



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO

LAISE LOURDES PEREIRA TAVARES DE SOUZA

**INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO DE VITAMINA D NO METABOLISMO
DE RATOS DIABÉTICOS**

Rio de Janeiro

2015

LAISE LOURDES PEREIRA TAVARES DE SOUZA

**INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO DE VITAMINA D NO METABOLISMO
DE RATOS DIABÉTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO), como requisito para a obtenção do título de mestre em Alimentos e Nutrição.

Orientadora: Prof. Dra. Cláudia Cardoso Netto

Rio de Janeiro

2015

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”

Theodore Roosevelt.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Paulo e Regina pela educação, confiança, dedicação e amor a mim proporcionados, por acreditarem nos meus sonhos e não medirem esforços para que se realizem, por incentivarem minhas decisões, vibrarem com minhas conquistas e me confortarem nos momentos difíceis. Obrigada por tudo, sempre.

Aos meus amados irmãos Larissa e Lauro, por todo o companheirismo, alegria, presença, carinho e amizade.

À minha avó Lourdes (*in memoriam*), meu grande amor e minha grande saudade, pelos ensinamentos de uma vida inteira, pelo caráter, educação, força e humanidade a mim repassados. Te amo sempre! Aos demais familiares, em especial aos do Rio de Janeiro por todo o acolhimento na minha chegada à cidade e presença nos momentos de dificuldades e adaptação.

Ao Givago, pelo amor, incentivo e compreensão nesta trajetória.

A todos os amigos por tornarem essa jornada muito mais prazerosa e feliz.

À Claudia Netto, minha orientadora, pela oportunidade oferecida, pelos valiosos ensinamentos e confiança depositada. Obrigada pela condução e estímulo durante todas as fases do desenvolvimento deste trabalho.

As minhas alunas de iniciação científica Isabella Garcia, Jéssica Branco e Kátia Vanço, pela participação essencial durante toda parte prática e experimental deste trabalho, e por me proporcionarem momentos de descontração e amizade no intervalo das atividades.

Ao Professor Luiz Fernando pela ajuda e cooperação primordial na fase de sacrifício dos animais.

A todos os funcionários e professores do Instituto Biomédico, especialmente do Departamento de Bioquímica da UNIRIO, pelo acolhimento e apoio constantes, sempre dispostos a ajudar.

À coordenação de Apoio de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo apoio financeiro, indispensável para a realização deste trabalho.

RESUMO

A vitamina D pode atuar em diversos processos celulares vitais. Atualmente, inúmeros estudos têm demonstrado a associação entre baixos níveis séricos de vitamina D e fatores de risco que constituem critérios diagnósticos para diabetes mellitus. Este estudo avaliou a influência da suplementação de vitamina D no metabolismo de ratos diabéticos e nos parâmetros bioquímicos relacionados à doença. Trinta e dois ratos recém-desmamados foram divididos em quatro grupos de oito animais: 1- controle não diabéticos (C), 2- diabéticos não suplementados (DC), 3- diabéticos suplementados com 10 µL de vitamina D/dia (DS50), 4- diabéticos suplementados com 13 µL de vitamina D/dia (DS100), durante 20 dias. A indução da diabetes foi realizada através da aplicação de estreptozotocina intraperitoneal, na concentração de 60 mg/Kg de peso do animal. O peso corporal e o consumo de ração foram monitorados três vezes por semana, água e ração oferecidas *ad libitum*. A eutanásia foi realizada por punção cardíaca. Posteriormente, foram realizadas as análises sanguíneas de triglicerídeos, colesterol total, HDL, glicemia, albumina, proteínas totais, insulina, vitamina D e cálcio por meio de espectrofotometria e ELISA. Os resultados foram submetidos à análise de variância ANOVA, sendo utilizado o teste de Tukey para o confronto das médias ($p < 0.05$). Verificou-se diminuição na glicemia de jejum dos animais suplementados com vitamina D em relação aos diabéticos não suplementados ($C = 113,35 \pm 6,71$; $DC = 410,78 \pm 42,24$; $DS50 = 346,71 \pm 66,00$; $DS100 = 240,53 \pm 56,57$; $p = 0,0004$), havendo diminuição da glicemia relacionada ao aumento da dosagem de vitamina D. Os valores de TG apesar de não apresentarem significância estatística, diminuíram acentuadamente nos grupos suplementados ($C = 90,73 \pm 18,67$; $DC = 107,51 \pm 12,74$; $DS50 = 73,57 \pm 14,58$; $DS100 = 83,90 \pm 6,78$; $p = 0,41$), proteínas totais apresentaram aumento nos grupos suplementados ($C = 5,46 \pm 0,17$; $DC = 4,85 \pm 0,09$; $DS50 = 5,17 \pm 0,27$; $DS100 = 5,63 \pm 0,27$; $p = 0,0583$), assim como os valores de albumina ($C = 3,19 \pm 0,08$; $DC = 2,84 \pm 0,03$; $DS50 = 3,04 \pm 0,12$; $DS100 = 3,10 \pm 0,08$; $p = 0,0235$). Os valores de colesterol total, HDL, vitamina D e cálcio não apresentaram diferenças significativas relacionadas à suplementação. A vitamina D está relacionada com a diminuição dos valores de glicemia de jejum e aumento da insulina nos grupos suplementados, o que sugere melhora desses parâmetros relacionados à doença. Outros parecem não se relacionarem com a suplementação, necessitando de mais estudos acerca do tema.

Palavras-chave: Vitamina D, Diabetes Mellitus, Metabolismo, Ratos.

ABSTRACT

Vitamin D can act in various vital cellular processes. Currently, numerous studies have demonstrated an association between low serum vitamin D levels and parameters which are diagnostic criteria for diabetes mellitus. This study evaluated the effect of vitamin D supplementation on the metabolism of diabetic rats and biochemical parameters related to the disease. 32 weanling rats were divided into four groups of eight animals: 1- nondiabetic controls (C), 2- unsupplemented diabetic (DC), 3- diabetic supplemented with vitamin D 10 L / day (DS50) 4- diabetic supplemented with 13 uL of vitamin D / day (DS100) for 20 days. The induction of diabetes was performed by applying streptozotocin intraperitoneally at a concentration of 60 mg / kg of animal weight. Body weight and feed intake were monitored three times a week, provided water and food *ad libitum*. The animals were sacrificed by cardiac puncture. Subsequently, the blood analyzes were performed triglycerides, total cholesterol, HDL, glucose, albumin, total protein, insulin, vitamin D and calcium by spectrophotometry and ELISA. The results were submitted to ANOVA were performed using the Tukey test for comparison of means ($p < 0.05$). There was decrease in animal fasting glucose supplemented with vitamin D compared to diabetics without supplementation ($C = 113.35 \pm 6.71$; $DC = 410.78 \pm 42.24$; $DS50 = 346.71 \pm 66.00$; $DS100 = 240.53 \pm 56.57$; $p = 0.0004$), with decreased blood glucose associated with an increased dosage of vitamin D. The TG values while not present statistical significance, declined sharply in the supplemented groups ($C = 90.73 \pm 18.67$; $DC = 107.51 \pm 12.74$; $DS50 = 73.57 \pm 14.58$; $DS100 = 83.90 \pm 6.78$; $p = 0.41$), total protein showed an increase in supplemented groups ($C = 5.46 \pm 0.17$; $DC = 4.85 \pm 0.09$, $5.17 \pm 0.27 = DS10$; $DS13 = 5.63 \pm 0.27$; $p = 0.0583$) as well as albumin values ($C = 3.19 \pm 0.08$; $DC = 2.84 \pm 0.03$, $DS50 = 3.04 \pm 0.12$; $DS100 = 3.10 \pm 0.08$; $p = 0.0235$). The total cholesterol, HDL, vitamin D and calcium did not show significant differences related to supplementation. Vitamin D appears to be related to a decrease of fasting insulin and blood glucose levels in the supplemented groups suggesting improvement of such parameters related to the disease. Others do not seem to relate to supplementation, requiring more studies on the subject.

Keywords: Vitamin D, Diabetes Mellitus, Metabolism, Rats.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estrutura química do ergocalciferol (vitamina D2) e do colecalciferol (vitamina D3)	4
Figura 2 Metabolismo da Vitamina D	5
Figura 3 Desenho experimental do estudo	16
Figura 4 Peso corporal (g) dos ratos por grupo no início do experimento	21
Figura 5 Peso corporal (g) dos ratos por grupo no final do experimento	22
Figura 6 Consumo alimentar diário (g/24h) dos ratos por grupo no final do experimento	23
Figura 7 Níveis séricos de glicose de jejum dos ratos por grupo no final do experimento	24
Figura 8 Níveis séricos de colesterol total dos ratos por grupo no final do experimento	25
Figura 9 Níveis séricos de HDL-colesterol dos ratos por grupo no final do experimento	26
Figura 10 Níveis séricos de triglicérides dos ratos por grupo no final do experimento	27
Figura 11 Níveis séricos de 25OHD ₃ dos ratos por grupo no final do experimento	27
Figura 12 Níveis séricos de insulina dos ratos por grupo no final do experimento	28
Figura 13 Níveis séricos de proteínas totais dos ratos por grupo no final do experimento	29
Figura 14 Níveis séricos de albumina dos ratos por grupo no final do experimento	30
Figura 15 Níveis séricos de cálcio dos ratos por grupo no final do experimento	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Distribuição e descrição dos grupos experimentais do estudo	15
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1,25 (OH)2D	1,25 Dihidroxivitamina D
25-OHD	25 Hidroxivitamina D
ADA	<i>American diabetes association</i>
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
ANOVA	Análise de variância
CEUA	Comitê de ética em Experimentação animal
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CT	Colesterol total
DM	Diabetes mellitus
DMG	Diabetes gestacional
DMT1	Diabetes mellitus tipo 1
DMT2	Diabetes mellitus tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DP	Desvio padrão
ELISA	Imunoensaio ligado á enzima
EPM	Erro padrão da média
FGF – 23	Fator de crescimento de fibroblastos
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GLUT	– Transportador de glicose específico
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
INS- R	Receptores de Insulina
IOF	<i>International Osteoporosis Foundation</i>
IOM	<i>Institute of Medicine of the National Academics</i>
LADA	<i>Latent Autoimmune diabetes in adults</i>
LLP	Lipase lipoprotéica
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
OMS	Organização Mundial da Saúde
PE	Pernambuco
PTH	Paratormônio
RXR	Receptor de ácido retinóico
SBD	Sociedade Brasileira de diabetes

STZ Estreptozotocina

TG Triglicéridos

UNIRIO Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

UV Radiação Ultravioleta

VLDL Lipoproteína de muito baixa densidade

VD Vitamina D

VDR Vitamin D Receptor (Receptores nucleares específicos de vitamina D)

VDRE Fatores de transcrição heterodímeros de Vitamina D

SUMÁRIO

Resumo	
Abstract	
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Vitamina D	3
2.1.1 Aspectos fisiológicos e metabólicos	3
2.1.2 Deficiência: definição, causas e complicações	6
2.1.3 Mecanismo de ação	9
2.2 Diabetes mellitus	10
2.2.1 Vitamina D e diabetes	11
3 OBJETIVOS	13
3.1 Objetivo geral	13
3.2 Objetivo específico	13
4 METODOLOGIA	14
4.1 Aspectos éticos	14
4.2 Desenho experimental	14
4.3 Protocolo de indução do diabetes experimental	17
4.4 Suplementação de vitamina D	17
4.5 Eutanásia e obtenção do soro	18
4.6 Análises bioquímicas	18
4.6.1 Glicemia	18
4.6.2 Perfil lipídico	18
4.6.3 Insulina e Vitamina D	19
4.6.4 Proteínas Torais, Albumina e Cálcio	19
4.7 Tratamento estatístico	20
4.8 Biossegurança	20

5 RESULTADOS	21
5.1 Peso Corporal.....	21
5.2 Consumo alimentar	22
5.3 Análises Bioquímicas.....	23
5.3.1 Glicemia	23
5.3.2 Perfil Lipídico (CT, HDL e TG)	24
5.3.3 Vitamina D	27
5.3.4 Insulina	28
5.3.5 Proteínas Totais.....	28
5.3.6 Albumina	29
5.3.7 Cálcio	30
6 DISCUSSÃO	32
7 CONCLUSÃO	39
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
9 ANEXOS	52

1 INTRODUÇÃO

A hipovitaminose D é uma deficiência vitamínica prevalente nas mais variadas idades, raças, situações econômicas e regiões geográficas. Esta deficiência contribui para muitas condições, tais como, osteomalácia, osteoporose (HOLICK, 2004) e fraturas osteoporóticas (BOONEN et al., 2007) , tendo sido também associada ao aumento do risco de doenças não esqueléticas, como esclerose múltipla (MUNGER et al., 2006), câncer (GARLAND et al., 2006), doenças auto imunes, diabetes mellitus tipo 1 e 2 (FOROUHI et al., 2008) diabetes gestacional (HOLMES et al., 2009) e doenças cardiovasculares (WANG et al., 2008).

A vitamina D é um hormônio do grupo dos esteróides, tendo como principais formas o ergocalciferol (Vitamina D2) e o colecalciferol (Vitamina D3), cuja função no tecido ósseo já é bem estabelecida. Age como um regulador da homeostasia mineral por meio de sua ação nos ossos, rins e glândulas paratireóides, sendo fundamental para a absorção do cálcio e fósforo, de modo que apenas 10 a 15% do cálcio da dieta e 60% do fósforo são absorvidos no intestino sem a vitamina D. Baixos níveis de vitamina D tem se tornado uma grave endemia, em consequência de seu baixo consumo na dieta, combinado com o uso de protetores solar, hiperpigmentação da pele e ao envelhecimento. (HOLICK, 2006).

A existência de receptores para a forma ativa da vitamina D (1,25 OH₂D) em células sem ação direta no metabolismo ósseo, como células beta pancreáticas, do coração e do sistema imunológico, foi uma descoberta que ampliou o papel fisiológico desta molécula (HAUSSLER et al., 1998). Algumas dessas células contêm a enzima requerida para a síntese da vitamina independente da ação do paratormônio (PTH), sugerindo assim, ações extraesqueléticas da vitamina D. Desta forma, além de suas ações conhecidas e tradicionais, a vitamina D vem sendo, cada vez mais, estudada por seus efeitos antiproliferativos, pró-diferenciação e imunomodulatórios (BIKLE, 2009).

O diabetes mellitus é uma enfermidade crônica resultante de defeitos na secreção e/ou ação da insulina envolvendo processos específicos, tais como destruição das células beta pancreáticas, distúrbios da secreção da insulina e resistência insulínica. Trata-se de uma patologia caracterizada por um estado hiperglicêmico crônico, que, como consequência, leva à retinopatia, nefropatia, hipertensão arterial, alterações no sistema nervoso periférico, disfunções sexuais e artropatias, complicações que podem evoluir para falência dos rins, cegueira, amputação de membros inferiores, doenças

coronarianas e vasculares cerebrais de forma sucessiva (FRANCO, 2004; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2006; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2006).

O DM é uma das doenças de mais rápido crescimento em todo o mundo, sendo considerada a primeira causa de morbidade e mortalidade cardiovascular em populações ocidentais (REIMANN et al, 2009). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o DM é um problema de saúde pública mundial e em 2000 os seis países com o maior número de pacientes diabéticos eram Índia (32,7 milhões), China (22,6 milhões), Estados Unidos (15,3 milhões), Brasil (12 milhões), Paquistão (8,8 milhões) e Japão (7,1 milhões). No Brasil, aproximadamente 50% das pessoas com DM desconhecem sua condição mórbida, sendo que 10% delas são portadoras de diabetes mellitus tipo 1 (DMT1). E, em alguns países esse percentual de pessoas que desconhecem ter a doença sobe para 80% (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009).

O número de portadores de DM está aumentando devido ao envelhecimento, crescimento da população, e principalmente, devido à obesidade, alimentação inadequada e mudanças no estilo de vida das populações. Certos fatores nutricionais, tais como a vitamina D, também podem estar associados à existência e/ ou surgimento da doença; neste sentido, tem sido sugerido que a condição de baixos níveis de vitamina D possa contribuir para o aumento do risco do diabetes mellitus e sua suplementação ou níveis ideais estejam associados ao melhor controle da doença (BIKLE, 2009).

É deficiente, na revisão bibliográfica já realizada, a existência de um estudo determinando a associação da deficiência de vitamina D com o controle metabólico e as complicações crônicas em pacientes portadores de diabetes mellitus tipo, principalmente no campo experimental, em modelos animais. Esta pesquisa visa aumentar o conhecimento sobre a vitamina D, assim como as consequências da sua suplementação em animais portadoras de DM induzido. Os achados deste estudo podem mostrar uma associação direta da suplementação de vitamina D com o controle metabólico e as complicações crônicas do diabetes mellitus e, desta forma, gerar contribuições científicas na formulação de novas terapias e/ ou políticas de saúde neste campo, permitindo a recomendação de medidas que visem à redução e controle do diabetes mellitus e, conseqüentemente, à diminuição de suas complicações, proporcionando um melhor prognóstico e qualidade de vida aos portadores desta enfermidade.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Vitamina D

2.1.1 Aspectos fisiológicos e metabólicos

A vitamina D (calciferol) é um termo genérico para um grupo de esteróides lipossolúveis, cujas principais formas são a vitamina D2 e vitamina D3 (Figura 1). A vitamina D2 é sintetizada nas plantas e fungos a partir da irradiação dos raios ultravioletas e também fornecida via suplementos, enquanto a vitamina D3 é obtida através de uma reação fotolítica na pele. A vitamina D3 é um hormônio sintetizado na pele através de uma reação de isomerização térmica catalisada pela radiação ultravioleta (UV) (290 a 315 nm). A síntese cutânea é iniciada por meio da transformação do precursor epitelial 7-deidrocolesterol em coledcalciferol por ação dos raios ultravioleta. Posteriormente, o coledcalciferol entra na circulação e é transportado para o fígado, unido à proteína ligante da vitamina D (DBP). No fígado, ocorre a primeira hidroxilação, sintetizando 25-hidroxivitamina D [25(OH)D3], que será secretada no plasma. Este composto, em concentração fisiológica, tem pouca atividade biológica, necessitando de outra etapa metabólica para tornar-se ativo. Nesta etapa, a 25(OH)D3 é metabolizada pela enzima 25-hidroxivitamina D 1 α -hidroxilase nos rins, formando 1,25-dihidroxivitamina D [1,25(OH)2D3] (SCHUCH et al., 2009) (Figura 2).

A sua forma ativa [1,25(OH)2D3] atua ligando-se a um receptor nuclear específico, pertencente à família de receptores dos hormônios esteroides e tireoidianos. Este processo é regulado pelo paratormônio (PTH) e pelas concentrações sanguíneas de cálcio e fosfato. Em seguida, a 1,25-OH2D é liberada na corrente sanguínea, ligando-se à proteína ligadora da vitamina D até alcançar seus tecidos-alvos por meio dos receptores da vitamina D. Esses receptores, bem como a enzima que transforma a [25(OH)D3] na forma ativa da vitamina D, foi identificado em outros tecidos. A vitamina D3 de origem cutânea é considerada a forma natural desta vitamina, embora a via oral também possa se constituir uma fonte, representando, no entanto, menos de 20% (GRIZ, 2013).

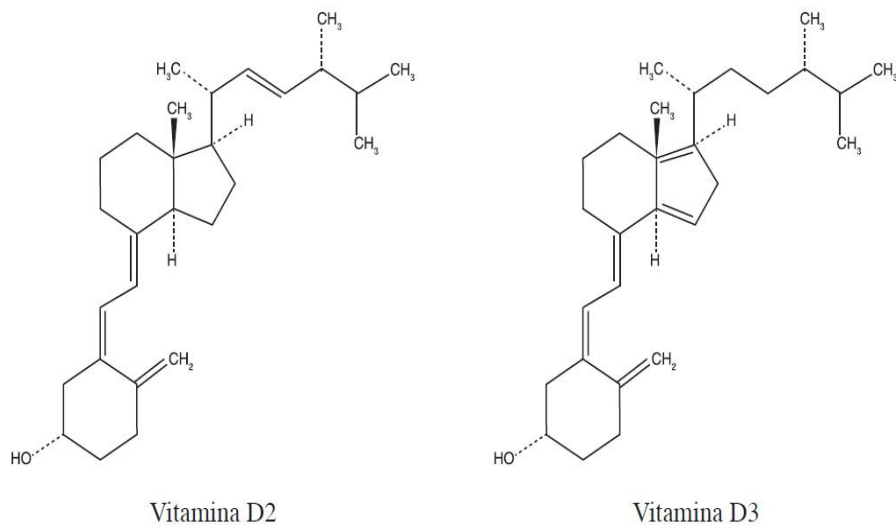


Figura 1. Estrutura química do ergocalciferol (vitamina D2) e do colecalciferol (vitamina D3). Fonte: PETERS, 2014.

Os efeitos biológicos da forma ativa da vitamina D se dão de uma maneira similar aos hormônios esteróides e são mediados pelos receptores nucleares específicos de vitamina D (VDR), presentes nos principais sítios de ação desta vitamina, como por exemplo, rins, glândulas paratireoides, intestino e osso. No núcleo das células-alvo, a 1,25(OH)₂D₃ se associa ao VDR e esse complexo se liga ao receptor de ácido retinóico (RXR), formando fatores de transcrição heterodímeros de vitamina D (VDRE), iniciando, assim, a cascata de interações moleculares que modulam a transcrição de genes específicos (DUSSO et al., 2005; KIMBALL et al., 2008). Estudos genéticos e epidemiológicos têm mostrado que o metabólito 1,25(OH)₂D₃ tem um potencial efeito anti-proliferativo e de pró-diferenciação em uma variedade de células, agindo em diferentes processos celulares, tais como: progressão do ciclo celular, apoptose, adesão celular, estresse oxidativo, função imune e metabolismo esteroide (SCHUCH et al., 2009; MUSZKAT et al., 2010; PARKER et al., 2010; ATIF et al., 2012).

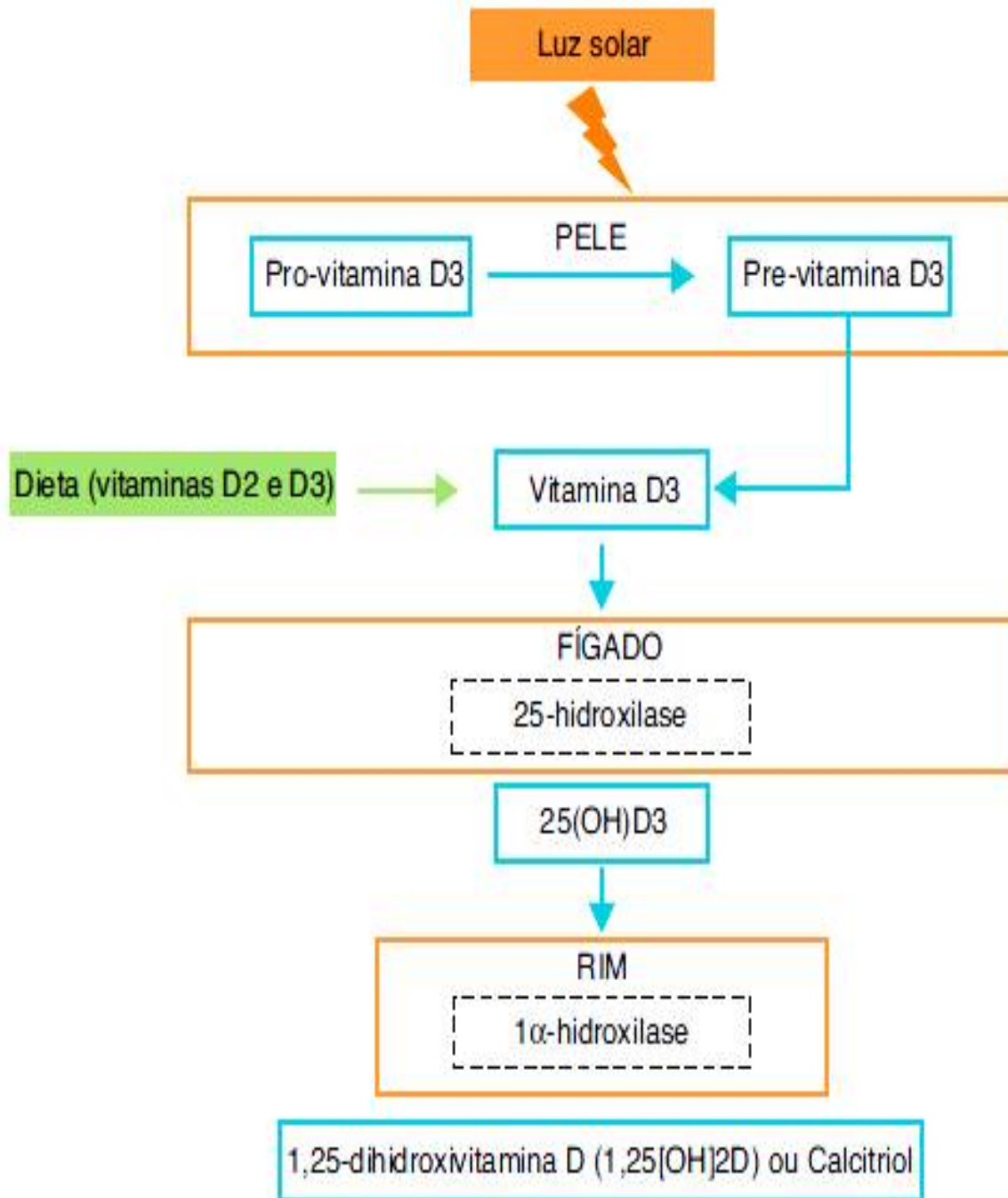


Figura 2. Metabolismo da Vitamina D.

Adaptado de N Engl J Med 2007. HOLICK, L. F.

Com isso, a vitamina D pode atuar em diversos processos celulares e fisiológicos vitais, tais como: desenvolvimento e manutenção do tecido ósseo, manutenção da homeostase normal do cálcio e do fósforo, função cognitiva e manutenção da massa muscular, câncer de mama, obesidade, doença cardiovascular e diabetes mellitus (SCHUCH et al., 2009; MUSZKAT et al., 2010; PARKER et al., 2010; ATIF et al., 2012).

2.1.2 Deficiência: definição, causas e complicações.

O status de vitamina D, atualmente, é avaliado através da dosagem sérica de 25(OH)D3 (PARKER et al., 2010), porém, o valor exato que define a deficiência desta vitamina ainda é controverso. Os estudos que tentam determinar este valor, em sua grande maioria, correlacionam a deficiência de vitamina D com a baixa densidade mineral óssea. O valor ideal de vitamina D é aquele capaz de reduzir o risco de fraturas osteoporóticas, porém, até o presente momento, não há um consenso sobre este valor. Diversos estudos têm sido elaborados com o objetivo de tentar definir o valor mínimo de 25(OH)D3 capaz de suprimir a produção de PTH e, conseqüentemente, reduzir o risco de fraturas (HUGHES, 2011).

O *Institute of Medicine of the National Academies* (IOM) considera deficiência de vitamina D valores de 25(OH)D3 abaixo de 20 ng/mL (50 nmol/L) enquanto outros especialistas, como *Endocrine Society*, *National Osteoporosis Foundation*, *International Osteoporosis Foundation* (IOF), *American Geriatric Society*, sugerem que o valor mínimo necessário para reduzir o risco de quedas e fraturas é de 30 ng/mL (75 nmol/L) (VIETH, 2006; NATIONAL OSTEOPOROSIS FOUNDATION, 2010; HOLICK et al., 2011). A Organização Mundial de Saúde (OMS) reforça a recomendação da manutenção de níveis séricos acima de 30 ng/mL (75 nmol/L) baseado em revisões que demonstram adequada supressão de PTH, absorção de cálcio e redução dos riscos de fraturas com esses níveis (OMS, 2003). Em um estudo realizado em mulheres brasileiras na pós-menopausa na cidade do Rio de Janeiro encontrou como ponto de corte para supressão do PTH o valor de 61,5 nmol/mL de 25(OH)D3 (RUSSO et al., 2009).

A deficiência de vitamina D é extremamente prevalente em todas as idades, raças, regiões geográficas e camada socioeconômica, e tem sido relatada com grande frequência, mesmo em regiões ensolaradas. Estudos de prevalência de hipovitaminose D na Arábia Saudita, Austrália, Turquia, Emirados Árabes e Índia mostraram que 30 a

50% de crianças e adultos tinham níveis da 25-OHD abaixo de 20 ng/ml (SEDRANI, 1984; MCCRATH, 2001). Em Recife, um estudo avaliando 627 mulheres na pós-menopausa de demanda espontânea, do Centro de Osteoporose de PE, mostrou uma prevalência de deficiência de vitamina D de 8% para valor de vitamina D (25-OHD) abaixo de 15 ng/ml e de 43% considerando valor abaixo de 25 ng/ml (BANDEIRA et al., 2003)

Atualmente, a hipovitaminose D tem sido considerada um problema de saúde pública no mundo todo. Os fatores de risco para hipovitaminose D são a falta de exposição aos raios ultravioleta solares, latitude elevada (acima da latitude 35 praticamente não há formação de VD), altitude, inverno rigoroso, variação sazonal, trabalho em ambientes fechados, uso de filtro solar (protetores com fator 8 bloqueiam 95% dos fótons de UV), hiperpigmentação da pele, vestimentas pesadas, poluição ambiental, baixo consumo da vitamina (o Brasil carece de uma política de enriquecimento e fortificação de alimentos com VD), doenças e/ou condições cirúrgicas do trato gastrointestinal e a idade avançada (RUSSO et al., 2009).

A deficiência de vitamina D pode ocorrer quando a ingestão de vitamina D é inadequada ou quando existe baixa exposição solar. Outras causas podem levar à deficiência de vitamina D, incluindo doença renal crônica, pele escura, idade avançada, síndrome de má-absorção, drogas (fenobarbital, glicocorticoide, medicações para o tratamento de AIDS/HIV), doença hepática, obesidade e cirurgia bariátrica (GRIZ, 2013).

Com o avanço da idade, a capacidade da pele em sintetizar colecalciferol a partir de 7-deidrocolesterol diminui. Além disso, alguns fatores estão associados especificamente à hipovitaminose D nesta população, tais como, pouca exposição ao sol, uso de roupas que cobrem o corpo e uso de múltiplos medicamentos concomitantes (PREMAOR E FURLANETTO, 2006).

A doença renal crônica parece também ser um fator de risco para a deficiência de vitamina D, e aproximadamente 70 a 80% dos pacientes com doença renal crônica têm níveis séricos baixos de vitamina D (GONZALES et al., 2004). Com a diminuição da taxa de filtração glomerular e da massa renal, existe uma diminuição da liberação do substrato para a 1-alfa hidroxilase renal, a qual limita a capacidade do rim afetado em produzir a forma ativa de vitamina D. Além disso, à medida que a doença renal progride, ocorre uma retenção do fosfato, levando à diminuição da atividade da 1 alfa hidroxilase (DUSSO, 2005) e aumento dos níveis do fator de crescimento dos

fibroblastos (FGF-23), que, por sua vez, também reduz a atividade da 1-alfa hidroxilase (PERWAD et al., 2005). O FGF23 é um hormônio fosfatúrico e é regulado pelo nível de fosfato sérico e da 1,25-OH₂D. Níveis elevados do FGF 23 aumentam no estágio inicial da doença renal crônica, provavelmente em resposta à retenção de fosfato, em uma tentativa para aumentar a excreção do fosfato em conjunção com o aumento do PTH. Embora o PTH estimule a atividade da 1-alfa hidroxilase, o efeito supressivo do FGF23 sobre esta enzima parece predominar nesta situação clínica. Por isso, devido a essas anormalidades, não é surpresa que os níveis da 1,25-OH₂D estejam diminuídos. Adicionalmente à diminuição da produção da forma ativa da vitamina D, existe evidência de que ocorre uma resistência à ação da vitamina D, decorrente de uma redução da concentração do receptor da vitamina D, levando a uma diminuindo da ligação da 1,25-OH₂D com seu receptor (PATEL et al., 1995).

Estas alterações na fisiologia da vitamina D em pacientes com doença renal crônica contribuem para o desenvolvimento da hipocalcemia, levando um aumento dos níveis de PTH, o qual mobiliza o cálcio do esqueleto pela estimulação da reabsorção óssea mediada pelos osteoclastos. Este processo acarreta numa perda do osso lamelar e substituição por um osso estruturalmente mais fraco com diminuição da qualidade óssea e propensão a fraturas (GRIZ, 2013).

A deficiência de vitamina D resulta em anormalidades no metabolismo do cálcio, fósforo e ósseo. Especificamente, a deficiência de vitamina D causa diminuição da eficiência da absorção do cálcio e fósforo no intestino, resultando no aumento dos níveis de PTH. O hiperparatiroidismo mantém os níveis de cálcio sérico normal à custa da mobilização do cálcio do esqueleto e aumenta a perda de fósforo pelo rim. O aumento da atividade osteoclástica mediada pelo aumento dos níveis séricos do PTH causa diminuição da densidade mineral óssea, resultando em osteopenia, osteoporose e aumento do risco de fraturas. A fosfatúria causada pelo hiperparatiroidismo secundário resulta em níveis baixos de fósforo. Isto resulta em um inadequado produto cálcio-fósforo, causando defeito na mineralização do esqueleto. Crianças com pouca mineralização óssea em seu esqueleto são acometidas de deformidades esqueléticas classicamente conhecidas como raquitismo. Nos adultos, as placas epifisárias são fechadas, e existe suficiente mineral no esqueleto para prevenir deformidades esqueléticas. Por outro lado, a osteomalácia causa diminuição da densidade mineral óssea e está associada a dor óssea e muscular, fraqueza muscular e propensão a queda e aumento do risco de fraturas (PLOTNIKOFF, 2003).

2.1.3 Mecanismo de ação

Acredita-se que a 1,25 (OH₂D) atue nas células-alvo de uma maneira similar aos hormônios esteroides e é mediado através de sua ligação com o receptor nuclear específico de vitamina D (VDR). O VDR é um membro da superfamília dos receptores hormonais nucleares incluindo os receptores para os hormônios esteroides, tireoidianos e ácido retinóico. O VDR funciona como um heterodímero geralmente com o receptor do ácido retinóico para a regulação dos genes-alvo da vitamina D. Direta ou indiretamente, a 1,25 (OH₂D) controla mais de 200 genes, incluindo genes responsáveis pela regulação celular, proliferação, diferenciação e apoptose (HOLICK, 2006; NAGPAL, 2005).

A 1,25 (OH₂D) estimula a absorção do cálcio e fósforo, mobilizando-os para estimular a reabsorção óssea (DELUCA, 1988). Sem vitamina D, somente 10 a 15 % do cálcio da dieta e em torno de 60% do fósforo são absorvidos. Níveis suficientes de vitamina D aumentam a absorção do cálcio e fósforo em 30-40% e 80%, respectivamente. Quando os níveis de cálcio ionizado no plasma declinam, o PTH é secretado pelas paratireoides e estimulam a produção de 1,25 (OH₂D) a nível renal. A deficiência de vitamina D resultará em inadequada síntese de 25 (OHD) e 1,25 (OH₂D), inadequada homeostasia do cálcio e uma constante elevação dos níveis de PTH, levando a um quadro de hiperparatireoidismo secundário, com aumento da remodelação óssea e perda da massa óssea (GRIZ, 2013).

A 1,25 (OH₂D) interage com seus receptores nos osteoblastos para estimular a expressão do ligante do fator ativador do receptor nuclear kB (RANK ligand). E este, por sua vez, interage com seu receptor na superfície dos osteoclastos (RANK) para induzir os mastócitos imaturos em osteoclastos maduros, os quais dissolvem a matriz e mobilizam o cálcio e outros minerais a partir do esqueleto. No rim, a 1,25 (OH₂D), estimula a reabsorção do cálcio proveniente do filtrado glomerular (DUSSO, 2005; HOLICK, 2007).

2.2 Diabetes mellitus

O diabetes mellitus é definido como uma desordem metabólica de múltiplas etiologias e que se caracteriza por um estado de hiperglicemia crônica, decorrente da anormalidade na secreção e/ou ação da insulina, com consequentes distúrbios no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas (WILD et al., 2004).

A prevalência mundial desta doença, para todas as faixas etárias, foi estimada em 2,8% no ano 2000, com projeções de atingir 4,4% em 2030, e o número total de pessoas portadoras de DM que era de 171 milhões em 2000 pode alcançar 366 milhões em 2030 (KING et al., 1998). Outros autores avançam na estimativa do incremento no número de indivíduos diabéticos para o ano de 2030, projetando que 90% dos indivíduos serão acometidos pelo diabetes mellitus tipo 2 (WILD et al., 2004). O fator demográfico mais importante que influencia a prevalência do DM no mundo parece ser o aumento na proporção de pessoas com mais de 65 anos de idade, sobretudo nos países desenvolvidos, cuja população urbana é projetada para dobrar entre 2000 e 2030. Nos países em desenvolvimento o crescimento populacional é observado em todas as faixas etárias com predominância para grupos etários mais jovens (KING et al., 1998).

A Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD), seguindo orientações da OMS e ADA, propõe a classificação do DM baseada na sua etiologia e não pela forma de tratamento. Dessa forma, o DM é classificado em DM tipo 1 (DMT1), DM tipo 2 (DMT2), outros tipos específicos de DM e diabetes mellitus gestacional (DMG); existindo ainda a glicemia de jejum alterada e a tolerância à glicose diminuída, as quais são consideradas fatores de risco para o desenvolvimento de DM e doenças cardiovasculares (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2009).

Os tipos de DM mais comuns são o DMT1 e o DMT2, sendo ambos, doenças crônicas graves decorrentes de alterações no funcionamento de células beta do pâncreas com subsequentes alterações do metabolismo de carboidratos e lipídios (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009). O DMT1 decorre primariamente da destruição das células betas resultando, quase sempre, em cetoacidose com grandes flutuações da glicemia, acomete geralmente indivíduos magros e apresenta expressiva deterioração clínica quando o tratamento com insulina não é iniciado precocemente (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2006). Esse tipo de DM ocorre em cerca de 5% a 10% dos diabéticos e inclui casos decorrentes de doença autoimune e aqueles nos quais a causa da destruição das células beta não é conhecida (SOCIEDADE

BRASILEIRA DE DIABETES, 2006). A forma rapidamente progressiva é comumente observada em crianças e adolescentes entre 10 a 14 anos, e a forma lentamente progressiva geralmente aparece em adultos (*Latent Autoimmune Diabetes in Adults – LADA*), sendo esta última erroneamente classificada como DM2 pelo seu aparecimento tardio (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2006; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2006).

O DM2 resulta, em geral, de graus variáveis de resistência à insulina e de deficiência relativa de secreção de insulina, em que a resposta da célula ao estímulo da glicose é subótimo, não ocorrendo a primeira etapa de secreção da insulina após estimulação pela glicose (BAYNES; DOMINICZAK, 2000). O tratamento do DM2 visa manter o controle glicêmico adequado, seja com dieta hipocalórica, prática de exercícios físicos ou uso de medicações como sensibilizadores da ação de insulina, anti-hiperglicemiantes, secretagogos, drogas anti-obesidade e/ou insulina, as quais podem ser utilizadas isoladamente ou em associações (ARAUJO et al., 2000).

A hiperglicemia é a principal característica do DM. Em condições fisiológicas a regulação da glicemia é mantida através de um delicado balanço entre a secreção de insulina e a sensibilidade à insulina. Assim, um sinal inicial de intolerância à glicose e/ou uma diminuição na sensibilidade da insulina nos tecidos periféricos resulta no aumento compensatório da secreção da insulina para a manutenção da normoglicemia (TFAYLI; ARSLANIAN, 2009). Por outro lado, em alguns indivíduos, a relação hiperbólica que governa esse balanço está prejudicada e tem reflexos diretos nas células beta pancreáticas, as quais não respondem às elevadas concentrações de insulina com uma diminuição da secreção desse hormônio, aumentando assim a resistência insulínica (TFAYLI; ARSLANIAN, 2009).

2.2.1 Vitamina D e diabetes mellitus

Os mecanismos envolvidos na patogenia do DM podem ser precipitados pela presença de certos fatores como a predisposição genética, a obesidade, o sedentarismo, a elevação de ácidos graxos livres e citocinas pró-inflamatórias, que interferem na reserva funcional das células β , e a sensibilidade tecidual à insulina, em proporções diferentes. Estudos têm atribuído um papel da vitamina D na regulação funcional do pâncreas endócrino, particularmente nas células beta (TAKIISHI et al., 2010).

A identificação de receptores da $1,25\text{ OH}_2\text{D}_2$ e da expressão da $1-\alpha$ hidroxilase nas células beta pancreáticas, sugerem a associação da vitamina D na patogênese do

diabetes (BLAND, 2004). Tem se demonstrado, em modelos animais, que a secreção de insulina pancreática é inibida pela deficiência de vitamina D, e em seres humanos, a deficiência de vitamina D foi relacionada com intolerância a glicose e DMT2 (CHIU et al., 2004). Baixos níveis de vitamina D podem levar a uma deficiência na secreção de insulina induzindo intolerância à glicose. Por outro lado, alguns autores sugerem que a reposição ou suplementação com vitamina D pode reverter esse quadro, havendo relatos de que a reposição das reservas de vitamina D em pacientes com deficiência dessa molécula melhora a intolerância à glicose (GRIZ, 2013).

A relação da vitamina D com o funcionamento das células beta se dá de várias formas. A vitamina D em sua forma ativa (1,25OH₂D), penetra nas células beta pancreáticas e interage com o complexo receptor da vitamina D – receptor do ácido retinóico (VDR-RXR), o qual se liga aos elementos responsivos da vitamina D (VDRE), encontrado nos genes promotores da insulina humana, com a finalidade aumentar a ativação da transcrição do gene da insulina e aumentar a síntese insulínica. De outra forma, a ativação da vitamina D pode ocorrer dentro da célula beta através da 1- α hidroxilase, a qual é expressa nesta célula. Além disso, indiretamente, a vitamina D pode agir devido a sua regulação na concentração extracelular e do influxo de cálcio através da célula beta, uma vez que a secreção de insulina é um processo dependente deste mineral (SERGEEV et al., 1995) e, na regulação da síntese de calbidina, uma proteína ligadora de cálcio que modula a liberação de insulina estimulada pela despolarização via regulação do cálcio intracelular (SOOY et al., 1999).

A vitamina D pode aumentar também a sensibilidade da insulina por estimular a expressão gênica dos receptores deste hormônio (INS-R) nos tecidos periféricos alvos e, indiretamente, através do sistema renina-angiotensina-aldosterona. Acredita-se que a angiotensina II contribui para o aumento da resistência insulínica por inibir a ação da insulina no tecido vascular e músculo esquelético, levando a uma diminuição da captação de glicose (SOWERS, 2004). A vitamina D, portanto, parece ter uma regulação endócrina negativa no sistema renina-angiotensina-aldosterona, proporcionando outro mecanismo, ligando a vitamina D a uma diminuição do risco de DMT2 (WEI et al., 2008)

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar a influência da suplementação com vitamina D no metabolismo de ratos diabéticos.

3.2 Objetivo específico

- Avaliar o efeito da suplementação com vitamina D nos parâmetros bioquímicos relacionados ao diabetes mellitus, tais como, glicemia, perfil lipídico (triglicerídeos, colesterol total e HDL-colesterol), albumina, proteínas totais, cálcio e insulina.

4 METODOLOGIA

4.1 Aspectos Éticos

Todos os procedimentos relacionados ao uso de animais foram realizados segundo as normas preconizadas no “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (Institute of Laboratory Animals Resources, National Academy of Science, Washington, D.C., 1996), pelos princípios éticos estabelecidos pela Experimentação Animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA e pela legislação nacional para vivissecção animal em vigor (Lei 11.794, de 08.10.2008 e Lei 9.605, de 12.02.98).

O projeto foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal- CEUA da Universidade Federal do estado do Rio de Janeiro – UNIRIO (parecer de número 001/ 2014 – ANEXO 1).

4.2 Desenho experimental

O experimento foi realizado no Biotério do Instituto Biomédico da UNIRIO. Foram utilizados 32 *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar, machos, recém-desmamados (21 dias de idade – Figura 3) provenientes do Centro de Criação de animais de laboratório (CECAL) / Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Durante o experimento os animais foram mantidos em caixas plásticas de polipropileno (5 animais por caixa- Figura 4), em sala climatizada com temperatura de $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ e ciclo claro/escuro de 12 horas. O peso corporal e o consumo de ração foram monitorados duas vezes por semana, a água e a ração padrão para ratos (marca *Purina*) foram oferecidas *ad libitum*.

Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos (Quadro 1) (n=8): C = Controle não diabético + dieta padrão; DC = Diabéticos + dieta padrão; DS50 = Diabéticos + dieta padrão + suplementação com vitamina D (50% acima da recomendação diária); DS100 = Diabéticos + dieta padrão + suplementação com vitamina D (100% acima da recomendação diária) (DS100). Após período de aclimação dos animais (3 dias), o diabetes experimental foi induzido por uso de estreptozotocina, sendo administrada vitamina D por gavagem aos animais pertencentes aos grupos que receberam suplementação. O experimento teve duração de 20 dias. Ao término do período experimental a eutanásia foi realizada por punção cardíaca,

realizando-se a coleta de amostras de sangue venoso em tubos de polipropileno para as dosagens bioquímicas. O desenho experimental está na Figura 3.

GRUPO		TRATAMENTO
Controle (n=8)	C	Animais não diabéticos alimentados com ração padrão
Diabéticos controle (n=8)	DC	Animais diabéticos alimentados com ração padrão
Diabéticos + suplementação de vitamina D (n=8)	DS50	Animais diabéticos suplementados com dosagem diária de 10 microlitros de vitamina D (50% acima da recomendação diária).
Diabéticos + suplementação de vitamina D (n=8)	DS100	Animais diabéticos suplementados com dosagem diária de 13 microlitros de vitamina D (100% acima da recomendação diária).

Tabela 1. Distribuição e descrição dos grupos experimentais do estudo.

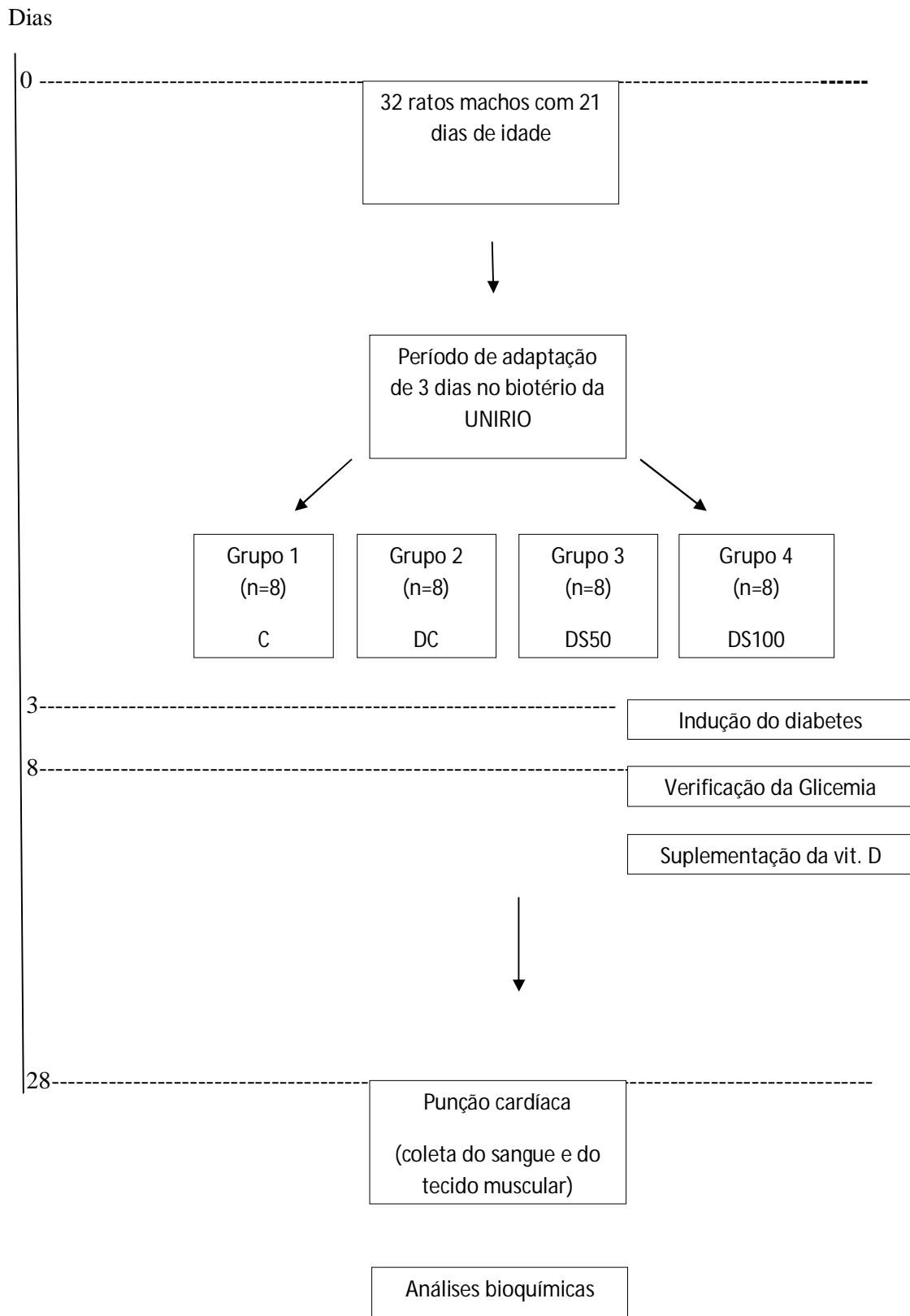


Figura 3: Desenho experimental do estudo.

4.3 Protocolo de indução do diabetes experimental

Após período de adaptação dos animais no biotério (3 dias), a indução do DM foi realizada por meio da administração intraperitoneal, em dose única, da droga estreptozotocina (STZ), na dosagem de 60 mg/Kg de peso do animal (*Streptozotocin – marca Sigma Life Science, USA, Lote SLBH0076V, Código: 1001651091*), dissolvida em tampão citrato 10 mM e pH 4,5 (LERCO et al., 2003; MACHADO et al., 2000). Após jejum alimentar de 12 horas com acesso livre à água, procedeu-se a administração da droga. Dada a similaridade entre as moléculas de glicose e STZ e a sua competição pelo transportador de glicose tipo 2 (GLUT2), esperou-se 30 minutos após a indução para que os animais tivessem livre acesso à ração, de forma a evitar a internalização da glicose ao invés da droga diabetogênica (SZKULDESKI, 2001). No quinto dia após indução, a confirmação do DM foi realizada por meio da determinação da glicemia de jejum utilizando tiras reagentes accue chek (*Contour TS, sistema para monitoramento de glicose sanguínea, Bayer HealthCare LLC, EUA, Lote: DW4DM3E52B, Validade 04/2016, Registro na ANVISA do Medidor: 80384380012; Lancetador: 80384380013; Lancetas: 8038480010; Tiras de teste: 80384380008*). Foram considerados diabéticos somente animais que apresentaram glicemia maior ou igual a 250 mg/dL (LERCO et al., 2003). E, ao longo do período experimental, a cada 7 dias novas avaliações da glicemia foram realizadas para acompanhamento da glicemia.. Os animais do grupo controle não diabéticos(C) foram submetidos ao mesmo procedimento de indução, porém, foi administrada somente solução salina (soro fisiológico).

4.4 Suplementação de vitamina D

A vitamina D utilizada na suplementação foi do tipo colecalciferol – vitamina D₃ (Addera D₃ Gotas – Sanofi Aventis - Registro no Ministério da Saúde: 1.7817.0028.001-0). A administração da vitamina D ou solução fisiológica foi realizada durante os 20 dias de experimento, com o auxílio de uma pipeta apropriada, que garantiu a ingestão. Para o grupo experimental DS50 a vitamina D foi administrada em volume de 10 microlitros (ou seja, 50% acima da recomendação diária da vitamina por kg/peso), e para o grupo DS100 em volume de 13 microlitros (100% acima da recomendação diária da vitamina por kg/peso). Os grupos controle (C) e diabético controle (DC) receberam solução fisiológica na mesma proporção utilizada para os grupos que ingeriram a vitamina D (10 microlitros).

4.5 Eutanásia e obtenção do soro

Após jejum de 12 horas, os animais foram sacrificados por punção cardíaca, com uso de anestesia intravenosa (Tiopental sódico – Thiopentax – Cristália – Registro no Ministério da Saúde: 1. 0298.0094, Lote: 13118164, Validade: 11/2015), em seguida foi retirado o sangue total do coração e coletado em tubos apropriados. Imediatamente após a coleta o sangue foi centrifugado a 3000 RPM, o soro retirado e armazenado à temperatura de -20°C para as posteriores análises.

4.6 Análises bioquímicas

Todas as análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas do Departamento de Bioquímica, Localizado no Instituto Biomédico da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO.

4.6.1 Glicemia

Coletou-se sangue da cauda dos animais para a análise de glicemia com uso de glicosímetro portátil (sistema de monitoramento de glicose sanguínea), conforme instruções descritas no equipamento, (Contour TS, Bayer HealthCare LLC, EUA) para a confirmação do diabetes (t=8), semanalmente durante o experimento e no dia do sacrifício (t=28) . Nesta dosagem o sangue foi coletado após jejum de 12 horas.

A dosagem de glicose de jejum foi avaliada no soro dos animais, em duplicata, por método enzimático colorimétrico através de *Kits Labtest* LTDA, conforme as instruções descritas pelo fabricante (Ref.:133, Registro no Ministério da Saúde: 10009010236, Labtest Diagnóstica S.A., Minas Gerais, Brasil). O procedimento foi realizado em sistema automático, através de equipamento analisador automático capaz de medir com exatidão a absorvância entre 490 e 520 nm. (Autoanalisador *Chem Well*®, Katal, Intertec, São Paulo, Brasil).

A média da variação intra-ensaio da glicose no kit utilizado é de 0,98%%, e inter-ensaio de 1,89%.

4.6.2 Perfil lipídico

O perfil lipídico foi avaliado em duplicata, por meio da determinação dos triglicerídeos, colesterol total e HDL no soro dos animais. As dosagens foram realizadas através de *Kits Labtest*, por método enzimático colorimétrico conforme as instruções descritas pelo fabricante (Respectivamente, Ref.: 087, Registro no Ministério da Saúde:

10009010070; Ref.: 076, Registro no Ministério da Saúde: 10009010068; Ref.: 128, Registro no Ministério da Saúde: 10009010231, Labtest Diagnóstica S.A., Minas Gerais, Brasil). Os procedimentos foram realizados em sistema automático, através de equipamento analisador automático capaz de medir com exatidão a absorvância entre 490 e 520 nm. (Autoanalisador *Chem Well*®, Katal, Interteck, São Paulo, Brasil).

A média da variação biológica dos kits utilizados foram as seguintes: Triglicerídeos – intra-ensaio: 1,31%, inter-ensaio: 1,81%; Colesterol Total – intra-ensaio: 1,3%, inter-ensaio: 2,23%; HDL – intra-ensaio: 0,9%, inter-ensaio: 2,36%.

4.6.3 Insulina e 25(OH)D₃

As análises de insulina e 25- Hidroxivitamina D3 foram realizadas em duplicata no soro dos animais, por meio de *Kits* de imunoensaio ligado à enzima (ELISA), conforme instruções descritas pelo fabricante. Dados dos *kits*: Insulina para Ratos *Kit* ELISA - Código do produto: EZRMI-13K, Lote: 2517655, fabricante *Merck Millipore Corporation*, Darmstadt, Alemanha, distribuído no Brasil por Genese produtos diagnósticos LTDA, São Paulo ; Vitamina D3 - Código do produto: CEA915GE, Lote: L140927827, fabricante *USCN Life Science*, distribuído no Brasil por Genese produtos diagnósticos LTDA, São Paulo. As duas análises realizadas através de equipamento Autoanalisador (*Chem Well*®, Katal, Interteck, São Paulo, Brasil).

A média da variação biológica dos kits utilizados foram as seguintes: Insulina para ratos – intra-ensaio: 4,64%, inter-ensaio: 11,95%; 25- Hidroxivitamina D3 – intra-ensaio: <10%, inter-ensaio: <12%, exatidão de 83 a 102%.

4.6.4 Proteínas totais, Albumina e cálcio

As análises de Proteínas totais, albumina e cálcio foram realizadas em duplicada, no soro dos animais, por meio de *Kits Labtest* seguindo as instruções descritas pelo fabricante (respectivamente, Ref.: 99, Registro no Ministério da Saúde: 10009010080; Ref.: 19, Registro no Ministério da Saúde: 10009010025; Ref.: 90, Registro no Ministério da Saúde: 10009010067, *Labtest Diagnóstica S.A.*, Minas Gerais, Brasil).

Os procedimentos foram realizados em sistema automático, através de equipamento analisador automático capaz de medir com exatidão a absorvância entre 490 e 520 nm. (Autoanalisador *Chem Well*®, Katal, Interteck, São Paulo, Brasil).

A variação biológica média dos kits foram as seguintes: Proteínas totais - intra-ensaio: 0,62%, inter-ensaio: 0,96%; Albumina - intra-ensaio: 1,05%, inter-ensaio: 1,65%; Cálcio – intra-ensaio: 0,77%, inter-ensaio: 1,07%.

4.7 Tratamento estatístico

Os dados foram representados como média e erro padrão da média (EPM). Os resultados submetidos à análise de variância ANOVA, sendo utilizado o teste de Tukey para o confronto das médias. O *software* utilizado será o GraphPad 4.7 Composição corporal 5.0 ® (*for Windows*), considerando $p < 0,05$ como probabilidade mínima aceitável para diferença entre as médias.

4.8 Biossegurança

Durante a execução da metodologia proposta os pesquisadores envolvidos usaram luvas de procedimentos cirúrgicos e jalecos para sua proteção individual. Quando necessário usou-se ainda máscaras, e óculos de proteção.

As carcaças dos animais foram congeladas, e o descarte, tanto destes resíduos biológicos, como dos materiais perfuro-cortantes (seringas, agulhas e outros) foi realizados conforme procedimento padrão exigido pelo CEUA- UNIRIO. O material coletado por empresa de descarte especializada (2MC Transportes de resíduos, CNPJ: 07.941.147/0001-25 – Comprovante da coleta/ ANEXO 2).

5 RESULTADOS

5.1 Peso Corporal

O peso corporal (g) dos ratos dos grupos experimentais no início e final do experimento está ilustrado nas Figuras 4 e 5, respectivamente. Neste parâmetro, não houve diferença estatística entre os grupos experimentais nos tempos analisados (peso inicial: $p=0,4842$; peso final: $p=0,4337$). No entanto, como já era esperado, foi observada menor evolução no ganho de peso corporal dos animais diabéticos em relação ao grupo controle, porém, sem diferença estatística ($p>0,05$). Os valores de média e erro padrão da média (EPM) para os grupos no início e final do experimento estão descritos abaixo:

- Início do experimento: C = $138,91\pm5,73$; DC = $147,26\pm2,76$; DS50 = $139,61\pm3,37$; DS100 = $140,22\pm4,43$.

- Final do experimento: C = $269,64\pm8,83$; DC = $260,13\pm6,82$; DS50 = $242,73\pm13,40$; DS100 = $261,04\pm13,02$.

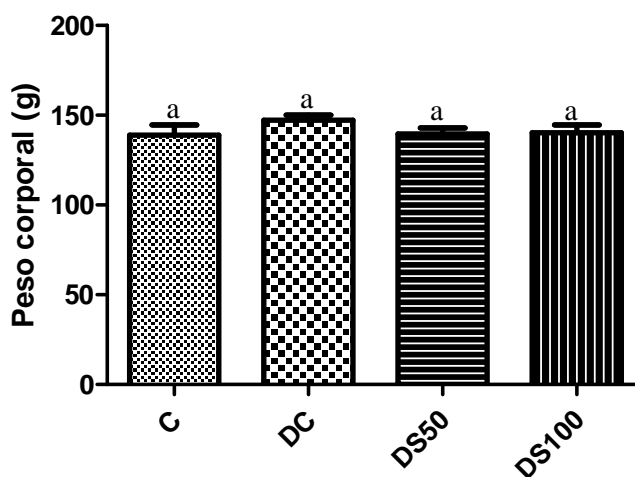


Figura 4. Peso corporal (g) dos ratos por grupo no início do experimento.

C = Controle não diabético + dieta padrão; DC = Diabéticos + dieta padrão; DS50 = Diabéticos + dieta padrão + suplementação com vitamina D (50% acima da recomendação diária); DS100 = Diabéticos + dieta padrão + suplementação com vitamina D (100% acima da recomendação diária). Colunas com letras iguais indicam que não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os grupos experimentais.

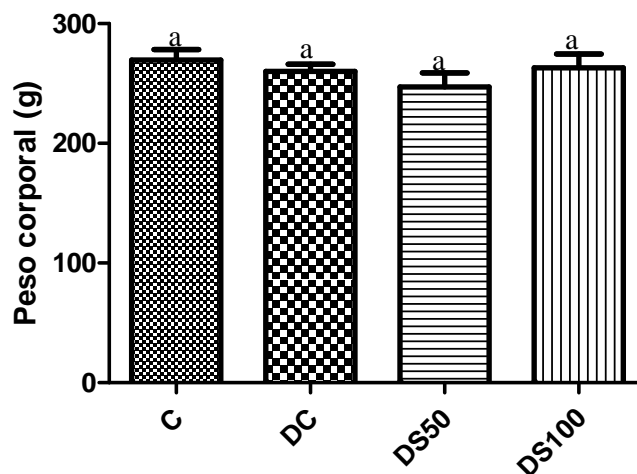


Figura 5. Peso corporal (g) dos ratos por grupo no final do experimento. C = Controle não diabético + dieta padrão; DC = Diabéticos + dieta padrão; DS50 = Diabéticos + dieta padrão + suplementação com vitamina D (50% acima da recomendação diária); DS100 = Diabéticos + dieta padrão + suplementação com vitamina D (100% acima da recomendação diária). Colunas com letras iguais indicam que não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os grupos experimentais.

5.2 Consumo alimentar

O consumo alimentar médio dos animais (g/24 h) está resumido na Figura 6. A média da ingestão alimentar diária dos animais do grupo C foi menor que a dos ratos diabéticos (DC, DS50 e DS100) ($p=0,0001$). Dentre os animais diabéticos, os animais do grupo DS50 consumiram a mesma quantidade de ração por dia quando comparados aos grupos DC e DS100; já os animais do grupo DS100 consumiram menos ração que os animais do grupo DC ($p=0,0001$). Os valores de média e erro padrão da média (EPM) do consumo alimentar dos grupos foram os seguintes: C = $20,02 \pm 1,17$; DC = $30,56 \pm 1,57$; DS50 = $27,57 \pm 0,81$; DS100 = $20,59 \pm 0,38$.

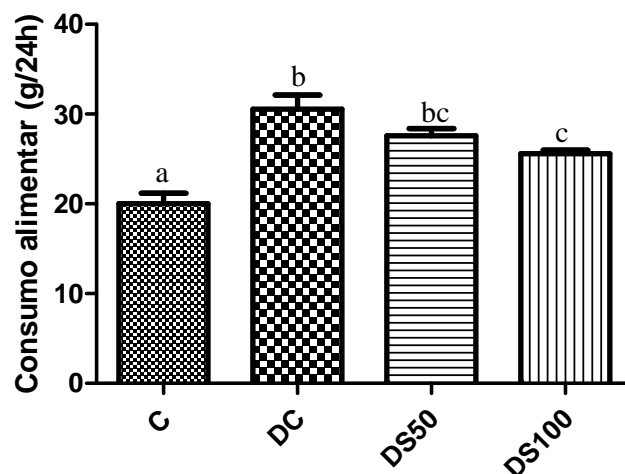


Figura 6. Consumo alimentar diário (g/24h) dos ratos por grupo no final do experimento.

C = Controle não diabético + dieta padrão; DC = Diabéticos + dieta padrão; DS50 = Diabéticos + dieta padrão + suplementação com vitamina D (50% acima da recomendação diária); DS100 = Diabéticos + dieta padrão + suplementação com vitamina D (100% acima da recomendação diária). Colunas com letras diferentes indicam que houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos experimentais.

5.3 Análises bioquímicas

5.3.1 Glicemia

A Figura 7 mostra os valores de glicemia de jejum nos grupos estudados. O grupo controle apresentou uma glicemia de jejum significativamente menor ($P < 0,05$) que os demais grupos experimentais, como já era esperado, o que mostra que a indução por STZ foi eficaz. A análise dos dados relativos à glicemia apresentados na figura 5 demonstram que o grupo experimental não diabético apresentou valor médio de glicemia de jejum dentro da faixa de normalidade. Já nos grupos diabéticos observou-se aumento significativo da mesma a níveis considerados patológicos. A suplementação de vitamina D alterou a glicemia dos animais tratados em comparação com o grupo diabético controle (DC), de forma inversamente proporcional, ou seja, observou-se que quanto maior foi a dosagem de suplementação de vitamina D, menor foi o valor da glicemia de jejum, porém, esse resultado não foi estatisticamente significativo. Adicionalmente, a administração de vitamina D no grupo que recebeu maior dosagem desta molécula (DS100), apresentou níveis de glicemia igual, estatisticamente, ao apresentado no grupo controle. Os valores de média e erro padrão da média (EPM) da

glicemia de jejum dos grupos foram os seguintes: C = $113,35 \pm 6,71$; DC = $410 \pm 42,24$; DS50 = $346,71 \pm 66,00$; DS100 = $240,53 \pm 56,57$.

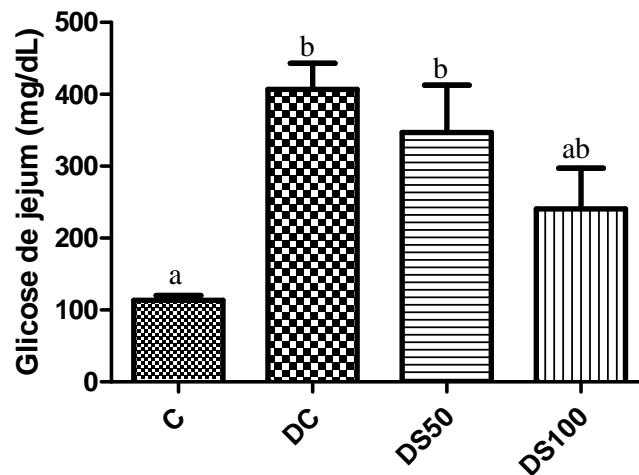


Figura 7. Níveis séricos de glicose de jejum dos ratos por grupo no final do experimento.

C = Controle não diabético + dieta padrão; DC = Diabéticos + dieta padrão; DS50 = Diabéticos + dieta padrão + suplementação com vitamina D (50% acima da recomendação diária); DS100 = Diabéticos + dieta padrão + suplementação com vitamina D (100% acima da recomendação diária). Colunas com letras diferentes indicam que houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos experimentais.

5.3.2 Perfil lipídico: Colesterol Total, HDL-colesterol e Triglicerídeos

Nas Figuras 8, 9 e 10 é possível observar os resultados do perfil lipídico entre os grupos estudados. Os níveis séricos de colesterol total não apresentaram diferença estatística entre nenhum dos grupos estudados ($p=0.8228$) (Figura 8). Os valores de média, desvio padrão (DP) e Erro Padrão da média (EPM) do colesterol dos grupos foram os seguintes: C= $34,50 \pm 6,48$; EPM=2,29/ DC= $36,38 \pm 8,20$; EPM=2,90/ DS50= $33,86 \pm 4,74$; EPM= 1,79/ DS100= $34,57 \pm 6,58$; EPM = 2,49.

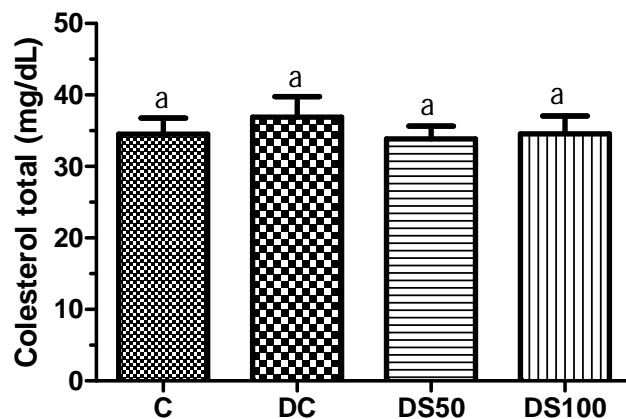


Figura 8. Níveis séricos de colesterol total dos ratos por grupo no final do experimento. C = Controle não diabético + dieta padrão; DC = Diabéticos + dieta padrão; DS50 = Diabéticos + dieta padrão + suplementação com vitamina D (50% acima da recomendação diária); DS100 = Diabéticos + dieta padrão + suplementação com vitamina D (100% acima da recomendação diária). Colunas com letras iguais indicam que não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os grupos experimentais.

A Figura 9 mostra os valores médios de HDL-colesterol encontrados. Apesar de não haver diferença estatística ($p=0,1832$) entre os grupos experimentais, é possível observar uma tendência à diminuição deste parâmetro no grupo DC, o que demonstra piora no perfil lipídico, situação característica da patogênese do diabetes. Observa-se ainda, que nos grupos DS50 e DS100 esses valores aumentam, mesmo que não estatisticamente, o que demonstra uma tendência à melhora do metabolismo lipídico nos grupos suplementados com a vitamina D quando comparados ao grupo diabético que não recebeu a vitamina. Destaca-se, que o aumento da dose da vitamina não aumentou os níveis de HDL-colesterol quando comparados ao grupo que recebeu menor dosagem. Os valores de média e erro padrão da média (EPM) do HDL-c dos grupos foram os seguintes: C = $18,85 \pm 3,11$; DC = $11,11 \pm 1,52$; DS50 = $17,43 \pm 2,38$; DS100 = $15,24 \pm 2,69$.

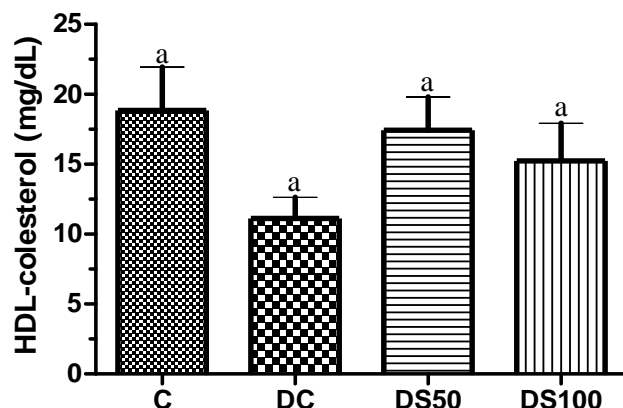


Figura 9. Níveis séricos de HDL-colesterol dos ratos por grupo no final do experimento.

C = Controle não diabético + dieta padrão; DC = Diabéticos + dieta padrão; DS50 = Diabéticos + dieta padrão + suplementação com vitamina D (50% acima da recomendação diária); DS100 = Diabéticos + dieta padrão + suplementação com vitamina D (100% acima da recomendação diária). Colunas com letras iguais indicam que não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os grupos experimentais.

A Figura 10 expressa graficamente os valores séricos de triglicerídeos encontrados nos grupos experimentais. Apesar de não haver diferença estatística ($p=0,4181$) entre os grupos, houve aumento no valor dos triglicerídeos no grupo DC em relação ao C, situação característica da patogênese do diabetes, confirmando as alterações no perfil lipídico causados pela doença. Embora também não significativa do ponto de vista estatístico, a suplementação de vitamina D sugeriu uma redução nos níveis de triglicerídeos nos animais dos grupos DS50 e DS100 quando comparados com os animais do grupo DC. O aumento da dose da vitamina não diminuiu os níveis de triglicerídeos em relação ao grupo que recebeu menor dosagem, ou seja, o aumento da dose de suplementação não foi proporcional à melhora do quadro lipídico. Os valores de média e erro padrão da média (EPM) dos triglicerídeos dos grupos foram os seguintes: C = $90,73 \pm 18,67$; DC = $107,51 \pm 12,74$; DS50 = $73,57 \pm 14,58$; DS100 = $83,90 \pm 6,78$.

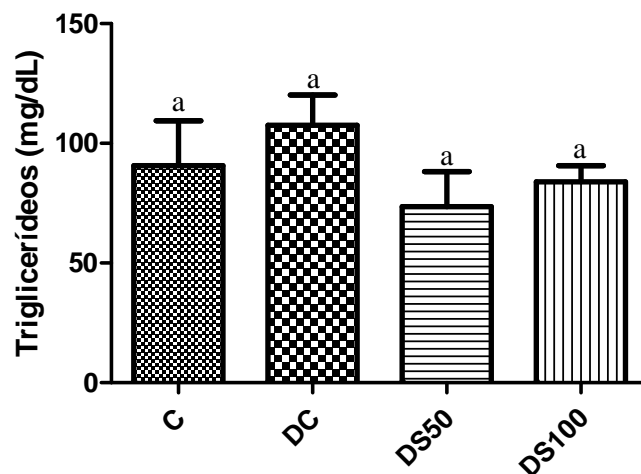


Figura 10. Níveis séricos de triglicerídeos dos ratos por grupo no final do experimento. C = Controle não diabético + dieta padrão; DC = Diabéticos + dieta padrão; DS50 = Diabéticos + dieta padrão + suplementação com vitamina D (50% acima da recomendação diária); DS100 = Diabéticos + dieta padrão + suplementação com vitamina D (100% acima da recomendação diária). Colunas com letras iguais indicam que não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os grupos experimentais.

5.3.3 Vitamina D (25OHD₃)

Os resultados mostram que não houve diferença significativa entre os grupos experimentais ($p=0,1798$) em relação aos níveis séricos de 25OHD₃ (C = 101,99±19,42; DC = 106,21±5,24; DS50 = 66,64±8,72; DS100 = 101,06±15,45).

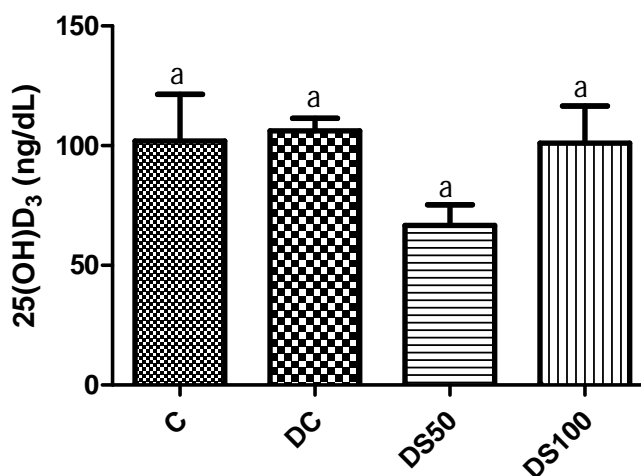


Figura 11. Níveis séricos de 25OHD₃ dos ratos por grupo no final do experimento. C = Controle não diabético + dieta padrão; DC = Diabéticos + dieta padrão; DS50 = Diabéticos + dieta padrão + suplementação com vitamina D (50% acima da recomendação diária); DS100 = Diabéticos + dieta padrão + suplementação com vitamina D (100% acima da recomendação diária). Colunas com letras iguais indicam que não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os grupos experimentais.

5.3.4 Insulina

A Figura 12 expressa os valores de insulina encontrados nos diferentes grupos. O grupo controle apresentou uma concentração de insulina significativamente maior ($p=0,0096$) que o grupo DC, como já era esperado, o que mostra que a indução por STZ foi eficaz, confirmando seu efeito diabtogênico através da diminuição da produção de insulina e, conseqüentemente diminuição da concentração sanguínea deste hormônio. Além disso, os animais do grupo DS50 apresentaram uma tendência ao aumento na concentração de insulina, sendo estatisticamente iguais aos animais tanto do grupo DC como do grupo C, sugerindo que a vitamina induziu um aumento na secreção de insulina ($p>0,05$). Os valores de média e erro padrão da média (EPM) dos grupos foram os seguintes: C = $0,81\pm 0,15$; DC = $0,35\pm 0,04$; DS50 = $0,42\pm 0,14$; DS100 = $0,33\pm 0,04$.

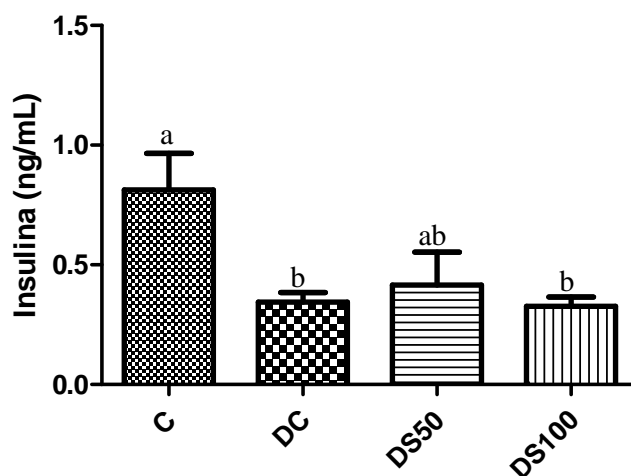


Figura 12. Níveis séricos de insulina dos ratos por grupo no final do experimento. C = Controle não diabético + dieta padrão; DC = Diabéticos + dieta padrão; DS50 = Diabéticos + dieta padrão + suplementação com vitamina D (50% acima da recomendação diária); DS100 = Diabéticos + dieta padrão + suplementação com vitamina D (100% acima da recomendação diária). Colunas com letras diferentes indicam que houve diferença significativa ($p<0,05$) entre os grupos experimentais.

5.3.5 Proteínas totais

Em relação às proteínas totais não houve diferença estatística ($p>0,05$) entre os grupos (Figura 13), sugerindo que a suplementação não teve influência neste fator bioquímico em animais diabéticos. No entanto, houve uma tendência, embora não significativa do ponto de vista estatístico, ao aumento das proteínas totais nos grupos suplementados com vitamina D, de modo que quanto maior a dosagem desta vitamina,

maior a concentração de proteínas totais. Os valores de média e erro padrão da média (EPM) das proteínas totais dos grupos foram os seguintes: C = $5,46 \pm 0,17$; DC = $4,85 \pm 0,09$; DS50 = $5,17 \pm 0,27$; DS100 = $5,63 \pm 0,27$.

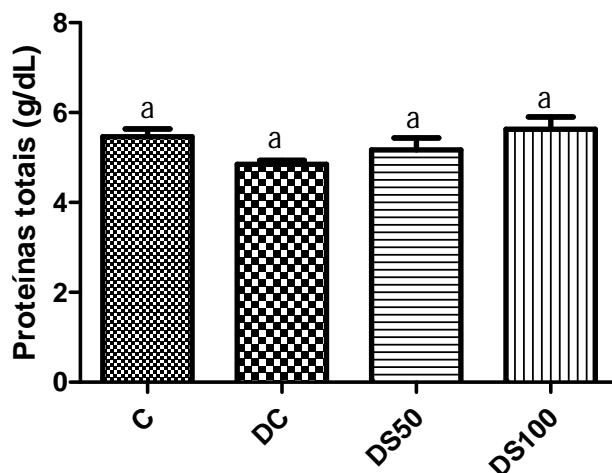


Figura 13. Níveis séricos de proteínas totais dos ratos por grupo no final do experimento.

C = Controle não diabético + dieta padrão; DC = Diabéticos + dieta padrão; DS50 = Diabéticos + dieta padrão + suplementação com vitamina D (50% acima da recomendação diária); DS100 = Diabéticos + dieta padrão + suplementação com vitamina D (100% acima da recomendação diária). Colunas com letras iguais indicam que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos experimentais.

5.3.6 Albumina

A Figura 14 mostra que houve diferença estatística ($p = 0,0235$) na concentração de albumina sérica entre os grupos estudados. Os valores de albumina diminuíram significativamente no grupo DC quando comparados ao grupo C. A albumina dosada apresentou-se maior nos grupos suplementados quando comparados ao grupo DC, e estes valores, foram proporcionais ao aumento da dose de suplementação, de forma que o grupo DS100 e DS50 obtiveram valores semelhantes estatisticamente ao grupo C. Os valores de média e erro padrão da média (EPM) da albumina dos grupos foram os seguintes: C = $3,19 \pm 0,08$; DC = $2,84 \pm 0,03$; DS50 = $3,04 \pm 0,12$; DS100 = $3,10 \pm 0,08$.

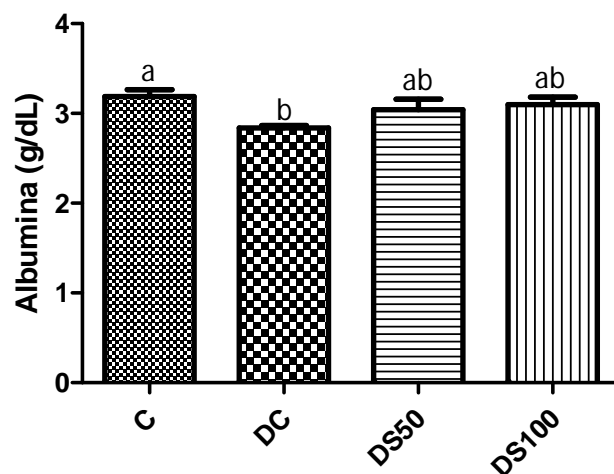


Figura 14. Níveis séricos de albumina dos ratos por grupo no final do experimento. C = Controle não diabético + dieta padrão; DC = Diabéticos + dieta padrão; DS50 = Diabéticos + dieta padrão + suplementação com vitamina D (50% acima da recomendação diária); DS100 = Diabéticos + dieta padrão + suplementação com vitamina D (100% acima da recomendação diária). Colunas com letras diferentes indicam que houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos experimentais.

5.3.7 Cálcio

A Figura 15 mostra que não houve diferença estatística entre os grupos estudados nos valores médios de cálcio. Os valores de média, desvio padrão (DP) e Erro Padrão da média (EPM) do Cálcio dos grupos foram os seguintes: C= $13,50 \pm 2,42$; EPM=0,86; DC= $13,46 \pm 1,62$; EPM=0,57/ DS50= $13,75 \pm 1,08$; EPM= 0,44/ DS100= $14,70 \pm 3,06$; EPM = 1,16.

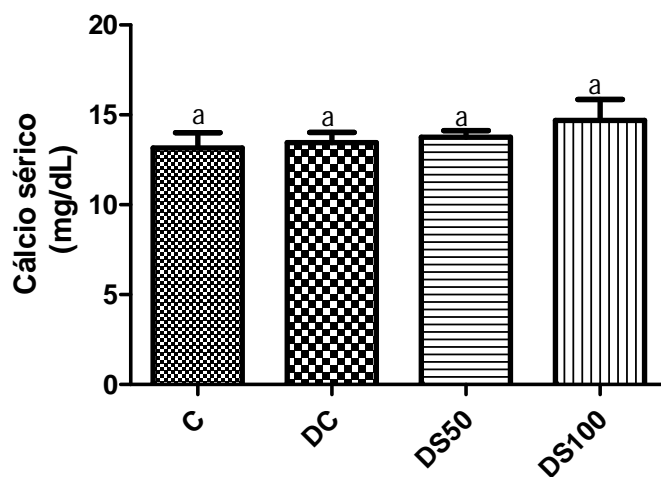


Figura 15. Níveis séricos de cálcio dos ratos por grupo no final do experimento.

C = Controle não diabético + dieta padrão; DC = Diabéticos + dieta padrão; DS50 = Diabéticos + dieta padrão + suplementação com vitamina D (50% acima da recomendação diária); DS100 = Diabéticos + dieta padrão + suplementação com vitamina D (100% acima da recomendação diária). Colunas com letras iguais indicam que não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os grupos experimentais.

6 DISCUSSÃO

Por apresentarem semelhanças clínicas e laboratoriais com o diabetes mellitus em seres humano, estudos que utilizam modelos de diabetes experimental em ratos vêm sendo bastante utilizados na reprodução da sintomatologia desta doença (SPADELLA, 1989; SCHELLINI, 1992, LERCO et al., 2003).

Considera-se a hiperglicemia induzida por estreptozotocina (STZ) em roedores um bom modelo de triagem inicial, utilizado amplamente e extremamente útil na reprodução do quadro metabólico do diabetes. A STZ, N-[methylnitrocarbonyl]-D-glucosamine, é isolada de *Streptomyces achromogenes* e apresenta atividade antibiótica e antineoplásica, além de ser um potente agente metilador de ácido desoxirribonucléico (DNA), que age como doador de óxido nítrico nas células beta pancreáticas, as quais são mais sensíveis aos danos causados pelo óxido nítrico (LUKIC et al., 1998; REES, 2005).

Segundo Schnedl et al. (1994), a toxicidade dirigida para as células beta deve-se à similaridade entre a molécula de STZ e a molécula de glicose, o que faz com que a STZ seja internalizada via GLUT2 presentes em hepatócitos, células epiteliais intestinais e renais, e astrócitos de alguns núcleos cerebrais. Por outro lado, o tratamento com insulina diminui a expressão de GLUT2 e previne a ação diabetogênica da STZ.

O mecanismo de ação da STZ já é bem descrito na literatura. O quadro de DM é determinado pela destruição irreversível das células beta pancreáticas, resultando em diminuição da secreção de insulina e causando perda de peso, visto que sua concentração sérica é proporcional à adiposidade (SCHNEDL et al., 1994). Trabalhos têm demonstrado que a utilização de doses entre 40mg/kg e 60mg/Kg, via endovenosa, para indução de DM nos animais é suficiente para gerar quadro de deficiência de insulina e alterações metabólicas comuns desta patologia (YAMAZAKI et al., 2005).

Neste estudo, a confirmação do diabetes mediante presença de hiperglicemia, foi realizada no quinto dia após indução, considerando como ponto de corte glicemia capilar de jejum superior a 250 mg/dL, de acordo com Lerco et al. (2003). A hiperglicemia crônica, característica encontrada nos diferentes grupos diabéticos deste estudo, foi resultado de um processo patogênico severo em decorrência da deficiência na produção da insulina, o que provocou anormalidades no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2009).

Em relação ao peso corporal dos animais que participaram deste estudo, foi observada menor evolução no ganho de peso dos animais diabéticos, o que ratifica os

achados encontrados por outros autores que trabalharam com diabetes experimental (OLIVEIRA; ARAÚJO, 1986; LERCO et al, 2003), os quais afirmam que quanto maior o tempo de instalação do DM maior é a debilidade e, conseqüentemente, o decaimento no ganho de peso corporal.

A avaliação da evolução ponderal nos animais controle normais evidenciou ganho médio de peso corporal de 111,42g entre o início e o término do período experimental, 18% a mais que no grupo diabético sem suplementação, onde esse ganho foi de 90,67g. Além disso, os animais não diabéticos apresentaram consumo alimentar, ingestão hídrica e diurese compatível com animais sadios, segundo parâmetros descritos por alguns autores para ratos machos, adultos e faixa de peso corporal semelhantes (CARVALHO et al., 2009).

Os roedores dos diferentes grupos diabéticos deste experimento, inclusive os que receberam suplementação, apresentaram, visivelmente, sintomas característicos de DM descompensado, tais como poliúria, polidipsia e polifagia, condizentes com sintomas encontrados em outros estudos que utilizaram o modelo de diabetes induzido por agentes químicos em ratos (CARVALHO et al., 2003; SPADELLA et al., 2005). Tais sintomas são amplamente conhecidos no DM e relacionados ao estado de hiperglicemia, o principal fator responsável pelo desenvolvimento da poliúria, polifagia e polidipsia. A poliúria instala-se quando a quantidade de glicose filtrada pelos rins ultrapassa a capacidade de reabsorção das células tubulares e a glicose aparece na urina. Pelo efeito osmótico da glicose presente no fluido tubular ocorre diurese osmótica (HEDGE et al., 1987). A associação entre a perda de água e eletrólitos e a ausência de ingestão hídrica adequada pode gerar desidratação e, por conseguinte, insuficiência circulatória periférica (PITANGA, 2004).

De acordo com Lerco et al (2003), a polidipsia presente nos animais diabéticos ocorre devido à hiperosmolaridade sangüínea, em consequência de altos níveis de glicose circulante, que faz a água passar do meio intracelular para o extracelular a fim de manter o equilíbrio osmótico; e a desidratação intracelular é percebida pelos osmorreceptores cerebrais, gerando sede intensa.

Geralmente, um rato adulto sadio, com cerca de 300g, consome aproximadamente cinco gramas de ração e 10 mL de água para cada 100g de peso corpóreo por dia, sendo tal consumo influenciado pelo estado de saúde, vida sexual do animal, temperatura e umidade do ambiente e hora do dia, uma vez que os ratos

possuem hábitos noturnos e alimentam-se quase sempre à noite (HARKENESS; WAGNER, 1993).

Segundo o que foi observado no dia a dia do laboratório, é relevante destacar que o tratamento com vitamina D promoveu uma redução na ingestão hídrica e diurese dos animais destes grupos, em relação ao grupo controle diabético que não recebeu a vitamina, talvez isso tenha ocorrido pelos menores níveis de glicemia observados nos grupos suplementados quando comparados com o grupo controle diabético, diminuindo por consequência a sede e poliúria nestes animais.

Não foram observadas alterações significativas no consumo alimentar entre os diferentes grupos de animais diabéticos, contudo todos os grupos diabéticos tiveram o consumo alimentar elevado quando comparado com o controle normal. A ausência de insulina para promover a captação de glicose pelas células dependentes de sua ação contribuiu para a manutenção de níveis elevados de glicemia e de estado de catabolismo aumentado, o que resultou na manutenção de polifagia, sintoma do DM descompensado. Embora não estatisticamente, os grupos que receberam vitamina D apresentaram consumo menor de ração, o que se deve, provavelmente, também à diminuição da glicemia nestes grupos, corroborando com o fato de que quanto menores os níveis de glicemia, menos severa será a polifagia no DM (LERCO et al., 2003).

Ao final do período experimental, como já esperado, a glicemia dos animais diabéticos foi superior a dos animais não diabéticos ($p=0,0004$), visto que a principal característica do DM é a hiperglicemia decorrente da falha na produção ou no efeito da insulina, o que foi provocado e confirmado pela ação da STZ nos grupos diabéticos deste estudo. Nos grupos que receberam a vitamina D houve uma tendência relevante à redução da glicemia, destacando-se o fato de que no grupo DS100, ou seja, o que recebeu maior dosagem da vitamina D, os níveis glicêmicos se igualaram estatisticamente ao grupo não diabético, achado importante e que pode ser um indicativo da ação da vitamina D como “agente hipoglicemiante”, sendo esta vitamina uma alternativa a ser considerada no manejo terapêutico do diabetes. Os resultados aqui encontrados corroboram com uma metanálise que incluiu oito estudos com o objetivo de avaliar o efeito da vitamina D na glicemia. A duração variava de sete meses a dois anos, e as doses de vitamina D de 400 a 5714 UI/ dia.

Em cinco ensaios em que a glicemia era normal na linha de base, não se notou efeito sobre a glicemia ou a incidência de diabetes. Já a análise no subgrupo cuja glicemia basal era alterada a suplementação de vitamina D (700 UI/dia) melhorou o

controle posterior da glicemia, mostrando uma diminuição na tendência à piora da glicemia que costuma ocorrer nesses grupos (PITTÁS, 2010). Borissova e cols. observaram que o aumento na 25(OH)D sérica de 10 para 30 ng/mL pode melhorar a sensibilidade à insulina em 60%, diminuindo consequentemente os níveis de glicose sanguínea.

Uma meta-análise (ZIPITIS, 2008) que incluiu 5 estudos observacionais, que relacionaram a suplementação com vitamina D na infância com o risco de desenvolvimento de DM1, sugere que este risco é reduzido significativamente quando as crianças recebem suplementação. Os resultados destes estudos caso-controle indicam uma redução do risco de até 29%.

As dislipidemias são complicações típicas encontradas no DM quimicamente induzido, representando um sério risco para doenças cardiovasculares (YADAV; MOORTHY; BAQUER et al., 2005). As anormalidades lipídicas mais comuns no DM são a hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia (KHAN et al., 1995; MITRA et al., 1995). A dislipidemia típica é caracterizada por hipertrigliceridemia, HDL baixo e LDL pequena e densa, entretanto, portadores de DM1 apresentam-na em menor frequência que os portadores de DM2 (FEITOSA et al., 2009). A hipertrigliceridemia também está associada a consequências metabólicas de hipercoagulabilidade, hiperinsulinemia, resistência à insulina e intolerância à glicose. É sabido que no DM induzido por STZ, o aumento dos níveis séricos de glicose é acompanhado pela elevação do colesterol e triglicerídeos plasmáticos, uma vez que a hiperglicemia é o maior determinante na alteração dos níveis totais de VLDL-c e triglicerídeos (LEHTO et al., 1997).

No presente estudo, embora não estatisticamente, os animais diabéticos apresentaram tendência a aumentos médios de triglicerídeos e colesterol total em relação aos animais normais, o que poderia representar uma das complicações resultantes do diabetes. A deficiência na produção de insulina no DM causa alterações no metabolismo lipídico pela ausência do efeito da insulina em promover a lipogênese e inibir a lipólise, ocasionando aumento significativo de triglicerídeos plasmáticos, provavelmente em decorrência da elevada síntese de triglicerídeos a partir dos ácidos graxos que chegam ao fígado, em virtude de maior lipólise no tecido adiposo (CARVALHEIRA et al., 2002). Como resultado disso, há elevada síntese de VLDL hepática acompanhada de menor catabolismo da mesma pela menor atividade da LLP (JAIN et al., 2007). Considerando que o DM resulta em aumento da lipólise no tecido adiposo, com o aumento dos níveis de ácidos graxos sanguíneos há maior produção de

corpos cetônicos pelo fígado, mas os ácidos graxos em excesso captados pelo fígado não são totalmente oxidados a corpos cetônicos pela cetogênese (FORETZ et al., 1999). Desta forma, tal excesso de ácidos graxos será direcionado para a síntese de triglicerídeos que serão transformados em VLDL e, visto que as VLDL em excesso não serão depuradas pela LLP, haverá a instalação de uma hipertrigliceridemia potencializada pelos baixos níveis de insulina no sangue, uma vez que a LLP tem sua ação dependente do nível de insulina circulante (CONTRERAS et al., 2000).

A análise dos resultados evidenciou que a suplementação com vitamina D resultou em redução nos níveis de triglicerídeos e de colesterol total em relação ao grupo diabético controle. O que embora não tenha atingido significância estatística representa melhora do ponto de vista clínico, e do risco cardiovascular. Considerando que, segundo já foi citado, a vitamina D participaria da melhora da resposta à insulina, a diminuição de triglicerídeos e do colesterol seria uma resposta em consequência à melhora do quadro do DM.

Ainda sobre o perfil lipídico dos animais, observou-se uma tendência a diminuição do HDL no grupo diabético controle em relação ao grupo não diabético, e aumento do HDL nos grupos que receberam vitamina D, em relação ao diabético controle. Nos dois casos essa diferença não foi significativa. Concentrações elevadas de HDL-c é um fator de proteção para as doenças cardiovasculares entre os idosos estudados. Esse papel do HDL-c, apesar de ainda não estar totalmente estabelecido, é atribuído a sua capacidade de mediação do transporte reverso do colesterol (FREITAS et al., 2009).

Indivíduos com baixos níveis de vitamina D têm maior incidência de dislipidemia. A análise de mais de 15 mil adultos no National Health and Nutritional Examination Survey III (NHANES III) mostrou uma relação entre os fatores de risco cardiovascular e os níveis de 25-hidroxicalciferol e verificou que tais variáveis foram inversamente associados à hipertrigliceridemia (MARTINS et al., 2007). Outros estudos, também, apontaram uma associação inversa entre 25(OH)D e as concentrações de triglicerídeos, HDL-c e colesterol total (BOGH et al., 2010; BOTELLA-CARRETERO et al., 2007; CIGOLINI et al., 2006; LIU et al., 2009;).

Os mecanismos plausíveis para essas associações têm sido relacionado aos efeitos do cálcio, PTH e das estatinas. As estatinas aumentariam as concentrações de vitamina D e possivelmente inibiriam a ação da enzima hidro-metilglutaril coenzima A redutase (HMG-CoA). Como o colesterol é sintetizado a partir do 7-deidrocolesterol

pela ação da enzima HMG-CoA, então a inibição dessa enzima provocada pela estatina, eleva a concentração de 7-deidrocolesterol, que é convertido a 25(OH)D. A maior concentração desta vitamina poderia elevar a inibição enzimática, agindo de maneira sinérgica com as estatinas na redução do colesterol total (FERRAREZI, 2011). Assim, os resultados de um estudo realizado em pacientes com infarto agudo do miocárdio sugerem que as concentrações séricas de 25 (OH)D acima de 30 nmol/L são necessárias para que a atorvastatina reduza os níveis de colesterol total, triglicerídeos e LDL-c (PÉREZ- CASTRILLÓN, 2010).

Em relação aos níveis de vitamina D médios dos diferentes grupos, não foi encontrada diferença significativa entre os grupos apesar da suplementação com a mesma.

No tocante aos resultados encontrados em relação à insulina, observou-se, como esperado, diminuição significativa da insulina nos grupos diabéticos, o que confirma o quadro de deficiência insulínica do DM e a ação eficaz da STZ como indutor da doença neste estudo. É importante destacar que no grupo DS50, observou-se um aumento da insulina de forma que alcançou valores iguais estatisticamente ao grupo controle não diabético, o que sugere que a vitamina D tenha influenciado positivamente na secreção insulínica. Corroborando com este resultado, estudos referentes à suplementação com 25(OH)D sugerem uma melhora na secreção de insulina em indivíduos com DM (BORISSOVA et al., 2003). Outros pesquisadores confirmam que a suplementação de 25(OH)D em humanos pode aumentar a secreção de insulina estimulada em resposta à carga de glicose oral em pacientes com DM2 (sem glicemia de jejum alterada) em adultos saudáveis não diabéticos e em indivíduos com deficiência de vitamina D sem DM2 estabelecida (CHIU, 2004; ORWOLL et al., 1994). A 25(OH)D pode atuar nesses mecanismos em virtude da presença (VDR) nas células- β e de proteínas ligadoras de cálcio dependente de vitamina D (DBP) no tecido pancreático, melhorando a secreção da insulina (ISHIDA, 1998). Adicionalmente, a deficiência de 25(OH)D parece dificultar a capacidade das células- β na conversão da pró-insulina a insulina, diminuindo sua produção, e pode induzir à intolerância à glicose (AYESHA et al., 2001; MAESTRO et al., 2000).

Os níveis séricos de proteínas totais constituem-se em uma medida aproximada da proteína sérica (albuminas e globulinas) que pode revelar o estado nutricional, presença de doença renal, doença hepática e muitas outras condições (KATAOKA et al., 2006). A albumina é a proteína mais abundante do plasma e dos líquidos

extracelulares, sendo uma das mais extensamente estudadas, e tem importância preponderante na determinação da pressão oncótica plasmática exercendo ainda função de proteína de transporte (ACUÑA; CRUZ, 2004). Adicionalmente, os níveis séricos de proteínas, particularmente as constitutivas pertencentes à classe das albuminas, têm demonstrado serem bons indicativos de evolução clínica favorável em pacientes criticamente enfermos (JESCHKE et al., 2005).

A análise dos resultados aqui encontrados não evidenciou diferença estatística em relação às proteínas totais nos diferentes grupos, no entanto, a albumina foi significativamente menor no grupo diabético quando comparado ao controle, possivelmente estando associada a um possível processo inflamatório, visto que a albumina é um reagente de fase aguda negativa (TAN, 2004). Além disso, esta redução poderá estar associada às glicações não-enzimáticas causadas pelo estado de hiperglicemia do Diabetes mellitus, diminuindo assim a concentração de albumina livre. A diminuição da albumina não poderia estar associada a uma provável microalbuminúria, geralmente causada pela nefropatia diabética, visto que o período de 20 dias seria insuficiente para desencadear uma lesão renal (CHRISTENSON, 1996).

Observou-se ainda, que o tratamento com vitamina D foi capaz de elevar os níveis da albumina sérica nos grupos que receberam a suplementação, igualando-se estatisticamente, aos valores encontrados no grupo controle não diabético. Estes resultados sugerem que a vitamina D seria capaz de diminuir o processo inflamatório causado pelo DM. Dentre os fatores que podem contribuir para este estado inflamatório no diabetes estão o estresse oxidativo, a hiperglicemia, os produtos de glicação avançados (AGEs) e a oxidação do LDL (lipoproteína de baixa densidade), a vitamina D poderia agir de formas direta ou indireta em alguns delas, influenciando na albumina sérica (TAN, 2004).

7 CONCLUSÃO

A suplementação com vitamina D nas proporções utilizadas não apresentou alteração positiva no perfil lipídico e não modificou os sintomas normalmente induzidos pelo DM, tais como, perda de peso, polifagia, polidipsia e poliúria. Por outro lado, a vitamina D administrada apresentou efeito hipoglicemiante importante e foi capaz de melhorar o perfil da insulina de forma significativa. Estudos prospectivos e de intervenção em humanos que comprovem a efetividade da adequação do *status* da vitamina D, tanto na prevenção como no tratamento do DM, ainda são escassos. Mais ainda, a compreensão dos mecanismos exatos pelos quais a 25(OH)D ou a forma ativa 1,25(OH)2D3 promovem melhor funcionamento das células- β , do sistema renina-angiotensina e da regulação da quantidade de gordura corporal são também incompletos.

Considerando os resultados deste trabalho e que há importantes lacunas no conhecimento sobre a ação dessa vitamina em relação à prevenção e ao tratamento de doenças endocrinometabólicas, a investigação da adequação do *status* da vitamina D nessas situações deve ser objeto de futuras pesquisas.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACUÑA, K.; CRUZ, T. Avaliação do estado nutricional de adultos e idosos e situação nutricional da população brasileira. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**. v. 48, n. 3, p. 345-61, 2004.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**. v. 29, p. 43-8, 2006.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**. v. 32, p. 62-7, 2009.

ARAÚJO, L. M. B.; BRITTO, M. M. S.; PORTO DA CRUZ, T. R. Tratamento do diabetes mellitus do tipo 2: novas opções. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**. v. 44, n. 6, p. 509-18, 2000.

ATIF BA, ALAPPAT L, VALÉRIO M. Vitamin D and Metabolic Syndrome Risk Factors: Evidence and Mechanisms. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v.52, n.2, p.103-112, 2012.

AYESHA I, BALA TS, REDDY CV, RAGHURAMULU N. Vitamin D deficiency reduces insulin secretion and turnover in rats. **Diabetes Nutr Metab**. 2001;14(2):78-84.

BANDEIRA, F.; FREESE, E. Occult vitamin D deficiency and its relationship with bone mineral density among postmenopausal women in Recife, Brazil. **J. Bone Miner. Res.**, New York, n. 18, suppl. 2, p. S407, 2003.

BAYNES, J.; DOMINICZAK, M. H. **Bioquímica Médica**. 2 ed. São Paulo: Manole, 2000, p.260.

BIKLE, D. Nonclassic Actions of vitamin D. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Philadelphia, n. 94, p. 26-34, 2009.

BLAND, R. et al. Expression of 25 hydroxyvitamin D3 -1 α -hydroxylase in pancreatic islets. **J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.**, Oxford, n. 89, p. 121-125, 2004.

BOGH, M. K. B. et al. Vitamin D production after UVB exposure depends on baseline vitamin D and total cholesterol but not on skin pigmentation. **The Journal of Investigative Dermatology**, v.130, n.2, p.546-53, 2010.

BOONEN, S. et al. Need for additional calcium to reduce the risk of hip fracture with vitamin D supplementation: evidence from a comparative meta-analysis of randomized controlled trials. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Philadelphia, n. 92, p. 1415-1423, 2007.

BORISSOVA AM, TANKOVA T, KIRILOV G, DAKOVSKA L, KOVACHEVA R. The effect of vitamin D3 on insulin secretion and peripheral insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. **Int J Clin Pract.** 2003;57(4):258-61.

BOTELLA-CARRETERO, J. I. et al. Vitamin D deficiency is associated with the metabolic syndrome in morbid obesity. **Clinical Nutrition**, v.26, n.5, p.573-580, 2007.

CARVALHEIRA J. B. C.; ZECCHIN. H. G.; SAAD, M. J. A. Vias de sinalização da insulina. **Arquivos Brasileiros de Metabologia e Endocrinologia.** v. 46, n. 4, p. 419-25, 2002.

CARVALHO, G. D; MASSENO, A. P. B.; ZANINI, M. S.; ZANINI, S. F.; PORFÍRIO, L. C.; MACHADO, J. P.; MAUAD, H. Avaliação clínica de ratos de laboratório (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar): parâmetros sanitários, biológicos e fisiológicos. **Revista Ceres.** v. 56, n.1, p. 51-7,2009.

CHIU, K. C. et al. Hypovitaminosis D is associated with insulin resistance and beta cell dysfunction. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, n. 79, p. 820-825, 2004.

CHRISTENSON RH, Silverman LM. **Aminoácidos e proteínas:** In: Burtis CA, Ashwood ER. Fundamentos de química clínica. 4ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1996. p. 234-74.

CIGOLINI, M. et al. Serum 25-hydroxyvitamin D3 concentrations and prevalence of cardiovascular disease among Type 2 diabetic patients. **Diabetes Care**, v.34, n.9, p.722-724, 2006.

CONTRERAS, F.; RIVERA, M.; VÁSQUEZ, J. F.; YÁNEZ, C. J. B.; DE LA PARTE, M. A.; VELASCO, M. Diabetes e Hipertensión Aspectos Clínicos y Terapêuticos. **Archivos Venezolanos Farmacologia y Terapeutica**, v.19, n.1, p. 11-26, 2000.

DELUCA, H. F. The vitamin D story: a collaborative effort of basic science and clinical medicine. **FASEB J.**, Bethesda, n. 2, p. 224-236, 1988.

DUSSO, A. S.; BROWN, A. J.; SLATOPOLSKY, E. Vitamin D. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, Bethesda, v. 289, n. 1, p. F8-28, 2005.

FEITOSA, A. C. R.; MARANHAO, R. C.; FEITOSA FILHO, G. S.; WAJCHENBERG, B. L. Transferência de lípidos para a lipoproteína de alta densidade (HDL) em mulheres com diabetes melito tipo 1. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**. v. 53, n. 1, p. 95-101, 2009.

FERRAREZI, D. A. F. **Variações Alélicas no Gene do Receptor da Vitamina D (VDR) e Risco de Doença Arterial Coronariana em Paciente Diabéticos Tipo 2**. 2011. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

FORETZ, M.; GUICHARD, C.; FERRE, P.; FOUFELLE, F. Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 96, n. 22, p. 1237-42, 1999.

FOROUHI, N. G. et al. Baseline serum 25 hydroxy vitamin D is predictive of Future Glycemic Status and Insulin Resistance. The Medical Research Council Ely Prospective Study 1990-2000. **Diabetes**, New York, n. 57, p. 2619-2625, 2008.

FRANCO, L. J. Um problema de saúde pública. Epidemiologia. In: Oliveira, JEP, Milech A, editors. **Diabetes Mellitus: clínica, diagnóstico, tratamento multidisciplinar**. São Paulo: Editora Atheneu; 2004. p. 19-32.

FREITAS, E. V. et al. Importância da HDL-c para a ocorrência de doença cardiovascular no idoso. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.93, n.3, p.231-8 2009.

GARLAND, C. F. et al. The role of vitamin D in cancer prevention. **Am. J. Public Health**, Washington, n. 96, p. 252-261, 2006.

GONZALES, E. A. et al. Vitamin D insufficiency and deficiency in chronic kidney disease. A single center observational study. **Am. J. Nephrol.**, Basel, n. 24, p. 503-510, 2004.

GRIZ LHM. **Deficiência de Vitamina D em mulheres portadoras de Diabetes Mellitus tipo 2 na pós-menopausa** (Tese doutorado). Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz. Recife, 2013.

HARKNESS, J. E.; WAGNER, J. E. **Biologia e Clínica de Coelhos e Roedores**, 3ª ed. São Paulo, Roca, 1993. 238p.

HAUSSLER, M. R. et al. The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. **J. Bone Miner. Res.**, New York, n. 13, p. 325-349, 1998.

HEDGE, G. A.; COLBY, H. D.; GOODMAN, R. L. **Fisiologia Endócrina Clínica**. 1ª Ed. Rio de Janeiro: Interlivros, 1987.

HOLICK MF, BINKLEY NC, BISCHOFF-FERRARI HA, et al., Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. **J Clin Endocrinol Metab**, v.96, p.96-1911, 2011.

HOLICK, M. F. Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. **J. Clin. Invest.**, New York, n. 116, p. 2062-2072, 2006.

HOLICK, M. F. Vitamin D deficiency. **N. Engl. J. Med.**, Boston, n. 357, p. 266-281, 2007.

HOLICK, M. F. Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, n. 79, p. 362-371, 2004.

HOLICK, M. F.; GARABEDIAN, M. Vitamin D: photobiology, metabolism, mechanism of action, and clinical applications. In: FAVUS, M. J. (Ed.). **Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism**. 6 th ed. Washington, DC: American Society for Bone and Mineral Research, 2006. p. 129-137.

HOLMES, V. A. et al. Vitamin D deficiency and insufficiency in pregnant women: a longitudinal study. **Br. J. Nutr.**, London, n. 102, p. 876-871, 2009.

HUGHES, BD. **Treatment of vitamin D deficiency in adults**. Up To Date, 2011. <http://www.uptodate.com> (Acessado em dezembro, 2014).

ISHIDA H, NORMAN AW. Demonstration of a high affinity receptor for 1,25-dihydroxyvitamin D3 in rat pancreas. **Moll Cell Endocrinol**. 1988;60(2-3):109-17.

JAIN, S. K.; RAINS, J. L.; CROAD, J. L. Effect of chromium niacinate and chromium picolinate supplementation on lipid peroxidation, TNF- α , IL-6, CRP, glycated hemoglobin, triglycerides and cholesterol levels in blood of streptozotocin-treated diabetic rats. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 43, p. 1124-31, 2007.

JESCHKE, M. G.; RENSING, H.; KLEIN, D.; SCHUBERT, T.; MAUTES, A. E. M.; BOLDER, U.; CRONER, R. S. Insulin prevents liver damage and preserves liver function in lipopolysaccharideinduced endotoxemic rats. **Journal of Hepatology**. v. 42, p. 870-9, 2005.

KATAOKA, A.SANTANA, A.E.; SEKI, M. C. Alterações do proteinograma sérico em cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis*. **Ars Veterinária**. v. 22, n. 2, p. 98-102, 2006.

KHAN, B. A.; ABRAHAM, A.; LEELAMMA, S. Hypoglycemic action of *Murray Koenigii* (curry leaf), *Brassica juncea* (mustard); mechanism of action. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**. v. 32, p. 106– 8, 1995.

KIMBALL S et al., Vitamin D: a growing perspective. **Crit Rev Clin Lab Sci**, v. 45, n.4, p.339-414, 2008.

KING, H.; AUBERT, R. E.; HERNAN, W. H. Global burden of Diabetes, 1995-2025: Prevalence, numerical estimates, and projections. **Diabetes Care**. v. 21, n. 9, p.1414-31, 1998.

LEHTO, S.; RONNEMAA, T.; HAFFNER, S. M.; PYORALA, K.; KALLIO, V.; LAAKSO, M. Dyslipidemia and hyperglycemia predict coronary heart disease events in middle-aged patients with NIDDM. **Diabetes**. v. 46, n. 8, p. 1354-9, 1997.

LERCO, M. M.; SPADELLA, C. T.; MACHADO, J. L. M.; SCHELLINI, S. A.; PADOVANI, C. R. Caracterização de um modelo experimental de diabetes mellitus induzido em ratos. Estudo clínico e laboratorial. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v. 18, n. 2, p. 132-42, 2003.

LIU, E. et al. Plasma 25-hydroxyvitamin D is associated with markers of the insulin resistant phenotype in nondiabetic adults. **The Journal of Nutrition**, v.139, n.2, p.329-34, 2009.

LUKIC M. L.; STOSIC-GRUJICIC, S.; SHAHIN, A. Effector mechanism in low dose streptozotocin induced diabetes. **Developmental Immunology**. v. 6, n. 1, p.119-28, 1998.

MACHADO, J. L. M.; MACEDO, A. R.; SILVA, M. D.; SPADELLA, C. T.; MONTENEGRO, M. R. G. Caracterização de um modelo experimental de neuropatia

em ratos diabéticos induzidos por aloxana. **Acta Cirúrgica Brasileira** [serial online], v. 15, n. 2, 2000. Disponível em: www.scielo.br. Acesso em: 30/08/2014.

MAESTRO B, CAMPIÓN J, DÁVILA N, CALLE C. Stimulation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ of insulin receptor expression and insulin responsiveness for glucose transport in U-937 human promonocytic cells. **Endocr J**. 2000;47(4):383-91.

MARTINS, D. et al. Prevalence of cardiovascular risk factors and the serum levels of 25-hydroxyvitaminD in the United States: data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. **Archives of Internal Medicine**, v.167, n.11, p.1159-65, 2007.

MCGRATH, J. J. et al. Vitamin D insufficiency in south- east Queensland. **Med. J. Aust.**, Sidney, n. 174, p. 150-151, 2001.

MITRA, S.K.; GOPUMADHAVAN, S.; MURALIDHAR, T. S.; ANTURLIKAR, S. D.; SUJATHA, M. B. Effect of D-400, a herbomineral preparation on lipid profile, glycated haemoglobin and glucose tolerance in streptozotocin induced diabetes in rats. **Indian Journal of Experimental Biology**. v. 33, p. 798–800, 1995.

MUNGER, K. L. et al. Serum 25 hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. **JAMA**, Chicago, n. 296, p. 2832-2838, 2006.

MUSZKAT P et al., Evidence-based non-skeletal actions of vitamin D. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v.54, n.2, p.110-117, 2010.

NAGPAL, S.; RATHNACHALAM, R. Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands. **Endocr. Rev.**, Baltimore, n. 26, p. 662-687, 2005.

NATIONAL OSTEOPOROSIS FOUNDATION (NOF). **Clinician's Guide to Prevention and Treatment of Osteoporosis**. Washington, DC: National Osteoporosis Foundation, 2010.

OLIVEIRA, F. A.; ARAÚJO, B. C. Capillaries changes of the Stria vascularis in experimental diabetes. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**. v. 52, n. 1, p. 20-2, 1986.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAUDE (OMS). **Prevention and management of osteoporosis prevention**. Technical Report Series nº 921. Geneva: 2003.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Programa de Diabetes**. Disponível em: <<http://www.who.int/diabetes/en/>>. Acesso em: 08 de mar de 2015.

ORWOLL E, RIDDLE M, PRINCE M. Effects of vitamin D on insulin and glucagon secretion in non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Am J Clin Nutr**. 1994;59(5):1083-7.

PARKER J, HASHMI O, DUTTON D et al., Levels of vitamin D and cardiometabolic disorders: Systematic review and meta-analysis. **Maturitas**, v.10, p.225-236, 2010.

PATEL, S. R. et al. Inhibition of calcitriol receptor binding to vitamin D response elements by uremic toxins. **J. Clin. Invest.**, New York, n. 96, p. 50-59, 1995.

PÉREZ-CASTRILLÓN, J. L. et al. Vitamin D levels and lipid response to atorvastatin. **International Journal of Endocrinology**, v.2010, p.1-4, 2010.

PERWAD, F. et al. Dietary and serum phosphorus regulate fibroblast growth factor 23 expression and 1,25-dihydroxyvitamin D metabolism in mice. **Endocrinology**, Baltimore, n. 146, p. 5358-5364, 2005.

PETERS, B. S. E. et al. Vitamina D. 2º ed., São Paulo: **ILSI Brasil International Life Sciences Institute do Brasil**, 2014 (Série de publicações ILSI Brasil: funções plenamente reconhecidas de nutrientes; v.2.

PITANGA, F. J. G. **Epidemiologia da Atividade Física, Exercício Físico e Saúde**. 2 ed. São Paulo: Phorte, 2004. p. 392.

PITTAS AG, CHUNG M, TRIKALINOS T, MITRI J, BRENDEL M, PATEL K, LICHTENSTEIN AH, LAU J, BALK EM. Systematic review: Vitamin D and cardiometabolic outcomes. **Ann Intern Med.** 2010;152:307–14.

PLOTNIKOFF, G. A.; QUIGLEY, J. M. Prevalence of severe hypovitaminosis D in patients with persistent, nonspecific musculoskeletal pain. **Mayo Clin. Proc.**, Rochester, n. 78, p. 1463-1470, 2003.

PREMAOR MO, FURLANETTO TW. Hipovitaminose D em adultos: entendendo melhor a apresentação de uma velha doença. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v.50, n.1, p.25-37, 2006.

REES, D. A.; ALCOLADO, J. C. Animal models of diabetes mellitus. **Diabetic Medicine.** v. 22, n. 4, p. 359-70, 2005.

REIMANN, M.; BONIFACIO, E.; SOLIMENA, M.; SCHWARZ, P. E. H.; LUDWIG, B.; HANEFELD, M.; BORNSTEIN, S. R. An update on preventive and regenerative therapies in diabetes mellitus. **Pharmacology & Therapeutics.** v. 121, n. 3, p. 317 – 31, 2009.

RUSSO LAT *et al.* Concentração plasmática de 25 hidroxivitamina D em mulheres na pós-menopausa com baixa densidade mineral óssea. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v.53, p.1079-1087, 2009.

SCHELLINI, S. A. **Retinopatia diabética experimental: estudo estrutural, ultraestrutural e morfométrico da retina de ratos normais, diabéticos e diabéticos tratados.** 1992. (Tese Doutorado). Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Medicina de Botucatu. São Paulo, 1992.

SCHNEDL, W. J.; FERBER, S.; JOHNSON, J. H.; NEWGARD, C. B. STZ transport and cytotoxicity: specific enhancement in GLUT-2 expressing cells. **Diabetes.** v. 42, p. 413-21, 1994.

SCHUCH NJ et al., Vitamina D e doenças endocrinometabólicas. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v.53, n.5, p.625-633, 2009.

SEDRANI, S. H. Low 25 hydroxyvitamin D and normal serum calcium concentration in Saudi Arabia. Riyadh region. **Ann. Nutr. Metab.**, Basel, n. 28, p. 181-185, 1984.

SERGEEV, I. N.; RHOTEN, W. B. 1,25-hydroxyvitamin D₃ evokes oscillations of intracellular calcium in a beta-cell line. **Endocrinology**, Baltimore, v. 136, n. 7, p. 2852-2861, 1995.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Tratamento e Acompanhamento do Diabetes Mellitus. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes**. 2006.

SOOY, K. et al. Calbindin-D (28k) controls [Ca²⁺]_i and insulin release. Evidence obtained from calbindin-D (28k) knockout mice and beta cell lines. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 274, n. 48, p. 34343-34349, 1999.

SOWERS, J. R. Insulin resistance and hypertension. **J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, Bethesda, v. 286, n. 5, p. H1597-1602, 2004.

SPADELLA, C. T. **Avaliação funcional do transplante pancreatoduodenal no rato diabético: estudo clínico, laboratorial, anátomo-patológico e imunohistoquímico**. 1989. (Tese Doutorado). Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Medicina de Botucatu. São Paulo, 1989.

SPADELLA, C. T.; MACEDO, C. S.; MAVHADO, J. L. M.; SCHELLINI, S. A.; PADOVANNI, C. R. Estudo comparativo entre cinco diferentes tratamentos sobre as alterações clínicas e laboratoriais do rato diabético induzido pela aloxana. **Acta Cirurgica Brasileira**. v.20, n. 1, p. 46-54, 2005.

SZKULDESKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiological Research**. v. 50, p. 536-46, 2001.

TAKIISHI T, GYSEMANS C, BOUILLON R, MATHIEU C. Vitamin D and Diabetes. **Endocrinol and Metabolism Clinics of North America**, v.39, n.2, p.179-206, 2010.

TAN K. Dyslipidaemia, inflammation and endothelial dysfunction in diabetes mellitus. **Int Congr Ser** 2004; 1262: 511-4.

TFAYLI, H.; ARSLANIAN, S. Pathophysiology of type 2 diabetes mellitus in youth: the evolving chameleon. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**. v. 53, n. 2, p. 165-74, 2009.

VIETH R. What is the optimal vitamin D status for health? **Prog Biophys Mol Biol**, v.92, n.26, 2006.

WANG, T. J. et al. Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease. **Circulation**, Dallas, v. 117, n. 4, p. 503-511, 2008.

WEI, Y. et al. Angiotensin II-induced skeletal muscle insulin resistance mediated by NF-kappa B activation via NADPH oxidase. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, Bethesda, v. 294, n. 2, p. E345-351, 2008.

WILD, S.; ROGLIC, G.; GREEN, A.; SICREE, R.; KING, H. Global prevalence of diabetics: estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**. v. 27, n. 10, p. 1047-53, 2004.

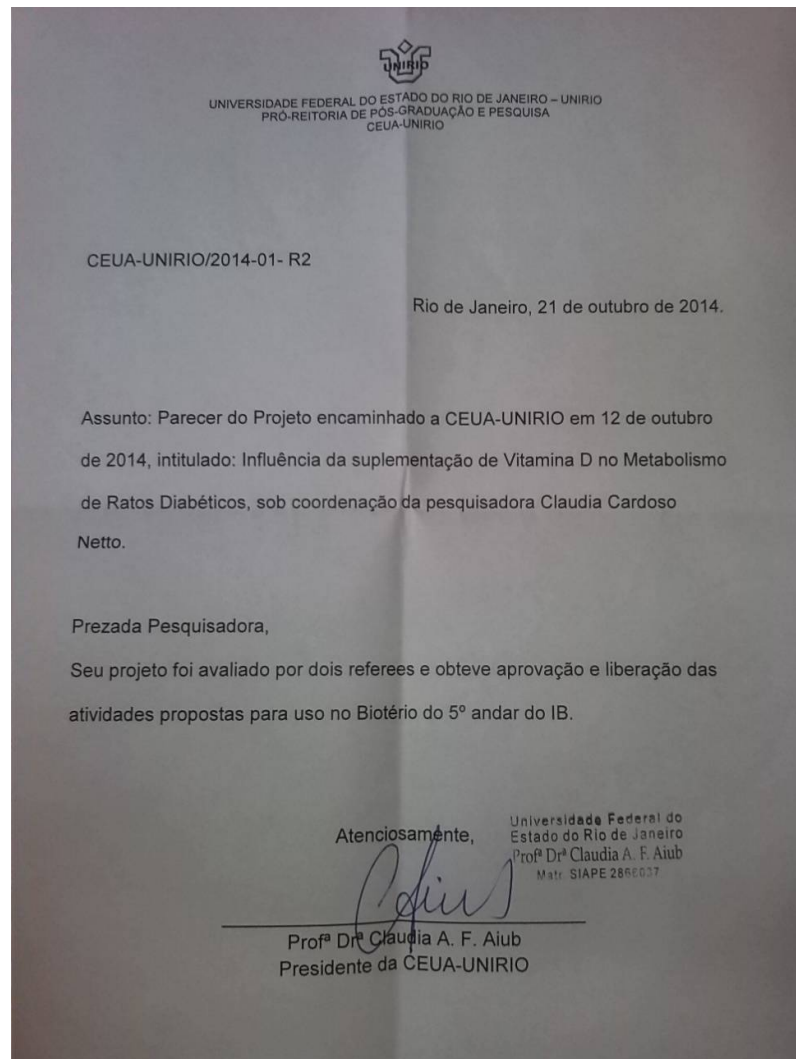
YADAV, U. C.; MOORTHY, K.; BAQUER, N. C. Combined treatment of sodium orthovanadate and *Mormodica charantia* fruit extract prevents alterations in lipid profile and lipogenic enzymes in alloxan diabetic rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**. v. 268, n. 1, p. 111–20, 2005.

YAMAZAKI, R. K.; HIRABARA, S. M.; TCHAIKOVSKI, O.; LOPES, M. C. P.; NOGATA, C.; AIKAWA, J.; NUNES, E. A.; TANHOFFER, R. A.; LISSA, M. D.; FERNANDES, L. C. The effects of peroxovanadate and peroxovanadyl on glucose metabolism *in vivo* and identification of signal transduction proteins involved in the mechanism of action in isolated soleus muscle. **Molecular and Cellular Biochemistry**. v. 273, p. 145-50, 2005.

ZIPITIS CS, AKOBENG AK. Vitamin D supplementation in early childhood and risk of type 1 diabetes. a systematic review and meta-analysis. **Arch Dis Child**. 2008; 93: 512–7.

9 ANEXOS

ANEXO 1 – APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL(CEUA) DA UNIRIO



ANEXO 2 – COLETA DE RESÍDUO BIOLÓGICO

 PREFEITURA DA CIDADE DO RIO DE JANEIRO SECRETARIA MUNICIPAL DE FAZENDA NOTA FISCAL DE SERVIÇOS ELETRÔNICA - NFS-e - NOTA CARIOCA -	Número da Nota 00009826				
	Data e Hora de Emissão 28/05/2015 19:17:38 Código de Verificação UDTN-JRJL				
PRESTADOR DE SERVIÇOS					
	CPF/CNPJ: 07.941.147/0001-25 Inscrição Municipal: 0.379.821-6 Inscrição Estadual: --- Nome/Razão Social: 2MC TRANSPORTES RODOVIARIOS LTDA Nome Fantasia: 2MC Transportes de RESÍDUOS Tel.: 7839-6346 2426-6374 Endereço: RUA EDGARD WERNECK 688, CASA 073 - FREGUESIA(JACAREPAGUA) - CEP: 22763-197 Município: RIO DE JANEIRO UF: RJ E-mail: doismc@ig.com.br				
TOMADOR DE SERVIÇOS					
CPF/CNPJ: 079.675.387-03 Inscrição Municipal: ---- Inscrição Estadual: ---- Nome/Razão Social: CLAUDIA CARDOSO NETTO Endereço: RUA FREI CANECA 94, 4 andar - CENTRO - CEP: 20211-040 Tel.: ---- Município: RIO DE JANEIRO UF: RJ E-mail: ----					
DISCRIMINAÇÃO DOS SERVIÇOS					
COLETA, TRANSPORTE E DESTINAÇÃO FINAL DE RESÍDUO BIOLÓGICO GRUPO A GRUPO A4 (CARCAÇAS DE RATO) GRUPO E (PÉRFURO CORTANTE) SERVIÇO REALIZADO NA DEPENDÊNCIA DA UNIRIO - DEPTO DE BIOQUÍMICA VENCIMENTO 05/06/2015					
VALOR DA NOTA = R\$ 400,00					
Serviço Prestado					
07.09.02 - coleta de residuos lixo, rejeitos ou outros residuos quaisquer					
Deduções (R\$)	Desconto Incond. (R\$)	Base de Cálculo (R\$)	Alíquota (%)	Valor do ISS (R\$)	Crédito Gerado (R\$)
0,00	0,00	----	----	----	0,80
OUTRAS INFORMAÇÕES					
- Esta NFS-e foi emitida com respaldo na Lei nº 5.098 de 15/10/2009 e no Decreto nº 32.250 de 11/05/2010 - PROCON-RJ: Rua da Ajuda, 5 subsolo; www.procon.rj.gov.br - ISS devido deve ser recolhido por meio de Documento de Arrecadação do Simples Nacional (DAS). - Documento emitido por ME ou EPP optante pelo SIMPLES NACIONAL, inclusive pelo MEI, não gera direito a crédito fiscal de IPI.					