±0,63	2,37±0,67	0,689±0,39
P (sexo)	<0,001	0,685	<0,001	0,442
P (suplementação)	0,015*	0,787	0,415	0,449
P (tempo)	<0,001	0,093	0,118	0,958
P (sexo x suplementação)	0,443	0,032^{&}	0,639	0,227
P (sexo x tempo)	<0,001	0,061	0,405	0,011
P (suplementação x tempo)	0,448	0,890	0,971	0,972
P (sexo x suplementação x tempo)	0,156	0,658	0,692	0,414

Dados expressos em média ± desvio padrão, n: números de animais em cada grupo. C20M: grupo controle animais machos, sem suplementação de colecalciferol por 20 dias; C40M: grupo controle animais machos, sem suplementação de colecalciferol por 40 dias; C60M: grupo controle animais machos, sem suplementação de colecalciferol por 60 dias; VD20M: grupo de animais machos com suplementação de colecalciferol por 20 dias; VD40M: grupo de animais machos com suplementação de colecalciferol por 40 dias; VD60M: grupo de animais machos com suplementação de colecalciferol por 60 dias; C20F: grupo controle animais fêmeas, sem suplementação de colecalciferol por 20 dias; C40F: grupo controle animais fêmeas, sem suplementação de colecalciferol por 40 dias; C60F: grupo controle animais fêmeas, sem suplementação de colecalciferol por 60 dias; VD20F: grupo de animais fêmeas com suplementação de colecalciferol por 20 dias; VD40F: grupo de animais fêmeas com suplementação de colecalciferol por 40 dias; VD60F: grupo de animais fêmeas com suplementação de colecalciferol por 60 dias; * Controle < VitD; [&]VitD machos > Controle machos; VitD fêmeas < Controle fêmeas.

Figura 9. Influência da suplementação de vitamina D sobre HO-1. Comparação de animais suplementados com vitamina D e animais controle.



Cores diferentes indicam diferença significativa entre grupos Controle e Vitamina D. Valores expressos em média.

5.5. Análise de expressão das proteínas da via do Fator Nuclear Kappa B

A Tabela 4 apresenta os dados da análise de expressão de proteínas da via do Fator Nuclear Kappa B (NF- κ B). A suplementação de VitD influenciou o comportamento das proteínas NF- κ B total e I κ B total. Em relação ao NF- κ B total, houve interação entre os fatores suplementação e tempo ($p < 0,001$). Enquanto os animais do grupo controle mostraram aumento gradual de NF- κ B total nos diferentes tempos, o grupo suplementado exibiu aumento da proteína no tempo 20 dias, seguida de queda aos 40 dias e novo aumento no tempo 60 dias (Figura 10). O comportamento distinto do NF- κ B total pela suplementação de VitD refletiu em diferenças significativas entre os grupos controle e VitD nos tempos 20 e 40 dias, com valores maiores e menores nos animais suplementados, respectivamente (Figura 11). Em relação à fração fosforilada do NF- κ B (p-NF- κ B), também foi observada interação entre os fatores suplementação e tempo ($p = 0,033$). Embora não tenham sido observadas diferenças temporais de p-NF- κ B nos grupos controle e suplementação (Figura 12), os animais VitD aos 20 dias apresentaram menos p-NF- κ B em comparação ao controle (Figura 13). A análise da razão entre as frações fosforilada e total do NF- κ B também mostrou interação suplementação e tempo ($p < 0,001$). Os animais controle do tempo 20 dias apresentaram valores maiores da razão p-NF- κ B/NF- κ B em comparação aos demais tempos enquanto animais VitD exibiram aumento da razão no tempo 40 dias. Na comparação entre grupos controle e VitD houve diferença significativa nos tempos 20 e 40 dias com valores menores e maiores, respectivamente, nos animais VitD (Figuras 14 e 15).

Também participante da via do NF- κ B, os dados da análise de expressão da Proteína Inibidora do κ B (I κ B) são apresentados na Tabela 7. A proteína I κ B total também exibiu interação entre os fatores suplementação e tempo. Em relação ao tempo, o grupo suplementado com VitD mostrou aumento gradual de I κ B total ao longo do tempo em oposição ao grupo controle que não mostrou diferença entre os tempos 40 e 60 dias (Figura 16). Nas comparações entre grupos controle e VD houve diferença significativa no tempo 40 dias, sendo o valor de I κ B total menor nos animais VD (Figura 17). A fração fosforilada do I κ B (p-I κ B) não exibiu alteração com a suplementação de VitD. Quando realizada a razão entre frações fosforilada e total (p-I κ B/ I κ B total) foi observado que os animais suplementados tiveram valores maiores em relação aos controles (Figura 18).

Tabela 6. Expressão proteica da via antioxidante do Fator Nuclear Kappa B (NF-κB)

Variável	NF-κB total (unidade arbitrária)	NF-κB-p (unidade arbitrária)	Razão p-NF-κB / NF-κB total (unidade arbitrária)
C20M (n=8)	0,49±0,27	0,53±0,25	1,10±0,68
C40M (n=8)	0,87±0,29	0,39±0,23	0,59±0,57
C60M (n=8)	1,00±0,30	0,38±0,16	0,44±0,29
VD20M (n=9)	0,83±0,25	0,28±0,09	0,37±0,17
VD40M (n=8)	0,54±0,30	0,47±0,16	1,06±0,56
VD60M (n=9)	0,84±0,37	0,39±0,10	0,58±0,35
C20F (n=8)	1,00±0,34	0,76±0,22	0,94±0,74
C40F (n=8)	1,72±0,34	0,54±0,17	0,33±0,14
C60F (n=8)	1,29±0,23	0,99±0,57	0,74±0,42
VD20F (n=8)	1,43±0,42	0,54±0,18	0,42±0,21
VD40F (n=8)	1,05±0,16	0,52±0,15	0,50±0,16
VD60F (n=9)	1,76±0,51	0,79±0,33	0,49±0,27
P (sexo)	<0,001	<0,001	0,098
P (suplementação)	0,589	0,098	0,121
P (tempo)	0,002	0,361	0,288
P (sexo x suplementação)	0,565	0,748	0,505
P (sexo x tempo)	0,446	0,038	0,053
P (suplementação x tempo)	<0,001*	0,033^{&}	<0,001
P (sexo x suplementação x tempo)	0,079	0,522	0,105

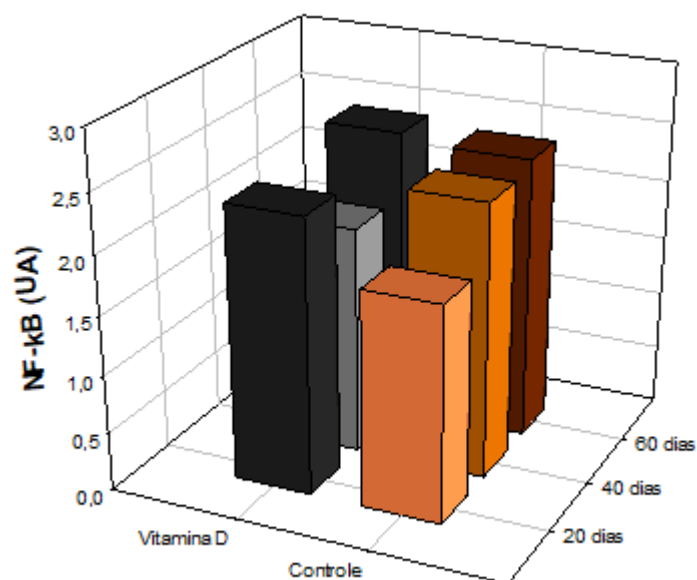
Dados expressos em média ± desvio padrão, n: números de animais em cada grupo. C: animais sem suplementação de colecalciferol. VitD: animais suplementados com colecalciferol. C20M: grupo controle animais machos, sem suplementação de colecalciferol por 20 dias; C40M: grupo controle animais machos, sem suplementação de colecalciferol por 40 dias; C60M: grupo controle animais machos, sem suplementação de colecalciferol por 60 dias; VD20M: grupo de animais machos com suplementação de colecalciferol por 20 dias; VD40M: grupo de animais machos com suplementação de colecalciferol por 40 dias; VD60M: grupo de animais machos com suplementação de colecalciferol por 60 dias; C20F: grupo controle animais fêmeas, sem suplementação de colecalciferol por 20 dias; C40F: grupo controle animais fêmeas, sem suplementação de colecalciferol por 40 dias; C60F: grupo controle animais fêmeas, sem suplementação de colecalciferol por 60 dias; VD20F: grupo de animais fêmeas com suplementação de colecalciferol por 20 dias; VD40F: grupo de animais fêmeas com suplementação de colecalciferol por 40 dias; VD60F: grupo de animais fêmeas com suplementação de colecalciferol por 60 dias; * C20 < VD20; C40 > VD40; C20 < C40 < C60; VD 20 = VD 60 > VD 40; [&] VD20 < C20 ^{\$} C40 > VD40; C20 < C40 = C60; VD20 < VD40 < VD60.

Tabela 7. Expressão proteica das proteínas de inibição κ B (I κ B)

Variável	I κ B total (unidade arbitrária)	I κ B-p (unidade arbitrária)	Razão I κ B-p/ I κ B total (unidade arbitrária)
C20M (n=8)	0,27 $\pm$ 0,11	0,67 $\pm$ 0,19	2,40 $\pm$ 0,85
C40M (n=8)	0,56 $\pm$ 0,13	0,84 $\pm$ 0,53	1,53 $\pm$ 0,96
C60M (n=8)	0,99 $\pm$ 0,05	0,84 $\pm$ 0,17	0,85 $\pm$ 0,17
VD20M (n=9)	0,35 $\pm$ 0,17	1,09 $\pm$ 0,51	3,44 $\pm$ 1,24
VD40M (n=8)	0,34 $\pm$ 0,11	0,72 $\pm$ 0,36	2,19 $\pm$ 1,18
VD60M (n=9)	0,67 $\pm$ 0,11	0,79 $\pm$ 0,07	1,22 $\pm$ 0,24
C20F (n=8)	0,26 $\pm$ 0,09	0,86 $\pm$ 0,56	3,10 $\pm$ 1,26
C40F (n=8)	1,02 $\pm$ 0,38	1,20 $\pm$ 0,34	1,58 $\pm$ 0,93
C60F (n=8)	0,54 $\pm$ 0,18	1,16 $\pm$ 0,44	2,36 $\pm$ 1,03
VD20F (n=8)	0,21 $\pm$ 0,04	0,90 $\pm$ 0,41	4,22 $\pm$ 1,77
VD40F (n=8)	0,39 $\pm$ 0,05	0,97 $\pm$ 0,32	2,55 $\pm$ 0,89
VD60F (n=9)	0,55 $\pm$ 0,36	0,96 $\pm$ 0,22	2,18 $\pm$ 0,46
P (sexo)	0,124	0,027	<0,001
P (suplementação)	<0,001	0,960	<0,001
P (tempo)	<0,001	0,448	<0,001
P (sexo x suplementação)	0,361	0,336	0,612
P (sexo x tempo)	<0,001	0,136	0,009
P (suplementação x tempo)	<0,001^s	0,083	0,379
P (sexo x suplementação x tempo)	0,071	0,903	0,434

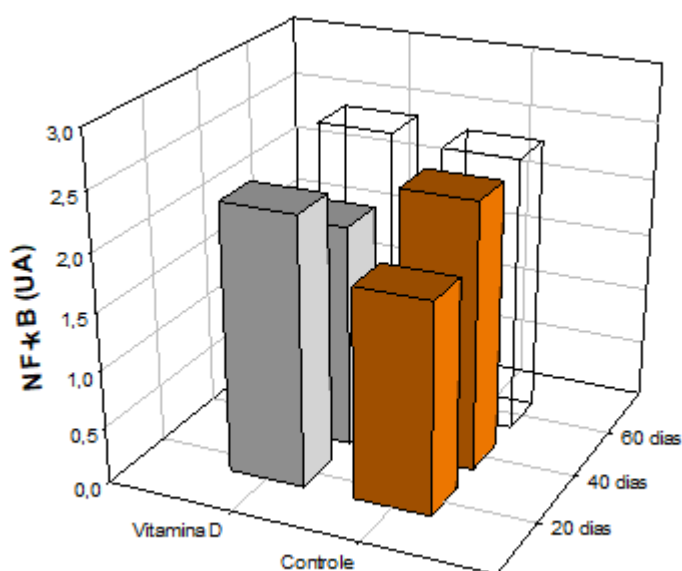
Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão, n: números de animais em cada grupo. C: animais sem suplementação de colecalciferol. VitD: animais suplementados com colecalciferol. C20M: grupo controle animais machos, sem suplementação de colecalciferol por 20 dias; C40M: grupo controle animais machos, sem suplementação de colecalciferol por 40 dias; C60M: grupo controle animais machos, sem suplementação de colecalciferol por 60 dias; VD20M: grupo de animais machos com suplementação de colecalciferol por 20 dias; VD40M: grupo de animais machos com suplementação de colecalciferol por 40 dias; VD60M: grupo de animais machos com suplementação de colecalciferol por 60 dias; C20F: grupo controle animais fêmeas, sem suplementação de colecalciferol por 20 dias; C40F: grupo controle animais fêmeas, sem suplementação de colecalciferol por 40 dias; C60F: grupo controle animais fêmeas, sem suplementação de colecalciferol por 60 dias; VD20F: grupo de animais fêmeas com suplementação de colecalciferol por 20 dias; VD40F: grupo de animais fêmeas com suplementação de colecalciferol por 40 dias; VD60F: grupo de animais fêmeas com suplementação de colecalciferol por 60 dias; * C20 < VD20; C40 > VD40; C20 < C40 < C60; VD 20 = VD 60 > VD 40; & VD20 < C20 ^s C40 > VD40; C20 < C40 = C60; VD20 < VD40 < VD60.

Figura 10. Influência da suplementação de vitamina D sobre NF- κ B total nos diferentes tempos. Comparação de animais suplementados com vitamina D e animais controle nos diferentes tempos.



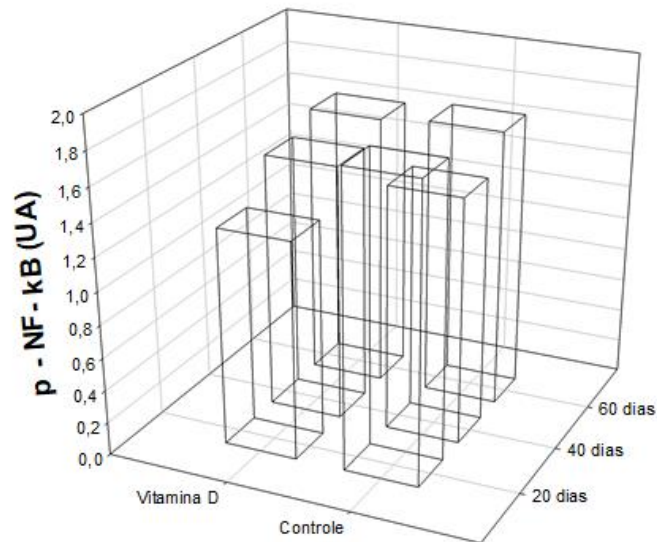
Tonalidades de cores diferentes indicam diferença significativa dentro dos tempos nos grupos Controle e Vitamina D. Valores expressos em média.

Figura 11. Influência da suplementação de vitamina D sobre NF- κ B total nos diferentes tempos. Comparação entre animais suplementados com vitamina D e animais controle nos diferentes tempos.



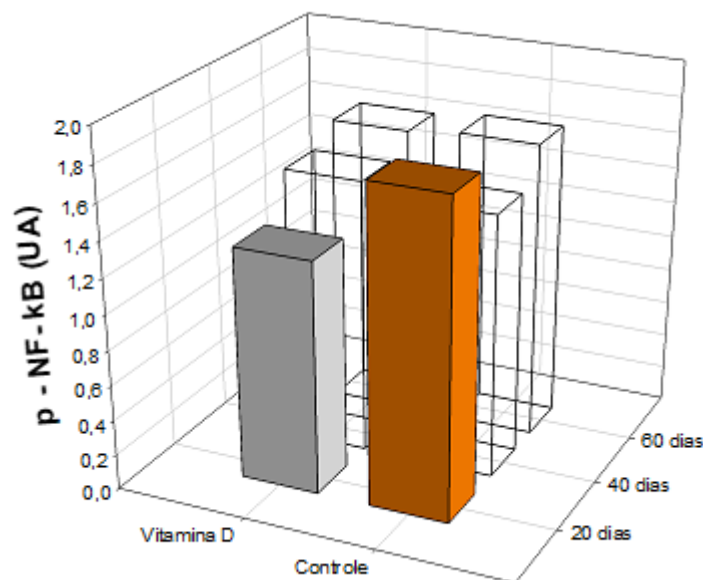
Cores diferentes indicam diferença significativa entre grupos Controle e Vitamina D nos tempos 20 dias e 40 dias. Valores expressos em média.

Figura 12. Influência da suplementação de vitamina D sobre p-NF- κ B nos diferentes tempos. Comparação de animais suplementados com vitamina D e animais controle nos diferentes tempos.



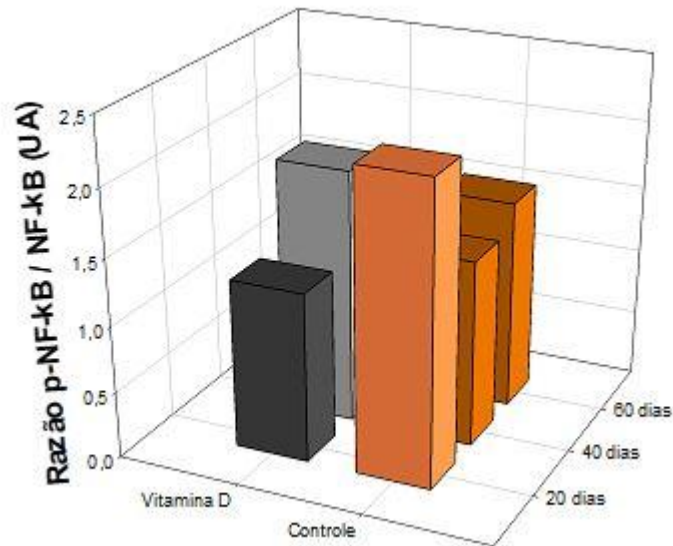
Não foram observadas diferenças significativas dentro dos tempos nos grupos Controle e Vitamina d. Valores expressos em média.

Figura 13. Influência da suplementação de vitamina D sobre p-NF- κ B nos diferentes tempos. Comparação entre animais suplementados com vitamina D e animais controle nos diferentes tempos



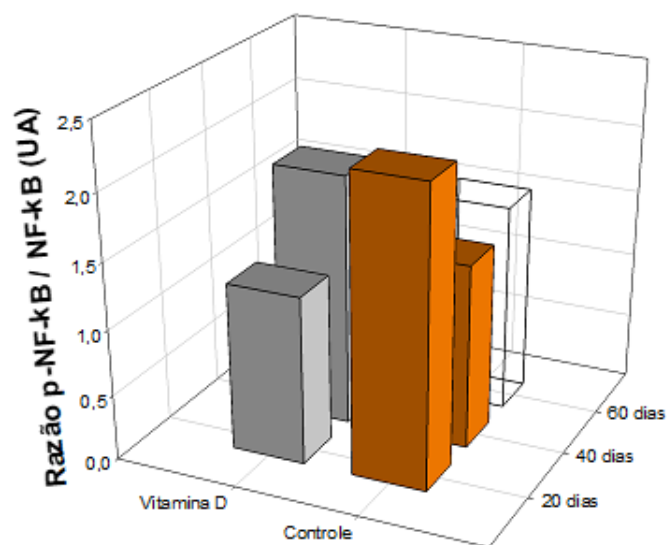
Cores diferentes indicam diferença significativa entre grupos Controle e Vitamina D no tempo 20 dias. Valores expressos em média.

Figura 14. Influência da suplementação de vitamina D sobre razão p-NF- κ B/ NF- κ B total nos diferentes tempos. Comparação de animais suplementados com vitamina D e animais controle nos diferentes tempos.



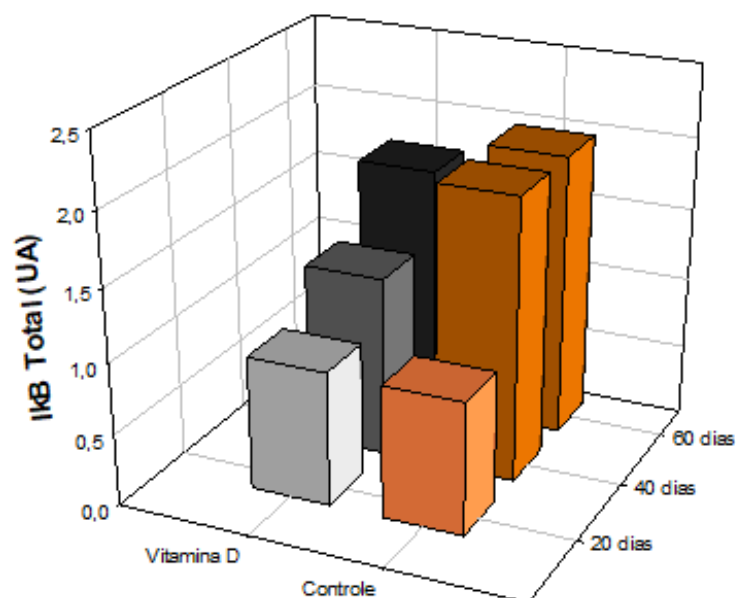
Tonalidades de cores diferentes indicam diferença significativa dentro dos tempos nos grupos Controle e Vitamina D. Valores expressos em média.

Figura 15. Influência da suplementação de vitamina D sobre razão p-NF- κ B/ NF- κ B total nos diferentes tempos. Comparação entre animais suplementados com vitamina D e animais controle nos diferentes tempos



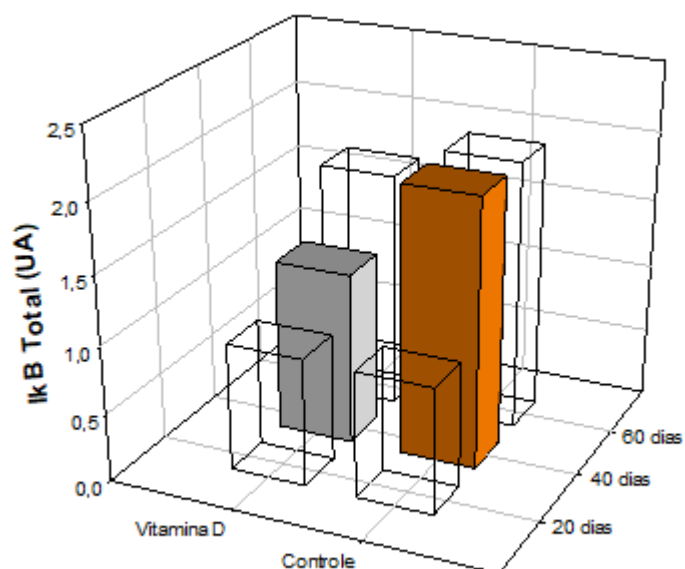
Cores diferentes indicam diferença significativa entre grupos Controle e Vitamina D nos tempos 20 dias e 40 dias. Valores expressos em média.

Figura 16. Influência da suplementação de vitamina D sobre I κ B total nos diferentes tempos. Comparação de animais suplementados com vitamina D e animais controle nos diferentes tempos.



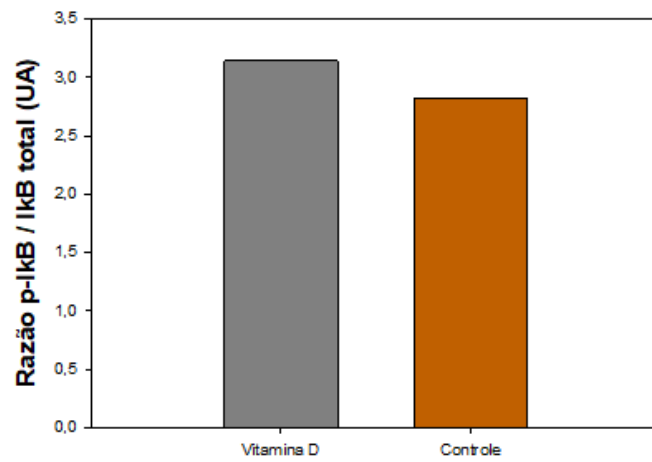
Tonalidades de cores diferentes indicam diferença significativa dentro dos tempos nos grupos Controle e Vitamina D. Valores expressos em média.

Figura 17. Influência da suplementação de vitamina D sobre I κ B total nos diferentes tempos. Comparação entre animais suplementados com vitamina D e animais controle nos diferentes tempos.



Cores diferentes indicam diferença significativa entre Controle e Vitamina D no tempo 40 dias. Valores expressos em média.

Figura 18. Influência da suplementação de vitamina D sobre razão p- I κ B/ I κ B total. Comparação de animais suplementados com vitamina D e animais controle.



Cores diferentes indicam diferença significativa entre Controle e Vitamina D. Valores expressos em média.

5.6. Análise de expressão de proteínas das vias apoptóticas BAX, Bcl-2 e AIF

Os dados da avaliação das vias de apoptose são apresentados na Tabela 8. Foi observada interação entre os três fatores de interesse (sexo, suplementação e tempo) na avaliação da proteína BAX ($p=0,002$). Isso indica que o efeito de um fator não é consistente em todas as combinações dos outros dois fatores. Contudo, a interpretação da Bax isoladamente não é representativa sendo necessária interpretação conjunta com a proteína Bcl-2. Quando realizada análise da razão Bax/Bcl-2 foi observada interação entre os fatores sexo e suplementação ($p=0,012$). Quando realizadas comparações entre animais controle e VD, essas não se mostraram significativas em ambos os sexos. Porém, a comparação entre machos e fêmeas mostrou existir diferença entre os sexos nos animais controle, mas que essa diferença não ocorreu em animais VD (Figura 19).

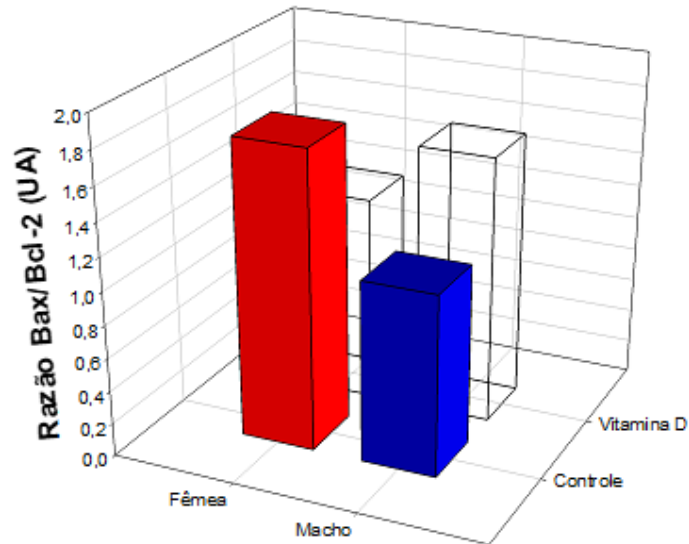
Já a expressão da proteína AIF não sofreu influência pela suplementação de VitD sendo semelhantes nos diferentes sexos e tempos (Tabela 8).

Tabela 8. Expressão proteica das vias de apoptose BAX, Bcl-2 e AIF.

Variável	BAX (unidade arbitrária)	Bcl-2 (unidade arbitrária)	Razão Bax/Bcl-2 (unidade arbitrária)	AIF (unidade arbitrária)
C20M (n=8)	0,19±0,20	1,67±1,70	0,23±0,33	1,79±0,98
C40M (n=8)	0,13±0,11	1,82±0,93	0,07±0,06	1,90±0,85
C60M (n=8)	0,42±0,31	2,91±1,76	0,17±0,09	1,94±0,77
VD20M (n=9)	0,43±0,18	1,23±0,95	0,56±0,38	1,64±0,70
VD40M (n=8)	0,26±0,22	2,45±1,90	0,22±0,21	1,95±0,96
VD60M (n=9)	0,32±0,25	2,39±1,53	0,16±0,08	1,94±0,84
C20F (n=8)	0,39±0,29	2,51±2,21	0,35±0,31	2,27±1,19
C40F (n=8)	0,91±0,41	4,85±2,71	0,45±0,31	2,22±0,93
C60F (n=8)	0,74±0,47	4,10±1,90	0,32±0,32	2,10±0,22
VD20F (n=8)	0,35±0,09	5,96±1,69	0,10±0,06	1,96±1,01
VD40F (n=8)	0,29±0,20	3,87±2,49	0,11±0,07	2,56±1,03
VD60F (n=9)	1,04±0,39	5,81±3,09	0,39±0,49	1,90±1,14
P (sexo)	<0,001	<0,001	0,425	0,096
P (suplementação)	0,518	0,968	0,920	0,817
P (tempo)	<0,001	0,010	0,606	0,535
P (sexo x suplementação)	0,100	0,416	0,012*	0,945
P (sexo x tempo)	0,049	0,988	0,144	0,641
P (suplementação x tempo)	0,071	0,709	0,743	0,636
P (sexo x suplementação x tempo)	0,002	0,337	0,133	0,838

Dados expressos em média ± desvio padrão, n: números de animais em cada grupo. C20M: grupo controle animais machos, sem suplementação de colecalciferol por 20 dias; C40M: grupo controle animais machos, sem suplementação de colecalciferol por 40 dias; C60M: grupo controle animais machos, sem suplementação de colecalciferol por 60 dias; VD20M: grupo de animais machos com suplementação de colecalciferol por 20 dias; VD40M: grupo de animais machos com suplementação de colecalciferol por 40 dias; VD60M: grupo de animais machos com suplementação de colecalciferol por 60 dias; C20F: grupo controle animais fêmeas, sem suplementação de colecalciferol por 20 dias; C40F: grupo controle animais fêmeas, sem suplementação de colecalciferol por 40 dias; C60F: grupo controle animais fêmeas, sem suplementação de colecalciferol por 60 dias; VD20F: grupo de animais fêmeas com suplementação de colecalciferol por 20 dias; VD40F: grupo de animais fêmeas com suplementação de colecalciferol por 40 dias; VD60F: grupo de animais fêmeas com suplementação de colecalciferol por 60 dias; * Controle fêmeas > Controle machos; VD fêmeas = VD machos; Controle fêmeas = VD fêmeas; Controle machos = VD machos.

Figura 19. Influência da suplementação de Vitamina D sobre a razão Bax/Bcl-2 nos diferentes sexos. Comparação entre animais suplementados com vitamina D e animais controle nos diferentes sexos.



Cores diferentes indicam diferença significativa entre os sexos nos grupos Controle e Vitamina D. Valores expressos em média.

6. DISCUSSÃO

Este estudo mostrou que a suplementação de ratos Wistar com doses excessivas de VitD produz mudanças bioquímicas e na expressão de proteínas envolvidas em vias antioxidantes, inflamatórias e de apoptose no tecido cardíaco. Algumas dessas alterações são dependentes do tempo de suplementação e sexo dos animais. Sendo assim, o tempo e o sexo parecem ser fatores decisivos na avaliação da remodelação cardíaca induzida por doses excessivas de VitD.

Peso corporal, consumo de ração e parâmetros bioquímicos

A evolução de ganho de peso dos animais de ambos os sexos não foi afetada pela suplementação de VitD. Assim como em grande parte dos mamíferos, um dos principais dimorfismos sexuais entre ratos machos e fêmeas é o peso corporal⁴⁰. Em geral, ratos machos e fêmeas possuem peso ao nascer muito próximos e ganho de peso similar ao longo das primeiras 4 semanas de vida dos animais⁴⁰. Porém, após esse período o ganho de peso é significativamente maior e mais prolongado em ratos machos, tornando os animais desse sexo mais pesados em relação a fêmeas de mesma idade⁴⁰. Tais diferenças foram observadas em nosso trabalho, em que ratos do sexo masculino apresentaram maior peso corporal em relação às fêmeas em todos os tempos avaliados. Essa diferença no desenvolvimento corporal dos animais também tem reflexos sobre o coração. Na avaliação morfométrica do coração observamos que animais mais velhos possuem maiores compartimentos quando comparados a animais mais jovens. Porém, a suplementação de VitD não promoveu alterações nas estruturas cardíacas de nossos animais. Isso reforça achados anteriores de nosso grupo de pesquisa em que alterações de estrutura e função cardíaca foram observadas somente após 4 meses de suplementação de VitD²¹. Dessa forma, as diferenças observadas em nosso trabalho foram apenas de ordem anatômica respeitando os diferentes tempos e sexos avaliados.

As diferenças existentes no desenvolvimento dos animais também influenciam diretamente o consumo diário de alimento. Animais machos tendem a apresentar consumo de ração maior que fêmeas. Em nosso estudo animais machos e fêmeas apresentaram consumo de ração próximo à 25g e 17g, respectivamente. Esse dado é de extrema importância, pois, assim como já apresentado, as doses de VitD utilizadas levaram em consideração a diferença de consumo de ração entre machos e fêmeas. Assim sendo, os grupos suplementados de ambos os sexos consumiram a mesma quantidade de VitD ao dia (295 UI/dia).

A VitD exerce importante papel na homeostase dos íons cálcio e fósforo. Em relação ao cálcio, a VitD promove absorção ativa de cálcio à nível intestinal por meio de estímulo à expressão de proteínas responsáveis pela captação e transporte intracelular de cálcio¹. A absorção cálcio e sua manutenção sérica são feitas pelo sistema Vitamina D - Paratormônio (PTH). A liberação de PTH é regulada pelas concentrações séricas de cálcio, que em situações de diminuição têm sua produção aumentada pela glândula paratireoide e estimula a conversão de 25(OH)D₃ em 1,25(OH)D₃ à nível renal. Por sua vez, o 1,25(OH)D₃ favorece o aumento de cálcio sérico por meio de maior absorção intestinal, aumento da reabsorção de íons no túbulo renal e mobilização de cálcio dos ossos⁴¹. Já em situações de elevação de cálcio sérico ocorre processo contrário, com queda na produção de PTH e diminuição nos processos de absorção intestinal e reabsorção óssea de cálcio⁴¹. O tecido cardíaco é suscetível a alterações induzidas por hipercalcemia, sendo as mais importantes o aumento da contratilidade cardíaca, vasoconstrição, arritmias e hipertensão^{42,43}. Em nosso trabalho observamos aumento nas concentrações de cálcio sérico nos VD durante o período de 20 dias quando comparado aos animais VD nos demais tempos e ao respectivo controle (Controle 20 dias). Porém, essa elevação de cálcio sérico não se configura como hipercalcemia, pois se encontra dentro dos valores considerados normais em ratos³³.

Em relação ao fósforo sérico, sua regulação possui similaridades com a do cálcio e quantidades elevadas desse mineral (hiperfosfatemia) também acarretam prejuízos ao organismo, como calcificação vascular, rigidez arterial periférica e hiperplasia da tireóide^{44,45}. A VitD promove absorção intestinal do mineral no lúmen instestinal e reabsorção de íons fósforo no túbulo renal⁴⁶. Assim como no metabolismo do cálcio, o PTH também desempenha importante papel no controle do fósforo por promover a conversão de VitD em 1,25(OH)D₃. Contudo, em situações de aumento de concentrações séricas de fósforo ocorre liberação do fator de crescimento de fibroblasto-23 (FGF-23) pelos osteócitos que atua como regulador negativo de PTH diminuindo a conversão de 1,25(OH)D₃ e aumentando a excreção urinária de fósforo⁴⁶. Nossos resultados mostram que fósforo sérico não apresentou oscilações após suplementação de VitD em todos os tempos de avaliação e que também não houve diferença entre os diferentes sexos. Sendo assim, a dose de VitD administrada não promove mudanças no fósforo sérico no tempo estudado, não tendo influência sobre as demais variáveis analisadas.

Estresse oxidativo

Nosso trabalho tem como premissa que a suplementação de doses excessivas de VitD provoca agressão ao coração por meio de estresse oxidativo. O estresse oxidativo (EO) consiste no desequilíbrio de produtos oxidativos, e de defesas antioxidantes. O aumento de produtos oxidativos, como espécies reativas de oxigênio (ROS), promovem danos oxidativos por meio de reação com componentes celulares⁴⁷. O organismo conta com sistema antioxidante que neutraliza a ação das ROS impedindo o dano oxidativo celular. O sistema antioxidante é subdividido em enzimático e não enzimático. O sistema enzimático é de caráter endógeno e tem sua resposta influenciada pela duração e intensidade do EO. Por exemplo, em situações de estresse oxidativo de baixa intensidade há ativação do complexo Keap1/Nrf-2 que regula a transcrição de enzimas que neutralizam ROS. Já em situações de estresse oxidativo de média e alta intensidade há ativação da via do NF-κB e de apoptose celular, respectivamente²².

O MDA é considerado importante marcador de dano oxidativo sendo produto secundário da peroxidação lipídica de ácidos graxos poli-insaturados, principalmente de membranas celulares⁴⁸. Nossos dados mostram que a VitD não produz alterações nas concentrações de MDA no tecido cardíaco. Porém, a avaliação de dano oxidativo não se restringe somente ao MDA. Outros marcadores, como hidroperóxido de lipídio (HL) e proteína carbonil, também são amplamente utilizados na literatura⁴⁹ e não é incomum que sejam observadas alterações desses marcadores isoladamente⁵⁰. Estudos anteriores de nosso grupo com mesmo modelo experimental observaram presença de EO pelo aumento de HL^{21,51}. Dessa maneira, HL parece ser o melhor marcador de EO em modelos de agressão semelhantes aos nossos e sua realização é importante para avaliação mais real de EO.

A determinação da atividade de enzimas antioxidantes também é de extrema importância para avaliação de EO. Um dos principais sistemas de enzimas antioxidantes é a tiorredoxina (Trx). O sistema Trx é o maior sistema do tipo tiol-dissulfeto e é composto pelas proteínas Trx e Trx redutase que atuam na catalisação de reduções de produtos oxidativos e também na regeneração de outras enzimas antioxidantes⁵². Quanto à catalisação de produtos oxidativos, Trx pode atuar diretamente sobre ROS doando equivalentes redutores para neutralizá-las como também pode modular indiretamente sinais de transdução de ROS⁵². Já em relação à regeneração de enzimas antioxidantes a Trx realiza essa função por meio da doação de equivalentes redutores que permite a manutenção do trabalho antioxidante dessas proteínas, entre elas GPx-1 e SOD⁵²⁻⁵⁴. Em ambas as situações a Trx torna-se oxidada. Para voltar a

exercer suas funções, a Trx oxidada é reduzida pela Trx redutase utilizando NADPH como doador de hidrogênio⁵². A maior ativação de Trx no tempo 40 dias observada em nosso trabalho mostra haver desequilíbrio do processo oxidativo nos animais VD de forma temporal. Santos (2016)²¹ também avaliou a atividade de Trx e observou processo contrário com diminuição da atividade de Trx. Os autores atribuem essa redução à regulação positiva de VitD sobre a proteína de interação com a tiorredoxina (TXNIP) a qual é regulada positivamente pela VitD por meio do gene vitamin D-up regulated (VDUP-1)²¹. Porém, Santos (2016)²¹ utilizou outra metodologia de avaliação da atividade de Trx. Dessa forma, os resultados devem ser interpretados com cautela e levando em consideração diferenças entre os métodos.

Via antioxidante de estresse oxidativo de baixa intensidade (sistema Keap-1/Nrf-2, HO-1 e Gpx-1)

O sistema Keap-1/Nrf-2 é um dos principais reguladores da resposta antioxidante e é ativado por EO de baixa intensidade. Em situações de equilíbrio oxidativo a proteína Nrf-2 encontra-se no citoplasma ligada às proteínas Keap-1 e Cullin 3⁵⁵. O Keap-1 serve como adaptador de substrato permitindo a ubiquitinação do Nrf-2 pela Cullin 3⁵⁵. O aumento de espécies reativas de oxigênio promove mudanças de grupamentos de cisteína de Keap-1 que altera o sistema de ubiquitinação ao Nrf-2⁵⁵. Com isso, o Nrf-2 fica livre e migra para o núcleo celular, onde se heterodimeriza com fatores de transcrição de proteínas antioxidantes, como GPx-1 e HO-1. A suplementação de VitD não promoveu mudanças na expressão das proteínas Keap-1, Nrf-2 e GPx-1 em nossos animais que está de acordo com os dados de Santos (2016)²¹ que também não observou alterações de expressão dessas proteínas após 60 dias de suplementação de VitD. Curiosamente, nossos animais VD apresentaram valores maiores de HO-1. Assim sendo, a expressão de HO-1 nos animais VD parece ser estimulada por outras vias independentes de Keap-1/Nrf-2.

Via antioxidante de estresse oxidativo de média intensidade (via NF-κB)

O NF-κB é reconhecido como um dos principais reguladores da resposta inflamatória do organismo e possui cinco subunidades, sendo p65 (RelA) a mais bem caracterizada⁵⁶. O NF-κB encontra-se sequestrado no citoplasma celular associado a proteínas inibitórias κB (IκB) por meio de heterodimerização, sendo sua principal representante a IκBα⁵⁶. Para que NF-κB seja ativado é necessário que IκB seja fosforilado por meio do complexo de proteínas quinase IKK responsivo a estímulos como estresse oxidativo de média intensidade e citocinas pró-

inflamatórias⁵⁶. A fosforilação de I κ B desfaz sua ligação com NF- κ B, deixando o livre. Assim, o NF- κ B migra para o núcleo celular, onde se torna ativo após fosforilação em domínios específicos, e interage com fatores de transcrição de proteínas envolvidas no processo inflamatório⁵⁷. Nossos dados mostram que a suplementação de VitD promoveu aumento da relação p- I κ B/ I κ B em todos os tempos avaliados. Essa relação sugere maior degradação de I κ B e, conseqüentemente, maior disponibilidade de NF- κ B livre na célula. Além disso, a relação p- NF- κ B/ NF- κ B também foi alterada e se mostrou associada ao tempo de suplementação empregado com menor relação no tempo 20 dias e maior no tempo 40 dias. Dessa maneira, a VitD influencia NF- κ B de forma variável ao longo do tempo de suplementação.

As alterações de NF- κ B podem explicar o aumento de HO-1 nos animais VD, pois a expressão de HO-1 também pode ser aumentada por agressões de média e alta intensidade, como na inflamação e hipóxia^{58,59}. A HO-1 pertence ao grupo de heme oxigenases evolutivamente conservadas presentes na maioria dos tipos celulares e possui baixa expressão em condições de equilíbrio⁵⁹. Na vigência de agentes estressores a expressão de HO-1 é aumentada e atua no processo de desintoxicação celular por meio da degradação do grupamento heme da hemoglobina formando biliverdina, monóxido de carbono (CO) e ferro férrico. A biliverdina atua na supressão de espécies reativas de oxigênio, neutralizando a peroxidação lipídica, e CO possui propriedades anti-inflamatórias, anti-apoptóticas e vasorelaxantes^{60,61}. O aumento de HO-1 nos animais pode ser resultante de tentativa de neutralização da agressão a fim de manter a integridade celular.

Via antioxidante de estresse oxidativo de alta intensidade (vias de apoptose celular)

A suplementação de VitD também parece influenciar o processo de apoptose celular. A apoptose é processo biológico essencial que permite a remoção de células indesejadas, seja em processos patológicos como também para manutenção da homeostase tecidual⁶². 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 apoptose²². O processo de apoptose é altamente regulado e ocorre por meio da interação de fatores pró e anti-apoptóticos. Um dos principais sistemas de regulação ocorre pela interação das proteínas BAX (pró-apoptótica) e Bcl-2 (anti-apoptótica) localizadas na membrana mitocondrial. Na ausência de estímulos pró apoptóticos, a BAX permanece inativada por meio de dimerização à Bcl-2 que mantém a integridade da membrana mitocondrial. Quando há estímulos de fatores pró-apoptóticos a Bax

se desliga de Bcl-2 e formam dímeros Bax-Bax que criam poros na membrana mitocondrial favorecendo apoptose mediada por citocromo C⁶³. Dessa maneira, a interpretação do processo apoptótico intermediado por BAX e Bcl-2 deve ser analisado com base na relação das duas proteínas⁶⁴. Foi observada interação entre os fatores suplementação e sexo na razão BAX/Bcl-2 na qual a suplementação de VitD promoveu alteração na relação existente entre animais machos e fêmeas. Quando realizadas comparações entre machos e fêmeas do grupo controle foi observado que as fêmeas possuíam maior razão Bax/Bcl-2 em relação aos machos, mostrando existir diferença fisiológica entre os sexos. Contudo, essa diferença não foi observada entre machos e fêmeas que receberam VitD. A comparação entre animais controle e VD dentro de cada sexo também não mostrou diferença significativa. Esses resultados são intrigantes, e mostram que VitD altera a relação Bax/Bcl-2 entre machos e fêmeas por fatores inerentes ao sexo dos animais.

Limitações do estudo

A maior limitação de nosso trabalho é o desenho complexo envolvendo diversos fatores e que por isso exige análise estatística robusta. Mesmo utilizando de teste estatístico adequado algumas variáveis apresentaram perda de poder estatístico. Em um primeiro momento, foi levantada a possibilidade de outro desenho experimental apenas com animais machos nos diferentes tempos. Porém, como o metabolismo da VitD parece ser diferente entre os sexos a inclusão do fator sexo foi imperativa. Historicamente há subutilização de animais do sexo feminino em estudos experimentais e a não consideração de diferenças entre os sexos prejudica o norteamto de estudos clínicos utilizando as mesmas intervenções^{65,66}.

Outra importante limitação é que a suplementação de VitD foi avaliada tendo como base apenas o consumo da vitamina na ração. Devido a limitações técnicas não foi possível realizar a determinação plasmática de 25(OH)D₃. Em tempo oportuno será realizada essa análise para compor os dados para publicação.

Considerações finais

Nossos dados mostram que a suplementação com doses excessivas de VitD acarreta agressão de média intensidade e modula respostas antioxidantes aparentemente mediadas pela via do NF- κ B. Isso pode ser observado pela mudança de comportamento das diferentes proteínas envolvidas na via NF- κ B. Porém, não é possível dizer em qual momento avaliado a agressão é mais presente devido ao comportamento distinto de suas proteínas nos diferentes

tempos. Um dos principais exemplos é a razão p-NF- κ B/ NF- κ B em que animais VD tiveram valores menores e maiores comparados aos controles nos tempos 20 e 40 dias, respectivamente. Em contrapartida a relação p-I κ B/ I κ B total foi maior nos animais VD de forma geral mostrando maior liberação de NF- κ B. É necessário ressaltar que a via NF- κ B possui grande complexidade e nosso estudo não compreendeu todos os seus componentes. Assim, uma avaliação mais aprofundada da via NF- κ B é necessária a fim de esclarecer como ela influenciada por nosso modelo experimental nos diferentes tempos.

Nossa hipótese de que animais machos e fêmeas apresentariam respostas bioquímicas e moleculares diferentes não foi totalmente sustentada. Embora Gpx-1 tenha apresentado interação entre os fatores suplementação e sexo não foi observada diferenças no teste de comparações múltiplas. Outra variável que mostrou interação entre suplementação e sexo foi a razão Bax/Bcl-2. Nossos dados mostram que a relação é maior em animais controle do sexo feminino em comparação aos animais controle masculinos, mas que essa diferença não ocorre nos animais VD machos e fêmeas. Curiosamente, a comparação entre animais controle e VD dentro dos sexos não mostrou diferença significativa. Assim, por ora não nos parece prudente afirmar que VitD possa alterar processos de apoptose celular em nossos animais. Esta resposta pode ser algum mecanismo fisiológico existente.

Em relação a trabalhos futuros, um dos nossos principais interesses é verificar se a suplementação de doses excessivas de VitD em ratas gestantes pode afetar o desenvolvimento cardíaco da prole. A constatação de que doses excessivas de VitD acarretam alterações de proteínas responsivas a agressões de média intensidade levantam a suspeita que o uso indiscriminado de VitD durante a gestação possa produzir efeitos deletérios nos descendentes por meio de alterações epigenéticas.

7. CONCLUSÃO

A suplementação de doses excessivas de VitD produz alterações bioquímicas e moleculares nas vias envolvidas nos mecanismos de oxidação/antioxidação de média intensidade mediada pela via do NF- κ B. O tempo de suplementação é fator importante na observação dessas alterações.

8. REFERÊNCIAS

1. MARTINI, Ligia; PETERS, Barbara Santarosa Emo (Org.). **Cálcio e Vitamina D - Fisiologia, Nutrição e Doenças Associadas**. São Paulo: Manole, 2017. 336 p.
2. CHEN, Tai C. et al. Factors that influence the cutaneous synthesis and dietary sources of vitamin D. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 460, n. 2, p. 213-217, 2007.
3. LIPS, Paul. Vitamin D physiology. **Progress in biophysics and molecular biology**, v. 92, n. 1, p. 4-8, 2006.
4. ZEHNDER, Daniel et al. Extrarenal expression of 25-hydroxyvitamin D3-1 α -hydroxylase. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 86, n. 2, p. 888-894, 2001
5. CHRISTAKOS, Sylvia et al. Vitamin D: metabolism, molecular mechanism of action, and pleiotropic effects. **Physiological reviews**, v. 96, n. 1, p. 365-408, 2015.
6. PIKE, J. Wesley et al. Genomic Determinants of Vitamin D-Regulated Gene Expression. **Vitamin D Hormone**, v. 100, p. 21-44, 2016.
7. CARLBERG, Carsten. Nutrigenomics of Vitamin D. **Nutrients**, v. 11, n. 3, p. 676, 21 mar. 2019.
8. CHRISTAKOS, Sylvia et al. Vitamin D: metabolism, molecular mechanism of action, and pleiotropic effects. **Physiological reviews**, v. 96, n. 1, p. 365-408, 2015.
9. LIPS, Paul; VAN SCHOOR, Natasja M. The effect of vitamin D on bone and osteoporosis. **Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism**, v. 25, n. 4, p. 585-591, 2011.
10. PALACIOS, Cristina; GONZALEZ, Lilliana. Is vitamin D deficiency a major global public health problem? **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 144, p. 138-145, 2014.
11. WACKER, Matthias; HOLICK, Michael F. Sunlight and Vitamin D: A global perspective for health. **Dermato-endocrinology**, v. 5, n. 1, p. 51-108, 2013.
12. HOLICK, Michael F. Vitamin D deficiency. **New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 3, p. 266-281, 2007.
13. PEREIRA-SANTOS, M. et al. Obesity and vitamin D deficiency: a systematic review and meta-analysis. **Obesity reviews**, v. 16, n. 4, p. 341-349, 2015.

14. ROSS, A. Catharine et al. The 2011 Report on Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D from the Institute of Medicine: what clinicians need to know. **The Journal Of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 96, n. 1, p. 53-58, jan. 2011.
15. HOLICK, Michael F et al.. Evaluation, Treatment, and Prevention of Vitamin D Deficiency: an endocrine society clinical practice guideline. **The Journal Of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 96, n. 7, p. 1911-1930, jul. 2011.
16. PIUDOWSKI, Paweł et al. Practical guidelines for the supplementation of vitamin D and the treatment of deficits in Central Europe — recommended vitamin D intakes in the general population and groups at risk of vitamin D deficiency. **Endokrynologia Polska**, v. 64, n. 4, p. 319-327, 4 set. 2013.
17. GERMAN NUTRITION SOCIETY. **New Reference Values for Vitamin D. Annals Of Nutrition And Metabolism**, v. 60, n. 4, p. 241-246, 2012.
18. ZITTERMANN, Armin; SCHLEITHOFF, Stefanie S.; KOERFER, Reiner. Vitamin D and vascular calcification. **Current opinion in lipidology**, v. 18, n. 1, p. 41-46, 2007.
19. SUNG, Ki-Chul et al. High levels of serum vitamin D are associated with a decreased risk of metabolic diseases in both men and women, but an increased risk for coronary artery calcification in Korean men. **Cardiovascular diabetology**, v. 15, n. 1, p. 112, 2016.
20. AZEVEDO, Paula S. et al. Cardiac remodeling: concepts, clinical impact, pathophysiological mechanisms and pharmacologic treatment. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 106, n. 1, p. 62-69, 2016.
21. 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**. 2015. 106 f. Tese (Doutorado) - Curso de Fisiopatologia em Clínica Médica, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Botucatu, 2015.
22. LUSHCHAK, Volodymyr I.. Adaptive response to oxidative stress: bacteria, fungi, plants and animals. **Comparative Biochemistry And Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 153, n. 2, p. 175-190, mar. 2011.
23. REDZA-DUTORDOIR, Maureen; AVERILL-BATES, Diana A.. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Molecular Cell Research**, v. 1863, n. 12, p. 2977-2992, dez. 2016.
24. MITHAL, Ambrish et al. Global vitamin D status and determinants of hypovitaminosis D. **Osteoporosis international**, v. 20, n. 11, p. 1807-1820, 2009.

25. YOUSEFZADEH, Pegah; SHAPSES, Sue A.; WANG, Xiangbing. Vitamin D binding protein impact on 25-hydroxyvitamin D levels under different physiologic and pathologic conditions. **International journal of endocrinology**, v. 2014, 2014.
26. LAGUNOVA, Zoya et al. The dependency of vitamin D status on body mass index, gender, age and season. **Anticancer research**, v. 29, n. 9, p. 3713-3720, 2009.
27. SAKI, Forough et al. Effect of prolactin and estrogen on the serum level of 1,25-dihydroxy vitamin D and FGF23 in female rats. **Archives Of Gynecology And Obstetrics**, v. 302, n. 1, p. 265-271, 14 maio 2020.
28. CARRELLI, Angela et al. Vitamin D storage in adipose tissue of obese and normal weight women. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 32, n. 2, p. 237-242, 2017.
29. GAUGRIS, S et al. Vitamin D inadequacy among post-menopausal women: a systematic review. **Qjm: An International Journal of Medicine**, [S.L.], v. 98, n. 9, p. 667-676, 8 jul. 2005.
30. GOZZER, Pamela et al. Comportamento de ratos Wistar: importância do enriquecimento ambiental. **Saúde em Revista**, v. 17, n. 48, p. 69-77.
31. DEL VALLE, Heather B. et al. (Ed.). **Dietary reference intakes for calcium and vitamin D**. National Academies Press, 2011.
32. HRUBEC, Zdenek; NEEL, James V. The National Academy of Sciences--National Research Council Twin Registry: ten years of operation. **Progress in clinical and biological research**, v. 24, p. 153-172, 1978.
33. SHEPARD, Richard M.; DELUCA, Hector F. Plasma concentrations of vitamin D3 and its metabolites in the rat as influenced by vitamin D3 or 25-hydroxyvitamin D3 intakes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 202, n. 1, p. 43-53, 1980.
34. DOS SANTOS, Priscila Portugal et al. Vitamin D induces increased systolic arterial pressure via vascular reactivity and mechanical properties. **PLoSOne**, v. 9, n. 6, p. e98895, 2014.
35. ARNÉR, Elias SJ; HOLMGREN, Arne. Measurement of thioredoxin and thioredoxin reductase. **Current protocols in toxicology**, v. 24, n. 1, p. 7.4. 1-7.4. 14, 2005.
36. BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

37. KHOSCHSORUR, Gholan Ali. et al. Evaluation of a sensitive HPLC method for the determination of malondialdehyde, and application of the method to different biological materials. **Chromatographia**, v. 52, n. 3-4, p. 181-184, 2000.
38. NIELSEN, Flemming et al. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. **Clinical chemistry**, v. 43, n. 7, p. 1209-1214, 1997.
39. GREEN, Douglas R.; REED, John C. Mitochondria and apoptosis. **Science**, p. 1309-1312, 1998.
40. SLOB, A.Koos; BOSCH, Jacob J. van Der Werff Ten. Sex differences in body growth in the rat. **Physiology & Behavior**, v. 14, n. 3, p. 353-361, 1975.
41. CLINE, Jill. Calcium and Vitamin D Metabolism, Deficiency, and Excess. **Topics In Companion Animal Medicine**, v. 27, n. 4, p. 159-164, 2012.
42. JORDE, Rolf; SUNDSFJORD, Johan; FITZGERALD, Patrick; BØNAA, Kaare H.. Serum Calcium and Cardiovascular Risk Factors and Diseases. **Hypertension**, v. 34, n. 3, p. 484-490, 1999.
43. ROBERTS, William C.; WALLER, Bruce F.. Effect of chronic hypercalcemia on the heart. An analysis of 18 necropsy patients. **The American Journal Of Medicine**, v. 71, n. 3, p. 371-384, 1981.
44. ROMÁN-GARCÍA, Pablo et al. High phosphorus diet induces vascular calcification, a related decrease in bone mass and changes in the aortic gene expression. **Bone**, v. 46, n. 1, p. 121-128, 2010.
45. HRUSKA, Keith et al. Cardiovascular risk factors in chronic kidney disease: does phosphate qualify?. **Kidney International**, v. 79, p. 9-13, 2011.
46. SHIMADA, Takashi et al. FGF-23 Is a Potent Regulator of Vitamin D Metabolism and Phosphate Homeostasis. **Journal Of Bone And Mineral Research**, v. 19, n. 3, p. 429-435, 2003.
47. SIES, Helmut; BERNDT, Carsten; JONES, Dean P. Oxidative stress. **Annual review of biochemistry**, v. 86, p. 715-748, 2017.
48. AYALA, Antonio; MUÑOZ, Mario F.; ARGÜELLES, Sandro. Lipid Peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, v. 2014, p. 1-31, 2014.
49. GROTTTO, Denise et al. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects FOR malondialdehyde quantification. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 169-174, 2009.

50. COSTA, Nara Aline et al. Protein carbonyl concentration as a biomarker for development and mortality in sepsis-induced acute kidney injury. **Bioscience Reports**, v. 38, n. 1, 25 jan. 2018.
51. Figueiredo, Amanda de Menezes. **Participação do fator de crescimento de fibroblastos-23 (FGF-23) no estresse oxidativo, no metabolismo energético, alterações morfológicas e funcionais cardíacas associadas à suplementação de vitamina D em ratos**. 2020. 106 f. Tese (Doutorado) - Curso de Fisiopatologia em Clínica Médica, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2020.
52. WATSON, W. H.. Thioredoxin and Its Role in Toxicology. **Toxicological Sciences**, v. 78, n. 1, p. 3-14, 2004.
53. DAS, Kumuda C.; LEWIS-MOLOCK, Yvette; WHITE, Carl W. Elevation of manganese superoxide dismutase gene expression by thioredoxin. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 17, n. 6, p. 713-726, 1997.
54. IÑARREA, Pedro et al. Mitochondrial respiratory chain and thioredoxin reductase regulate intermembrane Cu, Zn-superoxide dismutase activity: implications for mitochondrial energy metabolism and apoptosis. **Biochemical Journal**, v. 405, n. 1, p. 173-179, 2007.
55. SATTA, Sandro et al. The Role of Nrf2 in Cardiovascular Function and Disease. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity** v. 2017, p. 1-18, 2017.
56. KARIN, Michael. How NF- κ B is activated: the role of the I κ B kinase (IKK) complex. **Oncogene**, v. 18, n. 49, p. 6867-6874, 1999.
57. CHRISTIAN, Frank; SMITH, Emma L.; CARMODY, Ruaidhrí J. The regulation of NF- κ B subunits by phosphorylation. **Cells**, v. 5, n. 1, p. 12, 2016.
58. JADHAV, Ashok; TORLAKOVIC, Emina; NDISANG, Joseph Fomusi. Interaction among heme oxygenase, nuclear factor- κ B, and transcription activating factors in cardiac hypertrophy in hypertension. **Hypertension**, v. 52, n. 5, p. 910-917, 2008.
59. CZIBIK, Gabor et al. Heme oxygenase-1: an emerging therapeutic target to curb cardiac pathology. **Basic Research In Cardiology**, v. 109, n. 6, p. 327-345, 2014.
60. WANG, Guangwu et al. Cardioprotective and anti-apoptotic effects of heme oxygenase-1 in the failing heart. **Circulation**, v. 121, n. 17, p. 1912, 2010.
61. ARAUJO, Jesus A.; ZHANG, Min; YIN, Fen. Heme Oxygenase-1, Oxidation, Inflammation, and Atherosclerosis. **Frontiers In Pharmacology**, [S.L.], v. 3, p. 0-1, 2012.
62. ELMORE, Susan. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.

63. GUSTAFSSON, Åsa B.; GOTTLIEB, Roberta A.. Bcl-2 family members and apoptosis, taken to heart. **American Journal Of Physiology-Cell Physiology**, v. 292, n. 1, p. 45-51, 2007.
64. RAISOVA, Monika et al. The Bax/Bcl-2 ratio determines the susceptibility of human melanoma cells to CD95/Fas-mediated apoptosis. **Journal of investigative dermatology**, v. 117, n. 2, p. 333-340, 2001.
65. CLAYTON, Janine Austin. Studying both sexes: a guiding principle for biomedicine. **The Faseb Journal**, v. 30, n. 2, p. 519-524, 2015.
66. CLAYTON, Janine A.; COLLINS, Francis S.. Policy: NIH to balance sex in cell and animal studies. **Nature**, v. 509, n. 7500, p. 282-283, 2014.