

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL - UFMS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E DESENVOLVIMENTO NA
REGIÃO CENTRO-OESTE

JOÃO RENATO PESARINI

VITAMINA D: CORRELAÇÃO COM ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E DA
COMPOSIÇÃO CORPORAL EM UMA POPULAÇÃO DO SUL DO BRASIL E
AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS EM CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS DO TECIDO ADIPOSEO HUMANO

Campo Grande, MS.

2018

JOÃO RENATO PESARINI

**VITAMINA D: CORRELAÇÃO COM ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E DA
COMPOSIÇÃO CORPORAL EM UMA POPULAÇÃO DO SUL DO BRASIL E
AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS EM CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS DO TECIDO ADIPOSEO HUMANO**

Tese de Doutorado submetida ao curso *stricto sensu* do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, área de concentração: Tecnologia e Saúde, linha de pesquisa: Cultivo celular, terapia e engenharia tecidual, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Juliano Oliveira

Campo Grande, MS.

2018

JOÃO RENATO PESARINI

FOLHA DE APROVAÇÃO

**VITAMINA D: CORRELAÇÃO COM ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E DA
COMPOSIÇÃO CORPORAL EM UMA POPULAÇÃO DO SUL DO BRASIL E
AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS EM CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS DO TECIDO ADIPOSEO HUMANO**

A banca examinadora, após avaliação do trabalho, atribuiu ao aluno o conceito _____.

Campo Grande, __ de _____ de 2018.

Tese de Doutorado submetida ao curso *stricto sensu* do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, área de concentração: Tecnologia e Saúde, linha de pesquisa: Cultivo celular, terapia e engenharia tecidual, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Doutor.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Rodrigo Juliano Oliveira (Presidente)
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS

Profa. Dra. Susana Elisa Moreno (Membro permanente)
Universidade Católica Dom Bosco – UCDB

Profa. Dra. Karine de Cassia Freitas Gielow (Membro permanente)
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS

Prof. Dr. Cristiano Marcelo Espínola Carvalho (Membro permanente)
Universidade Católica Dom Bosco – UCDB

Profa. Dra. Luana Silva Soares (Membro permanente)
Universidade Católica Dom Bosco – UCDB

Prof. Dr. Wilson de Barros Cantero (Membro suplente)
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS

Campo Grande, MS.

2018

Dedico este trabalho primeiramente à Deus, que continua a abençoar as minhas escolhas, sempre me conduzindo para o sucesso. Foram quatro longos anos longe de muitos que eu amo. Quatro longos anos de muito aprendizado. Obrigado, senhor, por me guiar até aqui.

Aos meus pais, Patrícia e Mário, e à minha irmã, Daniela. Eu não tenho palavras para descrever tanto sentimento em tão pouco espaço. O homem que sou hoje é reflexo do amor de vocês. Obrigado pelo apoio, carinho e amor durante todos esses anos de minha vida acadêmica. Pai e mãe, vocês são tudo na minha vida! Do fundo do meu coração eu espero ter proporcionado um sentimento de orgulho!

Aos que passaram pela minha vida e deixaram um pedaço de aprendizado. Caminhos cruzam e se descruzam. Muitas vezes, nossas vontades não acontecem como planejado. No final de tudo, nós escolhemos as pessoas que não vamos esquecer. Com toda certeza, de muitos e muitas eu não esquecerei...

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, mentor e amigo Professor Dr. Rodrigo Juliano Oliveira.

Rodrigo, poucos tem a chance de ter um orientador tão dedicado, trabalhador e correto como você. Sinto-me honrado por ter ajudado no crescimento do CeTroGen (36 artigos!), bem como ter sido seu aluno desde a graduação. Hoje eu termino o Doutorado com um sentimento de dever cumprido, mas sempre estarei por perto se precisar. Obrigado por todos os conselhos, dicas e pela confiança depositada em mim.

À Professora Dra. Iandara Schettert Silva, à técnica administrativa Sra. Áurea e toda equipe do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste.

Por terem proporcionado espaço para meu desenvolvimento pessoal, pela confiança depositada e por todo apoio na questão acadêmica.

À Professora Dra. Andreia Conceição Milan Brochado Antonioli Silva.

Pelos ensinamentos, pelas dicas sobre a vitamina D, pela confiança e principalmente pelo empenho em tornar o CeTroGen uma realidade!

Ao Professor Dr. Wilson de Barros Cantero.

Cantero, mais do que um excelente profissional, um grande amigo! Quando vim para Campo Grande você depositou enorme confiança em mim. Espero ter proporcionado o mesmo que você pode me proporcionar. Obrigado por tudo, principalmente pelo apoio na coleta dos materiais.

Ao Professor Dr. Roberto da Silva Gomes

Pelo apoio na elaboração do projeto de Pós-doutorado, pelos cálculos químicos que tanto sofremos em fazer e pela amizade. Outro profissional extremamente qualificado que muito têm a ensinar.

À Professora Dra. Sarah Alves Auharek.

Por todas as palavras de incentivo, ensinamentos, e dicas de revisão de artigos.

À Professora Dra. Maria Tereza Ferreira Duenhas Monreal.

Professora, muito obrigado por sempre me receber quando precisei com aquele sorriso que só você tem! Um grande abraço!

À Servidora Evelyn Pinho Ferro e Silva.

Pelas tardes de conversa e cafezinho e pelo apoio em toda questão ética envolvendo pesquisas em seres humanos.

Aos amigos que fiz em Campo Grande: Lucas, Edwin, Bruno, Leal, Gi, Luana, Luane, Ana, Raissa, Geyson, Andreza, Larissa, Viviane, Indira, Yasmin, Bruna, Laynna e Michel.

Todos vocês são pessoas maravilhosas que nunca esquecerei. Obrigado pelo apoio em minha pesquisa, pela companhia, pelas risadas, por tudo. Todos têm seu lugar especial no meu coração.

Aos médicos Marco Aurélio Jajah, Carlos Freittas, Marcelo Brune e Marcelo Rosseto.

Pelo apoio na coleta de materiais para a extração de CTMs.

À toda equipe do Hospital da Plástica HPlas, Hospital Proncor e Hemosul.

Pelo apoio operacional na extração de CTMs.

Ao Farmacêutico Sr. Sidney Paulo Miyashiro e à equipe do Laboratório Formédica

Pelo fornecimento de materiais para o desenvolvimento da presente pesquisa. Serei eternamente grato.

Ao CNPq, à CAPES e à FUNDECT

Pela bolsa de Doutorado e pelo apoio financeiro.

"Quem não compreende um olhar, tampouco
compreenderá uma longa explicação"

Mário Quintana.

RESUMO

PESARINI, J. R. Vitamina D: Correlação com alterações bioquímicas e da composição corporal em uma população do Sul do Brasil e avaliação dos efeitos citotóxicos em células-tronco mesenquimais do tecido adiposo humano. 2018. (Tese de doutorado) Campo Grande – MS: Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. 2018.

Estudos demonstram que marcadores séricos de inflamação, desordens metabólicas e ganho de peso podem estar correlacionadas à insuficiência de vitamina D. Diante do exposto o presente estudo correlacionou os níveis séricos de 25(OH)D3, de uma amostra de indivíduos da população do Sul do Brasil, com variáveis relacionadas a desordens metabólicas, obesidade e hábitos de vida, bem como, avaliou o efeito citotóxico do Calcitriol em células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (ADSCs). Os resultados indicaram que a hipovitaminose D foi prevalente em 79,23% da população estudada e que há uma correlação ($p < 0,05$) entre a baixa concentração sérica de vitamina D com um perfil de colesterol LDL aumento. A análise de regressão linear univariada utilizando a 25(OH)D3 como variável regressora demonstrou associação negativa ($p < 0,05$) para ambiente de trabalho fechado/baixa exposição solar ($\beta = -2,305$), aumento da gordura corporal ($\beta = -0,095$), idade ($\beta = -0,065$) e colesterol HDL ($\beta = -0,109$). O ensaio *in vitro* de MTT realizado com ADSCs utilizou Calcitriol em cinco concentrações (15,625, 31,25, 62,5, 125, e 250 nM) e indicou potencial citotóxico ($p < 0,05$) na concentração de 62,5 nM em 48 e 72h e nas concentrações de 125 e 250 nM em 24, 48 e 72h. Os resultados aqui representados corroboram entre si e sugerem importante associação entre insuficiência de vitamina D e o desenvolvimento da obesidade, visto que as ADSCs estão envolvidas na hiperplasia do tecido adiposo.

Palavras-chave: Deficiência de Vitamina D, Calcitriol, Obesidade, Células-Tronco, Características da População.

ABSTRACT

PESARINI, J. R. Vitamin D: Correlation with biochemical and body composition changes in a southern Brazilian population and induction of cytotoxicity in mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue. 2018. (Doctorate Thesis) Campo Grande – MS: Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. 2018.

Studies have shown that serum markers of inflammation, metabolic disorders and weight gain are correlated with vitamin D insufficiency. In light of the above, the present study correlated the serum levels of 25 (OH) D₃ from a sample of individuals from the population of southern Brazil, with variables related to metabolic disorders, obesity and life habits, as well as, evaluated the cytotoxic effect of Calcitriol on mesenchymal stem cells derived from adipose tissue (ADSCs). The results indicated that hypovitaminosis D was prevalent in 79.23% of the studied population and that there was a correlation ($p < 0.05$) between the low serum concentration of vitamin D with an increased LDL cholesterol profile. Univariate regression analysis using 25 (OH) D₃ as the variable showed a negative association ($p < 0.05$) for closed working environment / low sun exposure ($\beta = -2,305$), body fat increase ($\beta = 0.095$), age ($\beta = -0.065$) and HDL cholesterol ($\beta = -0.109$). The *in vitro* MTT assay performed with ADSCs utilized Calcitriol at five concentrations (15.625, 31.25, 62.5, 125, and 250 nM) and indicated a cytotoxic potential ($p < 0.05$) at the concentration of 62.5 nM in 48 and 72 h and at 125 and 250 nM for 24, 48 and 72 h. The results presented herein corroborate each other and suggest an important association between vitamin D insufficiency and the development of obesity since ADSCs are involved in adipose tissue hyperplasia.

Key words: Vitamin D deficiency, Calcitriol, Obesity, Stem Cells, Population Characteristics.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADSCs	Células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo
MTT	Cristais de formazan brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]
Vitamina D₃	Colecalciferol
1,25(OH)₂D₃	Calcitriol
25(OH)D₃	Calcidiol
VDR	<i>Vitamin D Receptor</i>
LDL-c	Colesterol LDL
HDL-c	Colesterol HDL
PBS	Solução Tampão Fosfato
SBF	Soro Bovino Fetal
HDMEM	Meio <i>Dulbecco's modified eagle's médium</i> suplementado com 10% de Soro bovino fetal.
DMSO	Dimetilsulfóxido
s25(OH)D₃	Níveis séricos de Calcidiol
s25(OH)D₃ < 30 ng/mL	Níveis séricos insuficientes de Calcidiol
s25(OH)D₃ ≥ 30 ng/mL	Níveis séricos suficientes de Calcidiol
EPM	Erro Padrão da Média
IC₅₀	Concentração do composto que (neste caso) reduz a viabilidade celular em 50%
SNPs	Polimorfismos de Nucleotídeo Único

LISTA DE TABELAS

Manuscrito - Tabela 1 – Dados descritivos de acordo com as categorias de s25(OH)D3.

Manuscrito - Tabela 2 – Modelos de regressão linear univariada para s25(OH)D3 < 30 ng/mL.

Manuscrito - Tabela 3 – Modelos de regressão linear univariada para s25(OH)D3 $\geq$ 30 ng/mL.

Manuscrito - Tabela 4 – Modelos de regressão linear multivariada para s25(OH)D3.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Síntese da Vitamina D. A imagem demonstra, sumariamente, o processo extremamente regulado que ocorre com o 7-deidrocolesterol e com o Colecalciferol para que atinjam sua forma de hormônio bioativo (Calcitriol) no organismo humano.

Manuscrito - Figura 1 – Gráficos de dispersão e coeficiente de correlação para o modelo multivariado $s25(OH)D3 < 30$ ng/mL.

Manuscrito - Figura 2 – Fotomicrografia das ADSCs: **(A)** cultura indiferenciada, **(B)** cultura em diferenciação adipogênica. Vacúolos lipídicos representados pela coloração de *Oil red O*, **(C)** cultura em diferenciação osteogênica. Depósitos de cálcio corados com *Alizarin Red*, **(D)** Cultura em diferenciação condrogênica. Matriz extracelular rica de glicosaminoglicanos corados com *Azul de Alcian* (Aumento de 40x), **(E)** Gráficos de caracterização imunofenotípica que demonstram que as células são positivas para os marcadores moleculares CD29, CD90 e CD44, mas negativas para CD34, CD 11b e MHC II.

Manuscrito - Figura 3 – **(A)** Média $\pm$ erro padrão da média da viabilidade celular de ADSCs tratadas com Calcitriol. **(B)** Comparação das médias da viabilidade celular dentre os diferentes tempos de tratamento. Letras diferentes indicam resultados estatisticamente significativos (ANOVA/Bonferroni; $p < 0,05$). Dados estão apresentados como Média $\pm$ EPM.

Manuscrito - Figura 4 – Fotomicrografia das ADSCs: (A) cultivo em HDMEM e morfologia normal e (B) cultivo em HDMEM com Calcitriol a 138,97 nM por 24 h. Setas indicam células retraídas e com perda de aspecto fibroblastóide (Aumento de 40x).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 Vitamina D: Aspectos gerais relacionados ao tema da pesquisa	16
2.1.1 Síntese detalhada: Da produção endógena/alimentação até o hormônio bioativo ...	16
2.1.2 Avaliação sérica, níveis ideais e toxicidade	18
2.1.3 Deficiência	19
2.1.4. Prováveis implicações na saúde relacionadas à deficiência de vitamina D ou à ocorrência de polimorfismos no gene VDR (codificador de receptor de vitamina D)	20
2.1.5 Obesidade, adipogênese e a vitamina D.....	21
3. OBJETIVOS.....	24
3.1 Objetivo Geral.....	24
3.2 Objetivo específico	24
4. MANUSCRITO	25
APÊNDICE A – Termo de Consentimento livre e esclarecido.....	37
APÊNDICE B – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.....	41
APÊNDICE C – Documento de aprovação emitido pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos, Universidade Estadual de Londrina	45

1. INTRODUÇÃO

A vitamina D tornou-se foco de estudos, principalmente, por modular funções relativas à saúde óssea (BISCHOFF-FERRARI et al., 2009; FAN et al., 2016), desenvolvimento de tumores (VUOLO et al., 2012; GEE et al., 2013; OSANAI; LEE, 2016) e desordens metabólicas (MELAMED et al., 2008; JORDE et al., 2010; VOGT et al., 2016).

Sendo um composto essencial para o metabolismo dos seres humanos, a vitamina D pode ser adquirida tanto por produção endógena quanto pela ingestão de alimentos. No entanto, em função das baixas concentrações de seus precursores nos alimentos (HOLICK, 2007) aliado a uma dificuldade de absorção, a vitamina D pode ser suplementada via oral em doses diárias que variam de 1.000 a 50.000UI (ALSHAHRANI; ALJOHANI, 2013) ou via intramuscular em dose semestral/trimestral/anual de 600.000UI sob orientação médica (EINARSDOTTIR et al., 2010; REDDY; RAMESH; BHATIA, 2013). Outras suplementações são também indicadas e para tanto se utiliza de cápsulas ou outras formulações farmacêuticas como indicado por Holick e Chen (2008). Além da suplementação, para que se atinjam níveis séricos ideais, sugere-se que os indivíduos se exponham ao sol por aproximadamente 30 minutos no período matutino. Ressalta-se ainda que indivíduos com maior grau de pigmentação na pele, mesmo com exposição solar, tendem a produzir menos vitamina D e há evidências de que esse fato ocorra em todas as estações do ano (ARUNABH et al., 2003).

Dentre as diferentes formas da vitamina D temos o Colecalciferol (Vitamina D₃) que pode ser produzida por exposição solar (produção endógena) e/ou ingerida/suplementada. Por estes fatos, a Vitamina D₃ provavelmente é a mais conhecida na medicina por ser amplamente utilizada na suplementação em casos de hipovitaminose D. No organismo, a vitamina D₃ não é conhecida por modular funções essenciais, porém, enquanto circulante na corrente sanguínea, sofre um processo regulado para ser convertido no hormônio bioativo da vitamina D, mais conhecido como o Calcitriol (1,25(OH)₂D₃). Para tanto, a vitamina D₃ deve passar por um processo de hidroxilação que ocorre principalmente no fígado e é mediado pela enzima 25-hidroxilase para sua conversão em Calcidiol (25(OH)D₃) e, posteriormente, a segunda hidroxilação ocorre em sua maior parte nos rins, desta vez mediada pela enzima 1 α -hidroxilase que converte o Calcidiol em Calcitriol (HOLLANDER; MURALIDHARA; ZIMMERMAN, 1978; OMDAHL et al., 2001; PREMAOR; FURLANETTO, 2006; HOLICK, 2009). No entanto, como já citado anteriormente, mesmo com a ingestão de alimentos ricos em vitamina D₃ os níveis

séricos ideais não são atingidos (HOLICK, 2007), indicando a necessidade de suplementação além da exposição do indivíduo ao sol, preferencialmente no período matutino (KIMLIN; DOWNS; PARISI, 2003; HOLICK; CHEN, 2008; FELTON et al., 2016).

A deficiência de vitamina D, avaliada pelos níveis séricos de 25(OH)D₃, é relatada em crianças, adultos e idosos em todos os continentes (CASHMAN et al., 2016; CURTAIN et al., 2016; SAVASTIO et al., 2016). Desta forma, admite-se uma deficiência em proporções globais (HOSSEIN-NEZHAD; HOLICK, 2013; SADAF, 2016), sugerindo mais estudos populacionais mesmo em países onde a incidência solar anual é considerada alta (BENER; AL-ALI; HOFFMANN, 2009; UNGER et al., 2010; NOWSON et al., 2012; MUHAIRI et al., 2013). No Brasil, dentre os diversos grupos de indivíduos analisados, a deficiência de vitamina D é mais preocupante por também atingir jovens saudáveis e jovens com distúrbios metabólicos como, por exemplo, portadores de Síndrome Metabólica (PETERS et al., 2009; DE SOUSA STUDART et al., 2015; MORAES et al., 2015; DA CUNHA et al., 2016).

Revisões sistemáticas demonstram que distúrbios metabólicos como o aumento de doenças cardiovasculares, altas concentrações séricas de lipídeos, marcadores séricos de inflamação, alterações no metabolismo de glicose e ganho de peso estão correlacionadas à insuficiência de vitamina D (AUTIER et al., 2014; THEODORATOU et al., 2014). Todos estes parâmetros citados estão relacionados à progressão da obesidade e sobrepeso dos seres humanos. Contudo, sabe-se que a expansão do tecido adiposo é mediada pela hipertrofia de adipócitos maduros ou pela hiperplasia de células-tronco multipotentes em diferenciação adipogênica com posterior acúmulo de triglicerídeos no tecido adiposo (JO et al., 2009; YE; GIMBLE, 2011). Recentemente foi demonstrado que as células-tronco adjacentes ao tecido adiposo desempenham um papel importante nos mecanismos de inflamação crônica do tecido adiposo e, conseqüentemente, podem ser fator chave para um tratamento adjunto à prevenção da obesidade (ELJAAFARI et al., 2015). Assim, estudos sobre a cascata genética de inibição da proliferação e/ou de morte de células residentes no tecido adiposo são possibilidades emergentes na prevenção desta doença (ARTAZA et al., 2010; DUCLOUX et al., 2011; CHRISTAKOS et al., 2013; SERGEEV, 2016).

A vitamina D é descrita como inibidora de proliferação de células-tronco mesenquimais e indutora de apoptose em diversos tipos celulares, incluindo os adipócitos (SERGEEV, 2009; ARTAZA et al., 2010; CHAKRABORTI, 2011; BRAKTA et al., 2015; SERGEEV, 2016). Assim, o uso

de vitamina D, em sua forma de hormônio principalmente, pode ser uma boa estratégia para a prevenção da obesidade.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

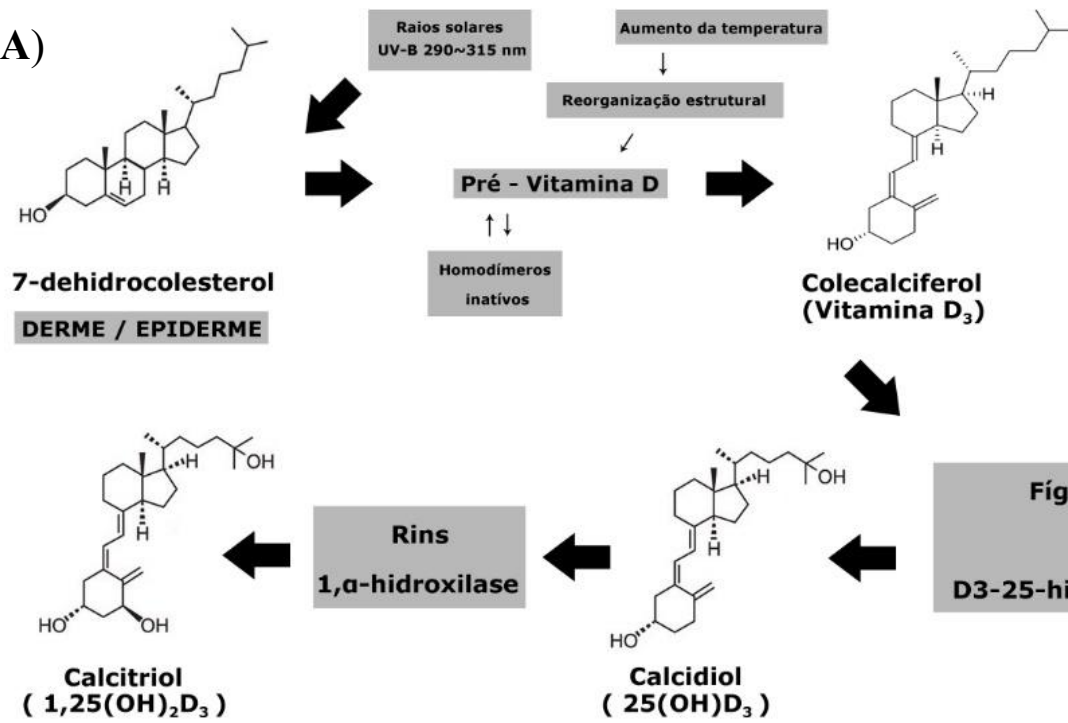
2.1 Vitamina D: Aspectos gerais relacionados ao tema da pesquisa

2.1.1 Síntese detalhada: Da produção endógena/alimentação até o hormônio bioativo

A produção endógena de vitamina D é mediada pela conversão do 7-dehidrocolesterol em vitamina D₃ por meio de fotorreação que ocorre na derme e na epiderme. Para tanto, a luz ultravioleta deve conjugar a estrutura molecular do 7-dehidrocolesterol para que se forme a pré-vitamina D₃. Essa, após ser produzida, poderá dar origem a uma série de homodímeros bio-inativos. Mais tarde, a pré-vitamina D₃ se converterá em vitamina D₃ (colecalfiferol) pela reorganização química estrutural ocasionada pelo aumento de temperatura (Figura 1A). Outra forma de obtenção da vitamina D é por meio de difusão simples que acontece na região proximal do intestino delgado, nos enterócitos, quando essa vitamina é ingerida na alimentação e/ou suplementada, tanto em sua forma de Colecalciferol como em sua forma de Ergocalciferol (Figura 1B). No entanto, independentemente da forma de obtenção, ao alcançar a corrente sanguínea, o colecalfiferol e o ergocalciferol são transportados para o fígado e no retículo endoplasmático, são convertidos em 25-hidroxitamina D₃ (Calcidiol; 25(OH)D₃) pela ação da enzima D3-25-hidroxilase (25-OHase). Por fim a 25(OH)D₃ é convertida, nas mitocôndrias dos túbulos contorcidos proximais dos rins, em seu hormônio bioativo 1,25-hidroxitamina D₃ (Calcitriol; 1,25(OH)₂D₃) pela ação da enzima 1- α hidroxilase (Figura 1A, 1B) (HOLLANDER; MURALIDHARA; ZIMMERMAN, 1978; OMDAHL et al., 2001; OMDAHL; MORRIS; MAY, 2002; PREMAOR; FURLANETTO, 2006; BERRY et al., 2012; HOLICK, 2017).

O transporte plasmático do Calcitriol ocorre mediado pela Proteína de Ligação à vitamina D (*Vitamin D Binding Protein – DBP*) (BIKLE et al., 1986). No entanto, para o desencadeamento das suas ações/benefícios, o Calcitriol se ligará ao receptor nuclear de vitamina D (*Vitamin D Receptor – VDR*) presente em diversas células do organismo e codificado por um gene de mesmo nome (BURAS et al., 1994; HANNAH; NORMAN, 1994; HAUSSLER et al., 1998; ERBEN, 2001) incluindo os adipócitos (MUTT et al., 2014).

A)



B)

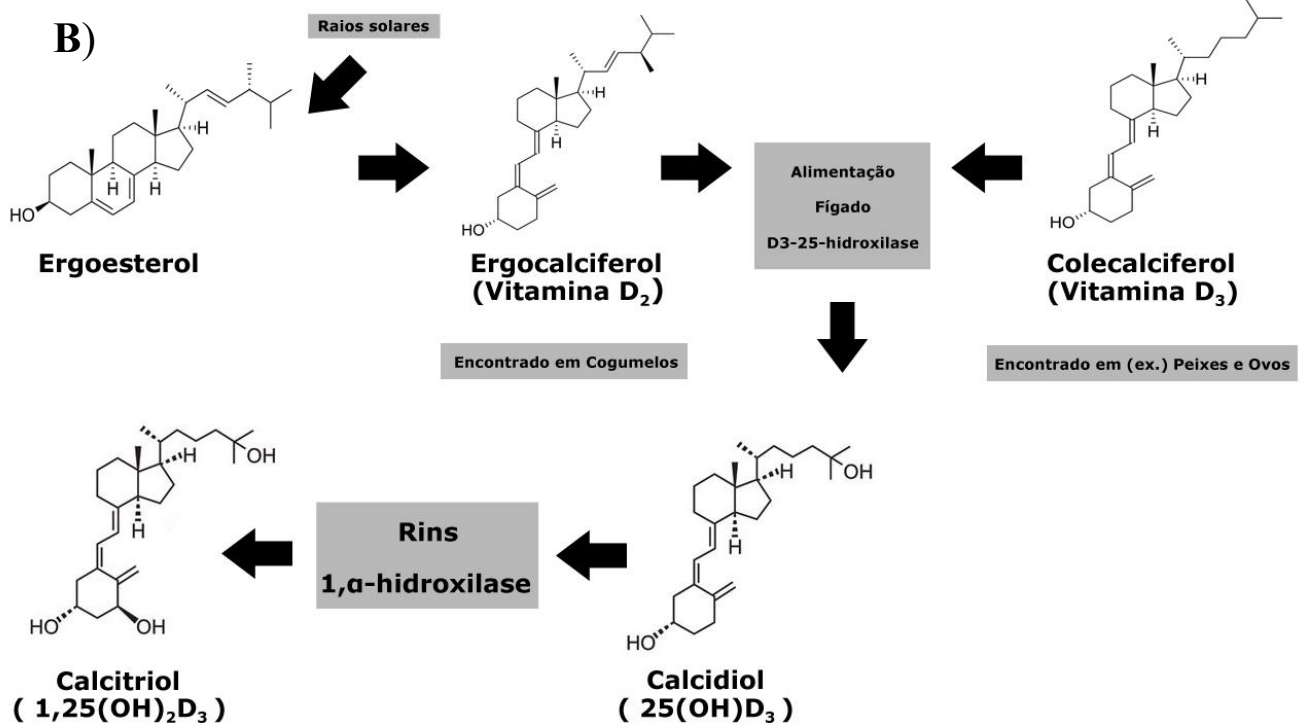


Figura 1 – Síntese da Vitamina D. Por produção endógena (A) e adquirida por ingestão (B). As imagens demonstram, sumariamente, o processo extremamente regulado que ocorre com o 7-deidrocolesterol, Ergocalciferol e com o Colecalciferol para que atinjam sua forma de hormônio bioativo (Calcitriol) no organismo humano. Adaptado de Adela et al. (2016).

2.1.2 Avaliação sérica, níveis ideais e toxicidade

Atualmente, o método mais comum para a avaliação sérica de vitamina D ocorre por meio da quantificação de Calcidiol, justamente pela maior estabilidade deste composto e menor potencial de degradação do que o Calcitriol. Os níveis ideais de vitamina D sérica são constantemente redefinidos pela literatura à medida que novas pesquisas comprovam os potenciais modulatórios do Calcitriol pelo organismo da vitamina D. De acordo com (HOLICK, 2017), até o ano de 1998, data em que pouco se estudava sobre os efeitos sistêmicos e modulatórios do Calcitriol e acreditava-se que sua deficiência resultava em falta de fixação do cálcio nos ossos, levando ao raquitismo, os valores séricos de referência considerados deficientes eram aqueles abaixo de 10 ng/mL e que valores considerados tóxicos eram aqueles acima de 80 ng/mL (RIZZOLI et al., 1994). Ao longo dos anos seguintes e com o crescente interesse nas atividades modulatórias do Calcitriol em várias partes do organismo, um constante debate em torno dos níveis séricos ideais foi iniciado. Por exemplo, Mahon et al. (2003) realizaram uma pesquisa que visou investigar a suplementação de vitamina D em pacientes com esclerose múltipla. Pelo fato de a esclerose múltipla reduzir a produção de citocinas anti-inflamatórias (KILLESTEIN et al., 2001) e de a vitamina D ter potencial para modular o sistema imune (BHALLA et al., 1983), foi identificado que níveis séricos ideais que variavam entre 40 e 100 ng/mL aumentavam as concentrações séricas de TGF- β 1, importante citocina anti-inflamatória que pode inibir efeitos da esclerose múltipla em modelo experimental animal (MAHON et al., 2003) e em humanos (PIERROT-DESEILLIGNY; SOUBERBIELLE, 2017). Em outro estudo, Zittermann (2003) propôs que, para a maioria das doenças em que existe possibilidade de modulação benéfica pelo Calcitriol, os níveis ideais também seriam aqueles entre 40 e 100 ng/mL. O autor ainda vai além, citando que valores até 5,2 ng/mL são considerados deficientes e podem ocasionar hiperparatireoidismo e raquitismo, valores entre 5,3 e 20 ng/mL são considerados insuficientes e podem ocasionar baixa absorção de cálcio intestinal e redução de densidade óssea, valores entre 20,1 e 40 ng/mL entram na faixa da hipovitaminose D e podem

interferir na homeostasia do paratormônio. Contudo, em 2011, um guia elaborado pela Sociedade de Endocrinologia (HOLICK et al., 2011) determinou que valores abaixo de 20 ng/mL seriam valores deficientes em vitamina D, valores entre 21 e 29 ng/mL seriam valores insuficientes e valores entre 40 e 60 ng/mL seriam os considerados ideais. Estes valores citados por Holick et al. (2011) são atualmente admitidos como valores referência, mas, com uma observação, espera-se que o nível sérico suficiente seja aquele de pelo menos 30 ng/mL, objetivando os valores ideais de 40 a 60 ng/mL (HOLICK, 2017).

Os níveis séricos de vitamina D considerados tóxicos também são amplamente discutidos e contraditórios. Por exemplo, Rizzoli et al. (1994) concluíram que níveis séricos superiores a 80 ng/mL poderiam ser considerados tóxicos e estavam associados a hipercalcemia. Em um estudo que avaliou a segurança da suplementação de concentrações baseadas em Unidades Internacionais Diárias (UI/d) de vitamina D, Hathcock et al. (2007) demonstraram que não houve toxicidade em pacientes com níveis séricos abaixo de 200 ng/mL. Já Holick (2009) recomenda monitoramento constante de níveis de cálcio para indivíduos com valores séricos de vitamina D superiores a 150 ng/mL. Apesar de alguns autores encontrarem correlação com alguns tipos de câncer quando o indivíduo possui valores séricos de vitamina D superiores a 40 e 60 ng/mL (MANSON; MAYNE; CLINTON, 2011), atualmente admite-se que a intoxicação severa é rara e só pode ocorrer quando há suplementação de grandes quantidades de vitamina D por longos períodos e sem interrupção (HOLICK, 2017).

2.1.3 Deficiência

A deficiência de vitamina D em escala global é reportada há pelo menos 17 anos (GANNAGE-YARED; TOHME; HALABY, 2001; VIERUCCI et al., 2017). Estudos realizados na Europa, América do Norte, América Latina, Ásia, África, Oriente Médio e Oceania, relatam importante deficiência de vitamina D em amostras populacionais sejam elas de crianças, adultos ou idosos. Ainda, essas extensas pesquisas sugerem que o quadro de deficiência dessa vitamina não está restrito a uma determinada faixa etária e/ou grupo populacional (LIPS, 2001; PETTIFOR, 2004; SNIJDER et al., 2005; VUPPUTURI et al., 2006; SIDDIQUI; KAMFAR, 2007; GOZDZIK et al., 2008; WOO et al., 2008; UNGER et al., 2010; DALY et al., 2012; FIGUIREDO-DIAS et al., 2012; PESARINI et al., 2017; VIERUCCI et al., 2017). Até mesmo no Brasil, país considerado privilegiado pela alta incidência solar anual, há deficiência generalizada na população (UNGER

et al., 2010; PESARINI et al., 2017). Contudo, a maior preocupação é com os indivíduos obesos e com Síndrome Metabólica, visto que estes possuem níveis séricos de vitamina D extremamente baixos (SUN; MORRIS; ZEMEL, 2008; CERIT, 2017; WALSH; BOWLES; EVANS, 2017).

Este cenário de deficiência global continua a progredir mesmo com alertas e recomendações de suplementação realizadas ao longo da última década (HOLICK et al., 2011; NAIR; MASEEH, 2012; HOSSEIN-NEZHAD; HOLICK, 2013; HOLICK, 2017). Devido à importância de que se mantenham níveis séricos ideais de Calcitriol no organismo, Naeem (2010) propõe que a conscientização de agentes da saúde e a população, para que se obtenham resultados benéficos a longo prazo, deve se iniciar pelas instituições de saúde governamentais atuando nas alterações das políticas de fortificação de alimentos, divulgação da importância da avaliação sérica de Calcidiol e, principalmente, a recomendação de exposição solar/suplementação.

2.1.4. Prováveis implicações na saúde relacionadas à deficiência de vitamina D ou à ocorrência de polimorfismos no gene VDR (codificador de receptor de vitamina D)

A deficiência de Calcidiol, consequentemente deficiência de Calcitriol, pode culminar em importantes impactos na saúde dos seres humanos, devido sua baixa biodisponibilidade sérica. Porém, em alguns casos, implicações na saúde decorrentes da vitamina D não estão diretamente ligadas à sua biodisponibilidade, e sim à codificação de seu receptor nuclear (VDR). Pesquisas recentes demonstram que polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), que podem ocorrer no gene VDR, estão relacionados a susceptibilidade e severidade de melanoma, síndrome do ovário policístico e até mesmo um elevado risco de se desenvolver obesidade (AL-DAGHRI et al., 2014; CAUCI et al., 2017; SIDDAMALLA et al., 2017)

Em relação a doenças, distúrbios ou disfunções importantes decorrentes ou associadas à deficiência ou insuficiência de níveis séricos de vitamina D, podemos citar além do raquitismo, o Câncer de mama (WELSH, 2017), incidência de asma em crianças e adultos (SUTHERLAND et al., 2010; HAVAN et al., 2017), a tuberculose e baixa imunidade (LUONG; NGUYEN, 2011; COLOTTA; JANSSON; BONELLI, 2017) a esclerose múltipla (PIERROT-DESEILLIGNY; SOUBERBIELLE, 2017), problemas de pele como a Síndrome de Netherton (BROWN; DE LA CERDA; STEPHEN, 2017), o autismo (VINKHUYZEN et al., 2017), a depressão e a demência (NIMITPHONG; HOLICK, 2011). Assim como nos casos de problemas genéticos, a

deficiência de vitamina D também pode ser um fator adicional para o ganho de peso, obesidade, desordens metabólicas, Síndrome Metabólica, aumento do índice de massa corporal (IMC) e do tecido adiposo (SUN; MORRIS; ZEMEL, 2008; JORDE et al., 2010; NAEEM, 2010; LEBLANC et al., 2012; AUTIER et al., 2014; THEODORATOU et al., 2014; BARJA-FERNANDEZ et al., 2017; CORDEIRO et al., 2017a; CORDEIRO et al., 2017b; GODALA et al., 2017). Tendo em vista os fatos acima citados, associados ao aumento do índice de sedentarismo e uma menor exposição solar, podemos considerar que a vitamina D em baixos níveis séricos é fator agravante para o aumento do número de obesos, em escala global (NG et al., 2014; HIBLER et al., 2016).

2.1.5 Obesidade, adipogênese e a vitamina D

A obesidade, considerada a “doença do século 21”, possui mais de 60 comorbidades que levam a todos os tipos de causa de morte (ROSSNER, 2002; COREY; KAPLAN, 2014). Estudos revelam um aumento na incidência de, por exemplo, infarto, a hipertensão e a insuficiência cardíaca, sendo essas associadas ao perfil lipídico alterado (ZITTERMANN; GUMMERT, 2010; BEVERIDGE; WITHAM, 2013).

O IMC, índice que determina obesidade em seres humanos, também está associado a baixos níveis de vitamina D (LAGUNOVA et al., 2009; VANLINT, 2013). Os dados aqui citados corroboram o estudo de Scragg (1981) que relata um maior número de óbitos por problemas cardiovasculares no inverno, período em que há a menor produção de vitamina D decorrente da menor exposição solar.

Por muito tempo, acreditou-se que adultos apresentariam número fixo de adipócitos e que mudanças na massa adiposa eram principalmente secundárias a alterações no volume de gordura na célula. Não obstante, adipócitos adultos exibem renovação notavelmente intensa e constante. Logo, atualmente, sabe-se que o potencial de gerar novas células persiste durante toda a vida do indivíduo e os adipócitos provêm de células-tronco mesenquimais multipotentes, residentes no estroma do tecido adiposo. Células-tronco mesenquimais são células caracterizadas como células de plasticidade multipotente e podem ser isoladas de diversos tecidos do corpo humano, como por exemplo a polpa do dente e a gordura (ULLAH; SUBBARAO; RHO, 2015). Ainda, no tecido adiposo, podemos localizar uma grande quantidade de células-tronco mesenquimais se compararmos com outros locais de obtenção (BUNNELL et al., 2008).

Essas células multipotentes tornam-se pré-adipócitos quando perdem a habilidade de se diferenciar em outras linhagens mesenquimais (SPALDING et al., 2008; QUEIROZ et al., 2009). Assim sendo, pode-se inferir que o tecido adiposo aumente no organismo não somente por hipertrofia ao longo da vida em pessoas saudáveis e/ou em portadores de doenças como a obesidade, mas, também em função do aumento do número de células e até a ocorrência de hiperplasia. Frente ao exposto, e sabendo que a obesidade é uma importante questão de saúde pública que determina altos gastos no SUS, principalmente, em função das complicações decorrentes da mesma, há que se lançar mão de novos conhecimentos que possam ser mais efetivos em especial na prevenção dessa enfermidade visto que os tratamentos atuais requerem maior eficiência e os cirúrgicos além de invasivos e de alto custo, podem ter o seu tempo de eficiência reduzido caso os pacientes não criem novos hábitos saudáveis (COSTA et al., 2010; CAMBI; MARCHESINI; BARETTA, 2015).

As atuais medidas adotadas para o combate de obesidade se mostraram ineficazes, segundo a Associação Médica Americana (AMA; *American Medical Association*). Esse fato levou a AMA classificar, oficialmente, a obesidade como uma doença crônica não transmissível. Assim, temos um cenário onde a obesidade nas populações necessita de mais atenção e por isso muitos pesquisadores buscam novas terapias para o seu tratamento. Diante desta importante questão de saúde pública, que se agrava ano após ano sem perspectiva de melhora, podemos dizer que esta doença é de certa forma negligenciada.

Estudos recentes discutem a possibilidade da atuação da vitamina D no tratamento da obesidade (SERGEEV, 2009; DUCLOUX et al., 2011; CHRISTAKOS et al., 2013). A indução da morte celular por apoptose dos adipócitos está emergindo como uma estratégia promissora para o enfrentamento da obesidade, pois sabe-se que a perda de peso resulta não apenas do decréscimo no tamanho dos adipócitos, mas também na redução do número destas células. Desta forma, entende-se que um aumento na frequência, por exemplo, da apoptose em células adiposas reduzirá o acúmulo deste tipo de tecido e ao longo do tempo pode levar a redução efetiva da gordura corporal, além de poder contribuir na manutenção da perda de peso (QUEIROZ et al., 2009; CHRISTAKOS et al., 2013).

O desencadeamento da apoptose em células humanas pela forma hormonal da vitamina D é mediado por múltiplas vias de sinalização que envolvem proteínas e enzimas reguladoras de cálcio (CHRISTAKOS et al., 2013). Uma das vias mais interessantes e promissoras indica que

a morte celular por apoptose pode ocorrer por um aumento da concentração de cálcio intracelular, o qual atinge níveis elevados, e ativam proteases apoptóticas cálcio-dependentes (SERGEEV, 2005).

A relação do Calcitriol com o cálcio também foi explorada por Song e Sergeev (2012) onde foi demonstrado que o Calcitriol induz um aumento prolongado da concentração de cálcio intracelular e esse aumento é diretamente proporcional ao aumento das proteases caspases dependentes de cálcio, as colpains, que quando ativadas são suficientes para desencadear a apoptose. Enquanto baixas concentrações (1-10 nM) de Calcitriol não possuem efeito citotóxico, concentrações superiores a 100 nM apresentam este potencial, como demonstrado por Valle; Almalki e Agrawal (2016). Contudo, sabe-se que o programa de diferenciação de células-tronco mesenquimais em adipócitos envolve diferentes estágios ao longo de quatro a sete dias.

A atuação de agentes pró-diferenciação inicia o processo de diferenciação celular das ADSCs em pré adipócitos e, posteriormente, em adipócitos maduros. Esta etapa inicia-se pela expressão dos genes *C/EBP β* e *C/EBP δ* , seguidos por um aumento na expressão dos genes *C/EBP α* e *PPAR γ* que iniciam a cascata gênica para codificarem proteínas específicas do processo de diferenciação celular (KONG; LI, 2006). Concomitantemente à expressão gênica em cascata descrita, há também o aumento da expressão do gene *VDR*, e essa disponibilidade do gene receptor da vitamina D possibilita a influência do Calcitriol no processo de diferenciação dos pré-adipócitos em adipócitos (WOOD, 2008).

Pode-se assim subentender que havendo uma disponibilidade adequada de cálcio e vitamina D tanto nas células adjacentes indifirenciadas quanto no período de diferenciação dos adipócitos, pode ocorrer morte celular, sendo a vitamina D um potente fator nesse evento e, portanto, a suplementação de calcitriol pode ser um importante hormônio capaz de gerar formas de prevenção da obesidade.

Diante do exposto o presente estudo correlacionou os níveis séricos de 25(OH)D3, de uma amostra de indivíduos da população do Sul do Brasil, com variáveis relacionadas a distúrbios metabólicos, obesidade e hábitos de vida, bem como, avaliou o efeito citotóxico do Calcitriol em células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (ADSCs)

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Correlacionar os níveis séricos de vitamina D com fatores que estão relacionados à obesidade em um grupo de voluntários da população do Sul do Brasil bem como avaliar o potencial citotóxico do Calcitriol em células tronco mesenquimais extraídas do tecido adiposo humano.

3.2 Objetivo específico

Classificar os resultados das concentrações séricas de vitamina D dos indivíduos em modelos suficientes e insuficientes;

Realizar, com a concentração de vitamina D sérica como variável dependente, regressão linear univariada com as concentrações séricas de ácidos graxos livres, colesterol HDL (HDL-c), triglicérides, glicose, colesterol LDL (LDL-c) bem como com a circunferência da cintura, o IMC, a porcentagem de gordura corporal além do hábito de praticar atividade física, exposição solar (local de trabalho), idade e uso de protetor solar para ambos os modelos (suficientes/insuficientes);

Realizar, com a concentração de vitamina D sérica como variável dependente, regressão multivariada com as concentrações séricas de ácidos graxos livres, colesterol HDL (HDL-c), triglicérides, glicose, colesterol LDL (LDL-c) bem como com a circunferência da cintura, o IMC, a porcentagem de gordura corporal além de hábito de praticar atividade física, exposição solar (local de trabalho), idade e uso de protetor solar para ambos os modelos (suficientes/insuficientes);

Realizar, com a concentração de vitamina D sérica como variável dependente, correlação no modelo de *Pearson* indicando gráficos de dispersão com as concentrações séricas de ácidos graxos livres, colesterol HDL (HDL-c), triglicérides, glicose, colesterol LDL (LDL-c) bem como com a circunferência da cintura, o IMC, a porcentagem de gordura corporal além do hábito de praticar atividade física, exposição solar (local de trabalho), idade e uso de protetor solar para ambos os modelos (suficientes/insuficientes);

Realizar avaliação do potencial de citotoxicidade do Calcitriol em células-tronco extraídas do tecido adiposo humano a fim de obter a concentração inibitória de viabilidade celular que atinja 50% das células.

4. MANUSCRITO

A presente pesquisa gerou um artigo científico submetido e aceito no periódico internacional ***Biomedicine & Pharmacotherapy***, que possui fator de impacto **JCR 2.759** sendo atualmente classificado como **Qualis Capes A2 Interdisciplinar**.

PESARINI, J. R.; OLIVEIRA, R. J.; PESSATTO, L. R.; ANTONIOLLI-SILVA A. C. B. M.; FELICIDADE, I.; NARD, N. B.; CAMASSOLA, M.; MANTOVANI, M. S.; RIBEIRO, L. R. Vitamin D: Correlation with biochemical and body composition changes in a southern Brazilian population and induction of cytotoxicity in mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue. **Biomed Pharmacother**, v. 91, p. 861-871, 2017.



Available online at
ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com/en



Original article

Vitamin D: Correlation with biochemical and body composition changes in a southern Brazilian population and induction of cytotoxicity in mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue



João Renato Pesarini^{a,b,c}, Rodrigo Juliano Oliveira^{b,c,d,*}, Lucas Roberto Pessatto^{c,d,e},
 Andréia Conceição Milan Brochado Antonioli-Silva^{b,c}, Ingrid Felicidade^f,
 Nance Beyer Nardi^g, Melissa Camassola^g, Mário Sérgio Mantovani^d,
 Lúcia Regina Ribeiro^{a,f}

^a São Paulo State University (UNESP), Graduate Programme in Cellular and Molecular Biology, Institute of Biosciences of Rio Claro (IBRC), Rio Claro, São Paulo, Brazil

^b Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS), Graduate Programme in Health and Development in the Central-West Region, School of Medicine (FAMED), Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil

^c Stem Cell, Cell Therapy and Toxicological Genetics Research Centre (CeTroGen), "Maria Aparecida Pedrossian" University Hospital, Brazilian Hospital Services Company (EBSEH), Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil

^d State University of Londrina (UEL), Graduate Programme in Genetics and Molecular Biology, Department of General Biology, Londrina, Paraná, Brazil

^e Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS), MSc Programme in Pharmacy, Centre for Biological and Health Sciences (CCBS), Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil

^f São Paulo State University (UNESP), Graduate Programme in Pathology, School of Medicine of Botucatu, Botucatu, São Paulo, Brazil

^g Lutheran University of Brazil (ULBRA), Graduate Programme in Cellular and Molecular Biology Applied to Health, Canoas, Rio Grande do Sul, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 March 2017

Received in revised form 28 April 2017

Accepted 2 May 2017

Keywords:

Vitamin D deficiency
 Calcitriol
 Obesity
 Stem cells
 Population characteristics

ABSTRACT

Studies have shown that metabolic disorders, serum inflammatory markers and weight gain (obesity) are correlated with vitamin D deficiency. Therefore, the present study correlated the serum calcitriol (s25 (OH)D₃) levels in a sample of individuals from southern Brazil with variables related to metabolic disorders, obesity and lifestyle habits and assessed the cytotoxic effect of calcitriol on adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (ADSCs). The results showed a 79.23% prevalence of hypovitaminosis D in the study population and a correlation ($p < 0.05$) between a low serum vitamin D concentration and an elevated low-density lipoprotein cholesterol (LDL-c) level. Univariate linear regression analysis using 25 (OH)D₃ as a regressor showed a negative association ($p < 0.05$) with an indoor work environment ($\beta = -2.305$), increased body fat ($\beta = -0.095$), age ($\beta = -0.065$) and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-c; $\beta = -0.109$). An *in vitro* 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay performed with ADSCs using five calcitriol concentrations (15.625, 31.25, 62.5, 125 and 250 nM) indicated cytotoxic potential ($p < 0.05$) at the 62.5 nM concentration at 48 and 72 h and at the 125 and 250 nM concentrations at 24, 48 and 72 h. The results reported herein corroborate one another and suggest a key association between vitamin D deficiency and the development of obesity because ADSCs are involved in adipose tissue hyperplasia and differentiate into adipocytes that can sequester the bioavailable vitamin D necessary for homeostasis.

© 2017 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Vitamin D has become a research study focus primarily because it modulates functions related to bone health [1,2], tumour development [3–5] and metabolic disorders [6–9].

* Corresponding author at: Medicine College, Federal University of Mato Grosso do Sul, Cidade Universitária, S/N Campo Grande, MS, 79070-900, Brazil.
 E-mail address: rodrigo.oliveira@ufms.br (R.J. Oliveira).

One of the various forms of vitamin D is vitamin D₃ (cholecalciferol), which can be produced through sun exposure (endogenous production) and ingested/supplemented. Therefore, vitamin D₃ may be the most studied vitamin in medicine because it is widely used as a supplement in hypovitaminosis D cases. Through a regulated process in the body, circulating vitamin D₃ is converted to the bioactive vitamin D hormone, which is best known as calcitriol (1,25(OH)₂D₃). For this purpose, vitamin D₃ undergoes a hydroxylation process that primarily occurs in the liver; this process is mediated by the 25-hydroxylase enzyme, which causes the conversion to calcidiol (25(OH)D₃). Subsequently, the second hydroxylation mostly occurs in the kidneys and is, in turn, mediated by the 1 α -hydroxylase enzyme, which converts 25(OH)D₃ into 1,25(OH)₂D₃ [10–13]. However, optimal serum levels are not reached, even with the ingestion of vitamin D₃-rich foods [14]; thus, supplementation and sun exposure are needed, preferentially during the morning period [15–17].

Vitamin D deficiency, as assessed using the serum 25(OH)D₃ level, has been reported in children, adults and elderly people from all continents [18–20]. Because deficiency occurs worldwide [21,22], further population studies are needed even in countries thought to have a high annual solar incidence [23–26]. In Brazil, vitamin D deficiency is most worrying because this condition affects different groups of study subjects, including young healthy individuals and young people with metabolic disorders (e.g., patients with metabolic syndrome) [27–30].

Systematic reviews have shown that metabolic disorders, including cardiovascular disease (with an increasing incidence), high serum lipid concentrations, serum inflammatory markers, changes in glucose metabolism and weight gain, are correlated with vitamin D deficiency [9,31–33]. These parameters are related to obesity progression and being overweight in humans. Adipose tissue expansion is mediated by hypertrophy of mature adipocytes or multipotent stem cell hyperplasia during adipogenic differentiation with a subsequent triglyceride accumulation in adipose tissue [34,35]. Recently, stem cells adjacent to adipose tissue have been shown to play key roles in the adipose tissue mechanisms underlying chronic inflammation; therefore, these cells may be a key factor in an adjunct treatment for obesity prevention [36]. Thus, studies on the genetic cascade of the inhibition of the proliferation and/or death of adipose tissue cells have provided new possibilities for the prevention of this disease [37–40].

Vitamin D has been reported to be a mesenchymal stem cell proliferation inhibitor and an inducer of apoptosis in various cell types, including adipocytes [37,38,41–43]. Therefore, the use of vitamin D, especially in its hormone form, may be a good strategy to prevent obesity.

Considering the above findings, the present study correlated the serum calcidiol (s25(OH)D₃) levels in a sample of individuals from southern Brazil with variables related to metabolic disorders, obesity and lifestyle habits and assessed the cytotoxic effect of 1,25(OH)₂D₃, which is commonly found in one type of medication, on adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (ADSCs).

2. Patients and methods

2.1. Population study

2.1.1. Inclusion criteria

Adult volunteers of both genders aged from 18 to 55 years who read and signed the informed consent form and lived for at least three months in the city of Londrina, Paraná state, Brazil (Latitude: 23°18'37" South), were included in the research study. Only self-declared Caucasian individuals participated in the research study to follow the standards of similar studies [44,45] and to avoid effects from skin vitamin D production due to excess pigmentation.

The study was submitted to the Ethics Committee on Research Involving Human Subjects of the State University of Londrina (Universidade Estadual de Londrina–UEL) and approved under opinion number 116/2011.

2.1.2. Exclusion criteria

Patients with cardiovascular, gastrointestinal or kidney diseases, thyroid disorders, diabetes, haemophilia, anaemia or cancer, individuals who did not reside in the municipality of Londrina for at least three months and those who were not self-reported Caucasians were excluded from the study. Individuals who reported the chronic use of medicines to treat diabetes mellitus or dyslipidaemia or who used multivitamins in the last six months were also excluded from the study.

2.1.3. Data on the initial and final sampling

The present study was announced in the Oswaldo Cruz Laboratory (Londrina – PR) to patients waiting for the collection of their routine exams. At that time, the researcher responsible for this work invited patients to include the evaluated exams at no additional cost and explained the importance of their contribution. A total of 370 patients demonstrated an interest in participating and authorised blood collection for vitamin D and other biochemical variable dosing.

2.1.4. General data and sample collection procedures

Biological material and data on anthropometric parameters were collected over a six-month period. The collections were performed two weeks after the beginning of spring and two weeks after the end of summer in 2013.

The experiment was performed with a double-blind design. The following materials were provided to each volunteer: a standard care questionnaire, wherein personal information (name, age, gender, address, ethnicity and use of medicines) was recorded, and the shortened and modified version of the International Physical Activity Questionnaire (IPAQ; [46]). The data recorded on the latter questionnaire were based on the objectives of the study and included daily sun exposure determined by workplace specifications, sunscreen use habits and whether vigorous/moderate physical activity was performed. Additionally, the volunteer was subjected to a rapid blood glucose test (Accu-Check Active[®], Roche Diagnostics, Switzerland). If the result indicated values higher than 126 mg/dL, the subject was automatically excluded from the study and referred for medical evaluation. After this initial evaluation, the subjects were referred for biological material collection and anthropometric evaluation. The aforementioned procedures were performed in the morning from 08:00 to 10:00 AM to minimise externalities that could cause variations between the tested parameters.

2.1.5. Determination of biochemical variables

The s25(OH)D₃ values were evaluated using an automated chemiluminescence analyser (LIAISON[®], DiaSorin Diagnostics, Italy). Free fatty acids, high-density lipoprotein cholesterol (HDL-c), triglycerides and glucose were assessed using the automated enzymatic-calorimetric method (ADVIA[®] 1650, Siemens, Germany). Low-density lipoprotein cholesterol (LDL-c) was calculated using the Friedewald equation [47].

2.1.6. Anthropometric evaluation

For the anthropometric examination, the waist circumference was measured using an inelastic tape measure (Incoterm[®], Brazil). Bioelectric impedance analysis was performed using a MALTRON[®] BF-906 Body Composition Analyser (Maltron International, UK) to assess the percentage of body fat and the body mass index (BMI).

2.2. In vitro study

2.2.1. Individuals

Individuals living in Campo Grande, Mato Grosso do Sul state, Brazil (latitude: 20°26'34" South), who were referred for liposuction and scheduled for surgery were contacted and informed about the research study. Three adult female volunteers aged from 20 to 40 years who read and signed the informed consent form were selected. The study was submitted to the Ethics Committee on Research Involving Human Subjects of the Federal University of Mato Grosso do Sul (Universidade Federal de Mato Grosso do Sul-UFMS) and approved under opinion number 867.377.

2.2.2. Procedures for liposuction, lipoaspirate processing and mesenchymal stem cell culture

After the anaesthetic procedure, asepsis and antisepsis, surgical incisions of approximately 1.0 cm were made into the anterolateral abdominal wall to collect the biological material. Approximately 200 mL of saline solution without a vasoconstrictor was injected into the adipose stroma for tissue detachment. Then, the detached adipose tissue was collected using a liposuction cannula. This 0.5-cm medium-calibre cannula was coupled to a 50-mL syringe for fat collection. Approximately 300 mL of biological material was collected in a sterile container with 200 mL of phosphate-buffered solution (PBS; 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.15 g Na₂HPO₄, 0.2 g KH₂PO₄ and 1000 mL of deionised water). Shortly thereafter, the liposuction surgical procedure was performed according to the most appropriate technique for the patient. The crude lipoaspirate of each patient was only stored to collect the data for the present study and was later discarded in a biohazard waste container, followed by hospital waste disposal. For the processing of each of the three lipoaspirate samples, collagenase was used for sample digestion as described by Markarian, Frey, Silveira, Chem, Milani, Ely, Horn, Nardi and Camassola [48] with modifications. Culture medium was composed of Dulbecco's modified Eagle's medium with 10 mM HEPES (HDMEM; Sigma[®] catalogue number D5523) supplemented with 10% foetal bovine serum.

The immunophenotype was characterised by flow cytometry. Cells were incubated with antibodies against phycoerythrin or fluorescein isothiocyanate-conjugated antibodies specific for human CD44, CD90, CD29, CD34, CD11b and major histocompatibility complex (MHC) II (PharMingen BD, USA) for 30 min at 4 °C. Control samples were incubated in the absence of antibodies. The cells were analysed on an ACCURI C6 (Becton Dickinson, USA). The characterisation graphs were generated with the capture of 10,000 events using the standard software for the equipment (BD ACCURI C6 software; Becton Dickinson, USA).

2.2.3. Adipogenic differentiation

Cell samples from the three patients were subjected to the adipogenic differentiation process at the fifth passage. To induce differentiation, 1.0×10^5 cells were seeded into 6-well culture plates; after cell adhesion (24 h), the cells were cultured in adipogenesis-inducing medium according to Markarian, Frey, Silveira, Chem, Milani, Ely, Horn, Nardi and Camassola [48] with modifications. In summary, 0.714 µL of insulin (Insunorm R[®], Aspen Pharma/Aspen Brazil, 0.35 mg/mL), 100 µM indomethacin (0.0447 g indomethacin, Sigma[®] catalogue number I7378, in 5 mL of dimethyl sulfoxide (DMSO)), 3.5 µM rosiglitazone (0.0089 g of rosiglitazone, Sigma[®] catalogue number R2408, in 5 mL of DMSO) and 10^{-5} M dexamethasone (Sigma[®] catalogue number D4902) were used for every 1 mL of HDMEM supplemented with 20% foetal bovine serum. All solutions were stored in a freezer except for indomethacin, which was stored at room temperature. The differentiation medium was prepared on the day of use.

The differentiation medium was changed every 72 h [49,50], and the differentiation process lasted 14 days [51,52].

After the differentiation medium was discarded, the cells were fixed for 60 min at room temperature with 10% formaldehyde. Then, the cells were washed with isopropanol (60%) and subsequently incubated with Oil red O (Sigma[®] catalogue number O0625) for 20 min at room temperature to detect intracellular lipid accumulation. The excess dye was removed by washing with distilled water.

2.2.4. Osteogenic differentiation

The cells were cultured as described above for the adipogenic induction. However, the cells were grown in their own medium for osteogenic differentiation, as described by Markarian, Frey, Silveira, Chem, Milani, Ely, Horn, Nardi and Camassola [48], with modifications.

In total, 79.9 mL of HDMEM supplemented with 10% foetal bovine serum, 100 µL of ascorbic acid solution (50 mg of ascorbic acid 2-phosphate, Sigma[®] catalogue number A8960, in 10 mL of HDMEM), 100 mL of β-glycerophosphate stock solution (630 mg of β-glycerophosphate, Sigma[®] catalogue number G9891, in 20 mL of HDMEM) and 10 mL of foetal bovine serum was used to prepare the osteogenic induction medium.

The differentiation medium was changed every 72 h for four weeks. Osteogenic differentiation was demonstrated by the observation of calcium deposits stained with Alizarin Red (Sigma[®] catalogue number A5533) as described by Markarian, Frey, Silveira, Chem, Milani, Ely, Horn, Nardi and Camassola [48].

2.2.5. Chondrogenic differentiation

The cells were cultured as described for the adipogenic and osteogenic induction methods. After cell adhesion, the HDMEM supplemented with 10% foetal bovine serum was discarded, and the cells were cultured using a STEMPRO chondrogenic differentiation kit (Gibco[®] Life Technologies, catalogue number A1007101) according to the manufacturer's instructions for 21 days. The culture medium was changed every three days.

After the differentiation medium was discarded, the cells were fixed for 30 min at room temperature with a paraformaldehyde solution (4%). Then, the cells were washed twice with PBS and stained with Alcian Blue (Neon Commercial[®], Brazil, catalogue number 74240) for 5 min at room temperature; excess dye was removed by washing with distilled water [53]. Differentiation was confirmed by the presence of a glycosaminoglycan-rich extracellular matrix on the 21st day.

2.2.6. Test substance: 1,25(OH)₂D₃

The commercial product Calcijex[®] (Abbott Pharmaceuticals, USA; 1,25(OH)₂D₃, 1 µg/mL) was used to assess cell viability (cytotoxic potential). This drug was chosen because it could be easily purchased from several locations worldwide, which facilitated its use in treatments.

2.2.7. MTT assay

The 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay was performed as described by Mosmann [54] with modifications [55]. Cells from the three patients were seeded (7×10^3 cells/well, five wells per treatment) in 96-well culture plates. After a 24-h stabilisation period, the cells were separated into six groups as follows: a control group incubated with HDMEM (supplemented with 10% foetal bovine serum) alone and five treatment groups incubated with five 1,25(OH)₂D₃ concentrations (15.625, 31.25, 62.5, 125 and 250 nM) for 24, 48 and 72 h. At the end of the treatment periods, the treatment media were removed, and the cells were incubated at 37 °C with a mixture containing MTT (Invitrogen[®] catalogue number M6494; 0.005 g of MTT, 5 mL of

PBS and 10 mL of HDMEM without FBS supplementation) for 4 h. Then, the MTT mixture was removed and replaced with 200 μ L of dimethyl sulfoxide (DMSO) in each well to dissolve the product (formazan crystals). Readings were performed in a spectrophotometer with a 570-nm filter. Cell viability (expressed as a percentage) was calculated according to the following formula:

$$\text{Cell Viability(\%)} = \frac{\text{Mean Absorbance of the treatment group}}{\text{Mean Absorbance of the group without treatment}} \times 100$$

2.3. Statistical analysis

The subjects of the population study were classified according to their s25(OH)D₃ levels as vitamin D-sufficient (≥ 30 ng/mL) or vitamin D-insufficient/deficient (< 30 ng/mL) subjects [24,56]. Descriptive analysis data were expressed as the mean $\pm$ standard error of the mean (SEM) or n/%, and both groups were compared using the Mann-Whitney test. Each group was separately fitted to the univariate linear regression model to examine the potential of each regressor and the behaviour of both groups when s25(OH)D₃ was used as the dependent variable. Then, the full multiple regression model was analysed by variable using a stepwise procedure. For each group, only the variables that actually contributed to a good model fit were included to provide a reduced model. Scatter plots were generated, and Pearson's correlation coefficients were calculated for s25(OH)D₃ and the clinical-laboratory and categorical variables selected after the stepwise procedure. The significance level adopted for all tests was 0.05. All tests were performed in R software 2.15.0 (R, 2011).

The MTT assay results were expressed as the percentage $\pm$ SEM. The statistical analysis was performed using analysis of variance (ANOVA)/Bonferroni's correction, with different letters indicating significant differences ($p < 0.05$; GraphPad Prism 5). A non-linear regression curve analysis was performed using the results from the test with the five 1,25(OH)₂D₃ concentrations (OriginPro[®] 2016) to determine the half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of 1,25(OH)₂D₃.

3. Results

3.1. Population study

The subjects were categorised according to their s25(OH)D₃ levels. A total of 79.23% of the sample consisted of vitamin D-deficient subjects (s25(OH)D₃ < 30 ng/mL), and 20.77% of the sample consisted of vitamin D-sufficient subjects (s25(OH)D₃ ≥ 30 ng/mL; Table 1). The mean vitamin D concentration was 21.06 ± 0.34 ng/mL for subjects with a s25(OH)D₃ concentration < 30 ng/mL and 35.77 ± 0.63 ng/mL for subjects with a s25(OH)D₃ concentration ≥ 30 ng/mL. These serum concentrations were significantly different ($p < 0.001$) and were similar to the plasma LDL-c levels, which were 113.48 ± 1.96 mg/dL in the s25(OH)D₃ < 30 ng/mL group and 98.41 ± 3.48 mg/dL in the s25(OH)D₃ ≥ 30 ng/mL group ($p < 0.001$). A high coefficient of variation was observed for these and all other tested variables, indicating sample heterogeneity (Table 1).

A univariate regression analysis was performed for all variables tested according to the categorisation model. Table 2 outlines the parameter estimates, the confidence intervals of these estimates and the p -value of Student's t -test for the slope of the linear regression model for the s25(OH)D₃ < 30 ng/mL subjects. For this group, the following variables were significant: sun exposure (indoor work environment) ($p = 0.001$), age ($p = 0.032$), body fat percentage ($p = 0.013$) and HDL-c plasma level ($p < 0.001$). Similarly, a univariate linear regression analysis was performed for the s25(OH)D₃ ≥ 30 ng/mL subjects (Table 3). However, no variables were significant in this regression model.

Subsequently, the variables best fitted to each categorisation model were selected. For this purpose, variables were selected from the full model using a stepwise procedure to choose the variables that best predicted each model. After the selection, a multivariate regression analysis was performed for both groups. The variables ($p < 0.05$) age, BMI, HDL-c and sun exposure (indoor work environment) were selected for the s25(OH)D₃ < 30 ng/mL model (Table 4). However, no variable had significant predictability ($p < 0.05$) for the s25(OH)D₃ ≥ 30 ng/mL model (data not shown).

Table 1

Descriptive data (biochemical and anthropometric parameters) and categorization of the 337 individuals living in the city of Londrina, PR – Brazil, according to their serum calcidiol (25(OH)D₃) levels.

	s25(OH)D3 < 30 ng/mL				s25(OH)D3 ≥ 30 ng/mL				p ^a		
	n = 267				n = 70						
		Range	95% CI	CV (%)		Range	95% CI	CV (%)			
Gender (female, n/%)	189	70.80			52	74.30			0.565		
Physical activity (not performed, n/%)	234	87.60			63	90.00			0.588		
Sun exposure (indoor work environment, n/%)	169	63.30			38	54.30			0.169		
Sunscreen use (yes, n/%)	78	29.21			23	32.86			0.555		
Age (years, mean/SE)	33.34	0.69	17.00–55.00	31.98–34.70	33.80	32.37	1.13	19.00–55.00	30.12–34.62	29.13	0.929
Waist circumference (cm, mean/SE)	83.94	0.75	61.00–116.00	82.46–85.41	14.59	82.17	1.44	63.00–115.00	79.30–85.04	14.64	0.275
Body fat (% mean/SE)	31.59	0.55	12.00–54.20	30.52–32.67	28.27	30.55	0.98	14.00–48.40	28.60–32.49	26.74	0.379
BMI (kg/m ² , mean/SE)	25.33	0.28	17.10–41.00	24.77–25.88	18.16	24.82	0.52	17.40–37.00	23.79–25.85	17.49	0.442
HDL-c (mg/dL, mean/SE)	54.63	0.72	30.00–97.00	53.22–56.05	21.47	54.4	1.34	36.00–89.00	51.74–57.06	20.53	0.903
LDL-c (mg/dL, mean/SE)	113.48	1.96	39.60–220.80	109.62–117.35	28.28	98.41	3.48	36.60–167.20	91.47–105.35	29.59	<0.001
Triglycerides (mg/dL, mean/SE)	102.72	3.96	28.00–445.00	94.91–110.52	63.05	98.73	8.99	26.00–449.00	80.79–116.67	76.20	0.326
Free fatty acids (nmol/mL, mean/SE)	0.55	0.01	0.21–1.28	0.53–0.57	32.73	0.56	0.03	0.25–1.33	0.51–0.61	37.50	0.692
Glucose (mg/dL, median/SE)	90.09	0.50	57.00–115.00	89.10–91.07	9.09	88.51	1.06	60.00–109.00	86.39–90.64	10.07	0.240
25(OH)D ₃ (calcidiol; ng/mL, mean/SE)	21.06	0.34	4.09–29.90	20.39–21.73	26.54	35.77	0.63	30.00–52.70	34.52–37.03	14.73	<0.001

Comparative table of biochemical and anthropometric parameters categorized by the serum calcidiol levels.

^a Statistical analysis: Mann-Whitney ($p < 0.05$). 95% confidence interval (95% CI).

Table 2Univariate linear regression model for the subjects with an s25(OH)D₃ concentration <30 ng/mL (subjects with calcidiol serum levels below 30 ng/mL).

	β Coefficient	95% CI		p ^a
Physical activity (not performed)	−1.728	−3.768	0.312	0.097
Sun exposure (indoor work environment)	−2.305	−3.677	−0.933	0.001 ⁺
Sunscreen use (yes)	0.439	−1.044	1.923	0.560
Age (years)	−0.065	−0.125	−0.006	0.032 ⁺
Waist circumference (cm)	−0.008	−0.063	0.048	0.782
Body fat (%)	−0.095	−0.170	−0.020	0.013 ⁺
BMI (kg/m ²)	−0.097	−0.243	0.050	0.194
HDL-c (mg/dL)	−0.109	−0.165	−0.053	<0.001 ⁺
LDL-c (mg/dL)	−0.008	−0.029	0.013	0.445
Triglycerides (mg/dL)	<−0.001	−0.010	0.011	0.917
Free fatty acids (nmol/mL)	−1.917	−5.609	1.776	0.308
Glucose (mg/dL)	0.037	−0.045	0.120	0.375

^a Statistical test: Student's *t*-test.⁺ Statistically significant difference (*p* < 0.05). 95% confidence interval (95% CI).**Table 3**Univariate linear regression model for subjects with an s25(OH)D₃ concentration ≥ 30 ng/mL (subjects with calcidiol serum levels above 30 ng/mL).

	β Coefficient	95% CI		p ^a
Physical activity (not performed)	1.048	−3.165	5.260	0.621
Sun exposure (indoor work environment)	0.943	−1.588	3.475	0.460
Sunscreen use (yes)	−0.145	−2.841	2.550	0.915
Age (years)	−0.067	−0.125	−0.006	0.325
Waist circumference (cm)	−0.010	−0.116	0.096	0.857
Body fat (%)	0.083	−0.072	0.237	0.291
BMI (kg/m ²)	−0.030	−0.324	0.264	0.842
HDL-c (mg/dL)	0.008	−0.106	0.122	0.886
LDL-c (mg/dL)	−0.017	−0.060	0.027	0.446
Triglycerides (mg/dL)	−0.006	−0.023	0.011	0.468
Free fatty acids (nmol/mL)	−1.284	−7.374	4.807	0.675
Glucose (mg/dL)	0.043	−0.100	0.186	0.552

^a Statistical test: Student's *t*-test (*p* < 0.05). 95% confidence interval (95% CI).**Table 4**Multivariate linear regression model for subjects with an s25(OH)D₃ concentration < 30 ng/mL (subjects with calcidiol serum levels below 30 ng/mL).

	β Coefficient	95% CI		p
<i>s25(OH)D₃ < 30 ng/mL model</i>				
<i>p</i> < 0.05 ⁺				
Age (years)	−0.076	−0.141	−0.010	0.02 ⁺
BMI (kg/m ²)	−0.213	−0.376	−0.050	0.01 ⁺
HDL-c (mg/dL)	−0.104	−0.159	−0.049	<0.001 ⁺
Glucose (mg/dL)	0.108	0.015	0.202	0.02 ⁺
Sun exposure (indoor work environment)	−2.593	−3.933	−1.253	<0.001 ⁺

Statistical test: Multivariate regression model using significant variables for the serum 25(OH)D₃ < 30 ng/mL group, wherein the 95% CI means the 95% confidence interval and *p* is the *p*-value of the model variable.⁺ Statistically significant difference (*p* < 0.05).

Pearson's correlation analysis and an analysis using scatter plots were performed with the variables used in the multivariate regression analysis. The variables age (*r* = −0.131, *p* < 0.05), BMI (*r* = −0.080, *p* < 0.05), HDL-c (*r* = 0.229, *p* < 0.001) and sun exposure (indoor work environment) (*r* = −0.199, *p* = 0.05) were significant (Fig. 1) for the s25(OH)D₃ < 30 ng/mL model.

3.2. In vitro study

3.2.1. ADSC differentiation

The culture of undifferentiated cells and the confirmation of adipogenic, osteogenic and chondrogenic differentiation are shown in Fig. 2a–d, respectively. The accumulation of lipids stained with Oil red O is shown in Fig. 2b, whereas calcium deposits stained with Alizarin Red are shown in Fig. 2c. Conversely, the glycosaminoglycan-rich extracellular matrix stained with Alcian Blue is shown in Fig. 2d.

3.2.2. MTT assay

The MTT assay for cell viability showed the following results for the tested concentrations (15.625, 31.25, 62.5, 125 and 250 nM): 93.90 ± 1.91, 93.92 ± 2.77, 87.20 ± 2.22, 52.74 ± 9.94 and 24.70 ± 7.03 in the 24-h period; 91.80 ± 4.52, 88.53 ± 2.98, 75.09 ± 5.77, 45.10 ± 11.48, 24.46 ± 7.50 in the 48-h period and 87.11 ± 3.82, 83.79 ± 2.26, 66.22 ± 4.87, 34.61 ± 8.91 and 16.83 ± 3.32 in the 72-h period, respectively (Fig. 3a). The statistical analysis showed no significant differences in cell viability between treatment with the 15.625 nM and 31.25 nM 1,25(OH)₂D₃ concentrations and the control (*p* > 0.05) at any treatment time point. The 62.5 nM 1,25(OH)₂D₃ concentration significantly decreased (*p* < 0.05) the cell viability at 48 and 72 h. Moreover, the 125 and 250 nM 1,25(OH)₂D₃ concentrations had significant effects (*p* < 0.05) on cell viability at all treatment time points (b).

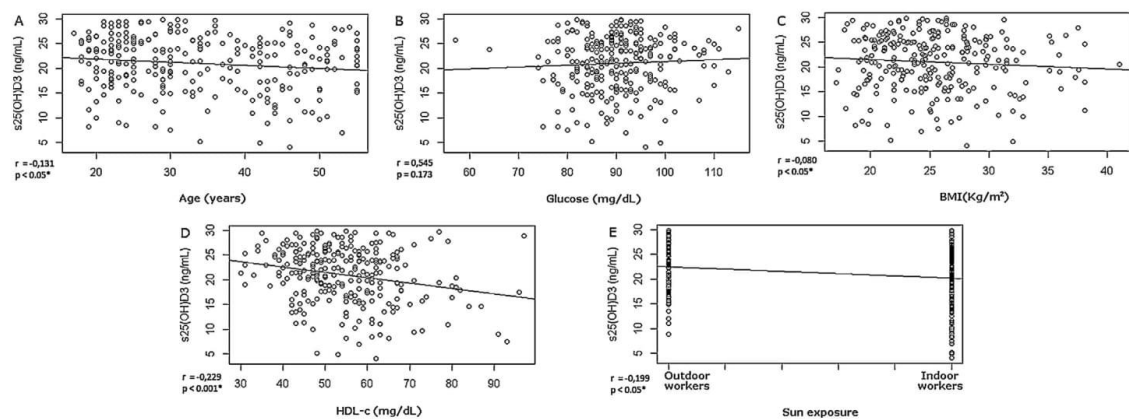


Fig. 1. Scatter plot and correlation coefficients of the variables used in the $s25(OH)D_3 < 30$ ng/mL group multivariate regression analysis. a) Age (years; $r = -0.131$, $p < 0.05$), b) glucose (mg/dL; $r = 0.545$, $p = 0.173$), c) BMI (kg/m^2 ; $r = -0.080$, $p < 0.05$), d) HDL-c (mg/dL; $r = -0.229$, $p < 0.001$) and sun exposure (work environment; $r = -0.199$, $p = 0.05$).

3.2.3. IC50 calculation

The calculated IC50 of $1,25(OH)_2D_3$ for the 24-h treatment was 138.97 nM. A qualitative evaluation was performed for the same concentration and treatment time. The number of cells per field of view decreased, cytoplasmic extensions were observed, the appearance was no longer fibroblastoid, and adhesiveness occurred; these changes caused the cells to adopt a rounded appearance (Fig. 4).

4. Discussion

The present study detected hypovitaminosis D in a sample of adult individuals from southern Brazil. The same finding was also reported by other population studies conducted in cities of the southeast, central-west and north regions [24,27,57–59], indicating that this public health problem is not limited to a specific Brazilian demographic region.

In Brazil, the consumption of vitamin D-rich foods is considered low [27] and is characterised as inadequate throughout the country according to the Brazilian Family Budget Survey (Pesquisa Brasileira de Orçamento Familiar) [60]. This inadequate consumption affects several age groups (10 to 13, 14 to 18, 19 to 59 and 60 years and older) and both genders. Furthermore, rare sun exposure and the sedentary lifestyle typical of the study populations [61,62] aggravate the condition, even though Brazil is a tropical country with a high solar incidence for most of the year. Brazilian population studies have shown weight gain and confirmed the prevalence of hypovitaminosis D [24,63].

The two key determinants of $s25(OH)D_3$ are sun exposure and the body fat percentage according to Bolland, Grey, Ames, Mason, Horne, Gamble and Reid [64]. Therefore, sun exposure should ideally occur at least three times a week for 5 to 15 min from 10 AM to 3 PM. This exposure time would suffice for vitamin D production under ideal conditions [65]. We should emphasise that moderate sunscreen use has no effect on the conversion of 7-dehydrocholesterol into vitamin D_3 [66]. However, because an increase in sun exposure tends to be insufficient in the presence of a high percentage of body fat, supplementation is required under these circumstances [67]. The negative association between $s25(OH)D_3$ and body fat may be attributed to the sequestration of fat-soluble, skin-generated or supplemented

vitamin D in adipocytes before the transport of this molecule to the liver for conversion into $25(OH)D_3$ [24]. Therefore, we can use these facts to explain the results from this research study, which showed hypovitaminosis D in 79.23% of the sample.

The univariate data analysis showed that only the $25(OH)D_3$ and LDL-c levels were significantly different between the groups. Vitamin D deficiency affects various metabolic factors of the body, including dyslipidaemia, and thus provides a justification for testing the correlation between vitamin D and the development of cardiovascular diseases [68–71]. Furthermore, Yin, Sun, Zhang, Lu, Sun, Cui and Wang [72] reported that LDL-c might be the most important of the risk factors that increase the risk for cardiovascular diseases. Thus, this dyslipidaemic factor must be studied to improve the quality of life of the community.

Circulating LDL-c may be oxidised by free radicals, triggering the inflammatory process in blood vessels and thereby recruiting macrophages, which absorb LDL-c particles. Due to their inability to hydrolyse LDL-c, macrophages become foam cells, which are deposited and agglomerate in blood vessel walls and cause atheroma plaques [73]. The main mechanism of LDL-c removal is known as reverse cholesterol transport or cholesterol efflux and occurs when the endogenous cholesterol of peripheral cells and macrophages is removed by binding to HDL-c particles, thereby reducing the atheromatous plaques [74]. The fat-soluble nature of vitamin D leads to a correlation between LDL-c, HDL-c and vitamin D, suggesting that LDL-c removal may be mediated by vitamin D because macrophages have the vitamin D receptor (VDR) [75]. Thus, vitamin D plays a key role in regulating reverse cholesterol transport [76], modulating genes related to the increase in the cholesterol efflux, including *ABCA1* [77] and others [78], and inducing the polarisation of anti-inflammatory macrophages, thereby partially limiting the formation of atheromatous plaques [79–81].

The mean HDL-c concentration of the study population was almost identical to and within the levels recommended by the American Society of Cardiology [82] and was close to the values considered optimal ($HDL-c \geq 60$ ng/mL). Conversely, the population with $s25(OH)D_3 < 30$ ng/mL showed a significant negative correlation between vitamin D and HDL-c. This finding indicated that vitamin D failed to modulate the HDL-c levels in the present research study. Although most studies showed opposite results

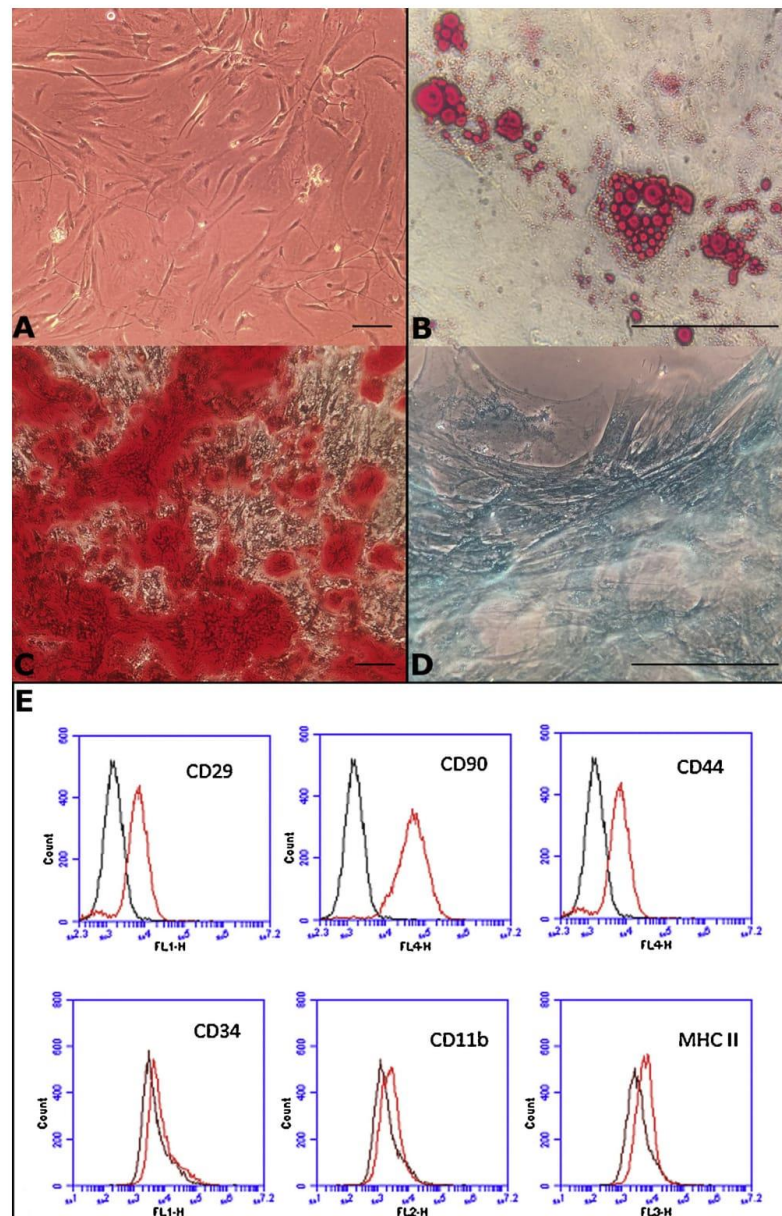


Fig. 2. Morphology, characterization and differentiation potential of mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue. a) Undifferentiated culture demonstrating cells with fibroblast characteristics, b) adipogenic differentiation culture and lipid vacuoles stained with Oil red O, c) osteogenic differentiation culture and calcium deposits stained with Alizarin Red and d) chondrogenic differentiation culture and glycosaminoglycan-rich extracellular matrix stained with Alcian Blue. Bars represent 50 μm. e) Immunophenotypic characterization graphs demonstrating that the cells are positive for the CD29, CD90 and CD44 molecular markers but negative for CD34, CD11b and MHC II.

from this finding [7,83,84], some studies, including vitamin D supplementation studies, showed no increase [85] and/or a decrease in the HDL-c profile [86–88]; thus, the vitamin D and HDL interaction has not been completely elucidated. Other variables of our study, including triglycerides, free fatty acids and glucose, showed no significant results in the univariate

regression analysis. However, dyslipidaemia and hyperglycaemia were found in obese or overweight patients [33], and the modulating potential of vitamin D in adipogenesis was previously examined [89].

In the present study, the general data analysis and literature review clearly established the associations between s25(OH)D₃

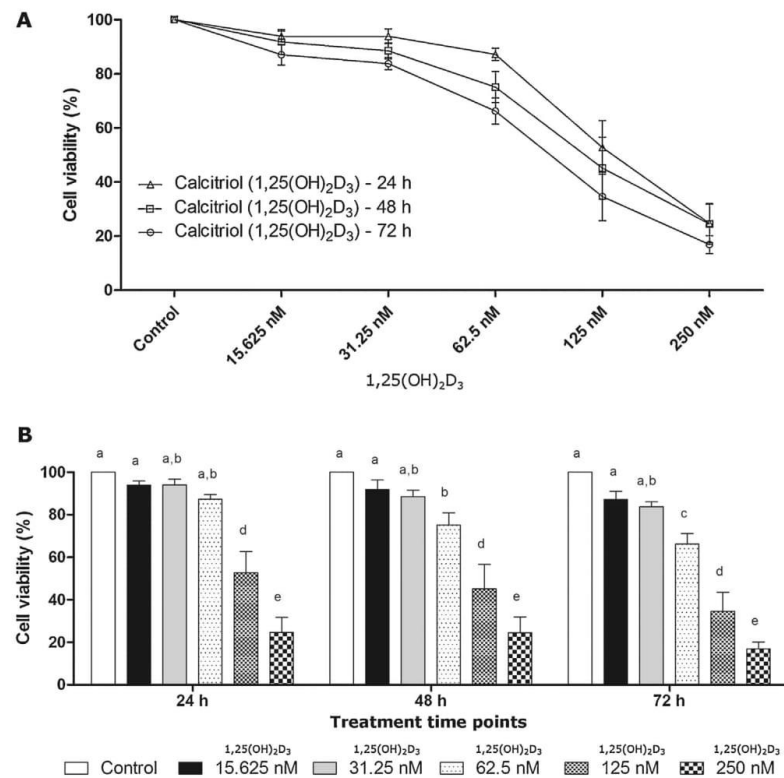


Fig. 3. Graphs representing the results obtained from the MTT assay. a) Mean $\pm$ SEM of the cell viability of ADSCs treated with calcitriol (1,25(OH)₂D₃) over different treatment time periods (24, 48 and 72 h). The following results were obtained for the tested concentrations (15.625, 31.25, 62.5, 125 and 250 nM): 93.90 $\pm$ 1.91, 93.92 $\pm$ 2.77, 87.20 $\pm$ 2.22, 52.74 $\pm$ 9.94 and 24.70 $\pm$ 7.03 in the 24-h period; 91.80 $\pm$ 4.52, 88.53 $\pm$ 2.98, 75.09 $\pm$ 5.77, 45.10 $\pm$ 11.48, 24.46 $\pm$ 7.50 in the 48-h period and 87.11 $\pm$ 3.82, 83.79 $\pm$ 2.26, 66.22 $\pm$ 4.87, 34.61 $\pm$ 8.91 and 16.83 $\pm$ 3.32 in the 72-h period, respectively. b) Comparison of the mean cell viability between the different treatment times with calcitriol (1,25(OH)₂D₃; 24, 48 and 72 h). Different letters indicate significant differences (ANOVA/Bonferroni; $p < 0.05$). No significant difference was observed in cell viability between treatment with the 15.625 nM and 31.25 nM 1,25(OH)₂D₃ concentration and the control ($p > 0.05$) at any treatment time point. The 62.5 nM 1,25(OH)₂D₃ concentration significantly decreased ($p < 0.05$) the cell viability at 48 and 72 h, and the 125 and 250 nM 1,25(OH)₂D₃ concentrations had significant effects ($p < 0.05$) on cell viability at all treatment time points.

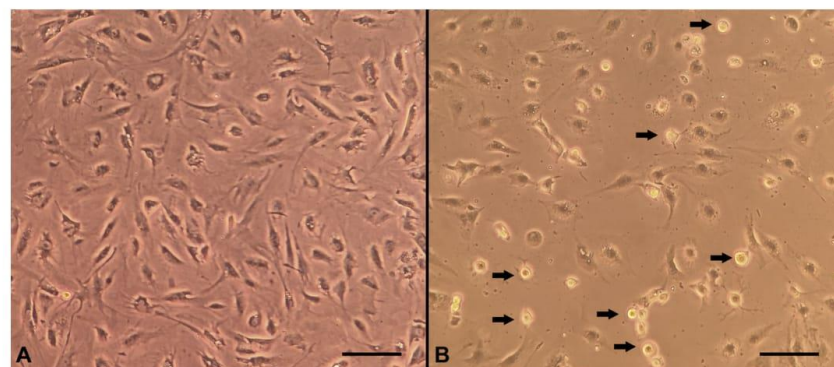


Fig. 4. Photomicrograph of ADSCs. a) Culture in HDMEM and normal morphology. b) Culture in HDMEM with 138.97 nM calcitriol (1,25(OH)₂D₃) for 24 h. Arrows indicate detached cells with the loss of the fibroblastoid appearance. Bars represent 50 μ m.

deficiency, various anthropometric and biochemical variables and metabolic disorders, including obesity-related diseases. No study variable was a significant predictor of the $25(\text{OH})\text{D}_3$ concentration $\geq 30 \text{ ng/mL}$. Conversely, BMI, age, HDL-c, glucose and sun exposure were significant predictors of the $25(\text{OH})\text{D}_3$ concentration $< 30 \text{ ng/mL}$.

Obesity affects approximately 13% of the global population [90]. In Brazil, obesity affects almost one in five Brazilians according to the Ministry of Health (Ministério da Saúde, Brasil) [63]. These data are worrying and place a burden on public health spending worldwide. Additionally, the Brazilian Unified Health System (Sistema Único de Saúde–SUS) spends approximately 150 million US dollars treating obesity-related diseases [91].

The body fat percentage and BMI are two key analysis parameters for obesity, and both parameters have been reported to be inversely correlated with obesity [92,93]. Our results also support this inference and increase interest in a better understanding of the cellular biology of obesity and its correlation with vitamin D levels. However, the relevance of vitamin D and the differentiation and/or cell death process to the biology of obesity is a key factor that requires further study [43]. The current understanding indicates that obesity results from a combination of three key events: (I) adipocyte hypertrophy; (II) hyperplasia of ADSCs and (III) the balance between the cell differentiation process (stem cells into adipocytes) and the cytostatic and/or cytotoxic effects on ADSCs, pre-adipocytes or adipocytes themselves [34]. Using an *in vitro* test system, our study showed that the viability of ADSCs depended on the time and concentration used for vitamin D supplementation (i.e., the viability of ADSCs was affected by the vitamin D concentration and exposure time). The IC_{50} , which was between the two highest tested $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ concentrations, was also calculated based on those results.

The MTT assay is commonly used to evaluate cell viability primarily through cytotoxic evaluation of the tested compound. Our results corroborate and complete the findings of Valle, Almalki and Agrawal [94]. These authors examined the cytotoxicity of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ by testing the release of the enzyme glucose-6-phosphate dehydrogenase in porcine ADSCs at a 100 nM concentration to assess cytotoxicity and necrosis at that tested concentration. Thus, the experimental data reported herein may promote the study of new anti-obesity treatments considering $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ supplementation and the biology of obesity, particularly the cytotoxic effects on cells that cause adipose tissue hyperplasia.

5. Conclusions

Given the above findings, the present study suggests that hypovitaminosis D is prevalent in the southern Brazilian study population and establishes a correlation between a low serum vitamin D concentration and increased LDL-c, low sun exposure (indoor work environment) and increased body fat. These findings suggest a key association between vitamin D deficiency and the development of obesity. Furthermore, the *in vitro* test performed in this study indicates that vitamin D supplementation may be a strategy for the development of anti-obesity treatments because this vitamin induces cell death (i.e., has a cytotoxic effect on ADSCs), which may be responsible for adipose tissue hyperplasia.

Acknowledgements

This work was supported by the Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso do Sul under grant number 79/2014 (23/200.225/2014) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq – under grant number 447205/2014-5. We thank Carlos

Roberto Audi Ayres, Edwin José Torres de Oliveira and Sidney Paulo Miyashiro for their support.

References

- [1] H.A. Bischoff-Ferrari, W.C. Willett, J.B. Wong, A.E. Stuck, H.B. Staehelin, E.J. Orav, A. Thoma, D.P. Kiel, J. Henschkowski, Prevention of nonvertebral fractures with oral vitamin D and dose dependency: a meta-analysis of randomized controlled trials, *Arch. Intern. Med.* 169 (6) (2009) 551–561.
- [2] S. Fan, X. Ni, J. Wang, Y. Zhang, S. Tao, W. Kong, Y. Li, J. Li, High prevalence of suboptimal Vitamin D status and bone loss in adult short bowel syndrome even after weaning off parenteral nutrition, *Nutr. Clin. Pract.* 32 (2) (2016) 258–265.
- [3] L. Vuolo, C. Di Somma, A. Faggiano, A. Colao, Vitamin D and cancer, *Front. Endocrinol. (Lausanne)* 3 (2012) 58.
- [4] M. Osanai, G.H. Lee, CYP24A1-induced vitamin D insufficiency promotes breast cancer growth, *Oncol. Rep.* 36 (5) (2016) 2755–2762.
- [5] J. Gee, H. Bailey, K. Kim, J. Kolesar, T. Havighurst, K.D. Tutsch, W. See, M.B. Cohen, N. Street, L. Levan, D. Jarrard, C. Wilding, Phase II open label, multicenter clinical trial of modulation of intermediate endpoint biomarkers by 1 α -hydroxyvitamin D₂ in patients with clinically localized prostate cancer and high grade pin, *Prostate* 73 (9) (2013) 970–978.
- [6] M.L. Melamed, E.D. Michos, W. Post, B. Astor, 25-hydroxyvitamin D levels and the risk of mortality in the general population, *Arch. Intern. Med.* 168 (15) (2008) 1629–1637.
- [7] R. Jorde, Y. Figenschau, M. Hutchinson, N. Emaus, G. Grimnes, High serum 25-hydroxyvitamin D concentrations are associated with a favorable serum lipid profile, *Eur. J. Clin. Nutr.* 64 (12) (2010) 1457–1464.
- [8] S. Vogt, J. Baumert, A. Peters, B. Thorand, R. Scragg, Waist circumference modifies the association between serum 25(OH)D and systolic blood pressure: results from NHANES 2001–2006, *J. Hypertens.* 34 (4) (2016) 637–645.
- [9] S. Soskic, E. Stokic, E.R. Isenovic, The relationship between vitamin D and obesity, *Curr. Med. Res. Opin.* 30 (6) (2014) 1197–1199.
- [10] D. Hollander, K.S. Muralidhara, A. Zimmerman, Vitamin D-3 intestinal absorption *in vivo*: influence of fatty acids, bile salts, and perfusate pH on absorption, *Gut* 19 (4) (1978) 267–272.
- [11] J.L. Omdahl, E.A. Bobrovnikova, S. Choe, P.P. Dwivedi, B.K. May, Overview of regulatory cytochrome P450 enzymes of the vitamin D pathway, *Steroids* 66 (3–5) (2001) 381–389.
- [12] M.O. Premaor, T.W. Furlanetto, Hipovitaminose D em adultos: entendendo melhor a apresentação de uma velha doença, *Arquivos Brasileiros Endocrinologia Metabologia* 50 (2006) 25–37.
- [13] M.F. Holick, Vitamin D status: measurement, interpretation, and clinical application, *Ann. Epidemiol.* 19 (2) (2009) 73–78.
- [14] M.F. Holick, Vitamin D deficiency, *N. Engl. J. Med.* 357 (3) (2007) 266–281.
- [15] M.G. Kimlin, N.J. Downs, A.V. Parisi, Comparison of human facial UV exposure at high and low latitudes and the potential impact on dermal vitamin D production, *Photochem. Photobiol. Sci.* 2 (4) (2003) 370–375.
- [16] M.F. Holick, T.C. Chen, Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences, *Am. J. Clin. Nutr.* 87 (4) (2008) 1080S–1086S.
- [17] S.J. Felton, M.S. Cooke, R. Kift, J.L. Berry, A.R. Webb, P.M. Lam, F.R. de Grijl, A. Vail, L.E. Rhodes, Concurrent beneficial (vitamin D production) and hazardous (cutaneous DNA damage) impact of repeated low-level summer sunlight exposures, *Br. J. Dermatol.* 175 (6) (2016) 1320–1328.
- [18] K.D. Cashman, K.G. Dowling, Z. Skrabakova, M. Gonzalez-Gross, J. Valtuena, S. De Henauw, L. Moreno, C.T. Damsgaard, K.F. Michaelsen, C. Molgaard, R. Jorde, G. Grimnes, G. Moschonis, C. Mavrogiani, Y. Manios, M. Thamm, G.B. Mensink, M. Rabenberg, M.A. Busch, L. Cox, S. Meadows, G. Goldberg, A. Prentice, J.M. Dekker, G. Nijpels, S. Pilz, K.M. Swart, N.M. van Schoor, P. Lips, G. Eiriksdottir, V. Gudnason, M.F. Cotch, S. Koskinen, C. Lamberg-Allardt, R.A. Durazo-Arvizu, C.T. Sempos, M. Kiely, Vitamin D deficiency in Europe: pandemic? *Am. J. Clin. Nutr.* 103 (4) (2016) 1033–1044.
- [19] C.M. Curtin, M. Williams, J.M. Cousins, G.M. Peterson, T. Winzenberg, Vitamin D supplementation in Tasmanian nursing home residents, *Drugs Aging* 33 (10) (2016) 747–754.
- [20] S. Savastio, F. Cadario, G. Genoni, G. Bellomo, M. Bagnati, G. Secco, R. Picchi, E. Giglione, G. Bona, Vitamin D deficiency and glycemic status in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus, *PLoS One* 11 (9) (2016) e0162554.
- [21] A. Hosseini-nezhad, M.F. Holick, Vitamin D for health: a global perspective, *Mayo Clin. Proc.* 88 (7) (2013) 720–755.
- [22] F. Sadaf, Vitamin D deficiency – still a dilemma!, *anaesthesia, Pain Intensive Care* 20 (2) (2016) 2.
- [23] A. Bener, M. Al-Ali, G.F. Hoffmann, Vitamin D deficiency in healthy children in a sunny country: associated factors, *Int. J. Food Sci. Nutr.* 60 (Suppl. 5) (2009) 60–70.
- [24] M.D. Unger, L. Cuppari, S.M. Titan, M.C. Magalhaes, A.L. Sassaki, L.M. dos Reis, V. Jorgetti, R.M. Moyses, Vitamin D status in a sunny country: where has the sun gone? *Clin. Nutr.* 29 (6) (2010) 784–788.
- [25] C.A. Nowson, J.J. McGrath, P.R. Ebeling, A. Haikarwal, R.M. Daly, K.M. Sanders, M.J. Seibel, R.S. Mason, A. Working Group of, B. New Zealand, E.S.o.A. Mineral Society, A. Osteoporosis, Vitamin D and health in adults in Australia and New Zealand: a position statement, *Med J Aust* 196(11) (2012) 686–7.
- [26] S.J. Muhairi, A.E. Mehairi, A.A. Khouri, M.M. Naqbi, F.A. Maskari, J. Al Kaabi, A.S. Al Dhaheri, N. Nagelkerke, S.M. Shah, Vitamin D deficiency among healthy adolescents in Al ain, United Arab Emirates, *BMC Public Health* 13 (2013) 33.

- [27] B.S. Peters, L.C. dos Santos, M. Fisberg, R.J. Wood, L.A. Martini, Prevalence of vitamin D insufficiency in Brazilian adolescents, *Ann. Nutr. Metab.* 54 (1) (2009) 15–21.
- [28] S.A. de Sousa Studart, A.C. Leite, A.L. Marinho, A.C. Pinto, C.N. Rabelo Junior, R. de Melo Nunes, H.A. Rocha, F.A. Rocha, Vitamin D levels in juvenile idiopathic arthritis from an equatorial region, *Rheumatol. Int.* 35 (10) (2015) 1717–1723.
- [29] R.B. Moraes, G. Friedman, I.C. Wawrzyniak, L.S. Marques, F.M. Nagel, T.C. Lisboa, M.A. Czepielewski, Vitamin D deficiency is independently associated with mortality among critically ill patients, *Clinics (Sao Paulo)* 70 (5) (2015) 326–332.
- [30] A.T. da Cunha, H.T. Pereira, S.L. de Aquino, C.H. Sales, K.C. Sena-Evangelista, J.G. Lima, S.C. Lima, L.F. Pedrosa, Inadequacies in the habitual nutrient intakes of patients with metabolic syndrome: a cross-sectional study, *Diabetol. Metab. Syndr.* 8 (2016) 32.
- [31] P. Autier, M. Boniol, C. Pizot, P. Mullie, Vitamin D status and ill health: a systematic review, *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2 (1) (2014) 76–89.
- [32] E. Theodoratou, I. Tzoulaki, L. Zgaga, J.P. Ioannidis, Vitamin D and multiple health outcomes: umbrella review of systematic reviews and meta-analyses of observational studies and randomised trials, *BMJ* 348 (2014) g2035.
- [33] M.M. Elseweidy, R.S. Amin, H.H. Atteia, M.A. Ali, Vitamin D3 intake as regulator of insulin degrading enzyme and insulin receptor phosphorylation in diabetic rats, *Biomed. Pharmacother.* 85 (2017) 155–159.
- [34] J. Jo, O. Gavrilova, S. Pack, W. Jou, S. Mullen, A.E. Sumner, S.W. Cushman, V. Periwai, Hypertrophy and/or hyperplasia: dynamics of adipose tissue growth, *PLoS Comput. Biol.* 5 (3) (2009) e1000324.
- [35] J. Ye, J.M. Gimble, Regulation of stem cell differentiation in adipose tissue by chronic inflammation, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 38 (12) (2011) 872–878.
- [36] A. Eljaafari, M. Robert, M. Chehimi, S. Chanon, C. Durand, G. Vial, N. Bendridi, A. M. Madec, E. Disse, M. Laville, J. Rieusset, E. Lefai, H. Vidal, L. Pirola, Adipose tissue-Derived stem cells from obese subjects contribute to inflammation and reduced insulin response in adipocytes through differential regulation of the Th1/Th17 balance and monocyte activation, *Diabetes* 64 (7) (2015) 2477–2488.
- [37] I.N. Sergeev, The role of Vitamin D in obesity and diabetes: ca2+ signaling, insulin secretion, adipocyte apoptosis, and bone mineralisation, *FASEB J.* 30 (1 Supplement) (2016) 128.1.
- [38] F. Artaza, M.G. Sirad, 1,25(OH)2vitamin D3 inhibits cell proliferation by promoting cell cycle arrest without inducing apoptosis and modifies cell morphology of mesenchymal multipotent cells, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 119 (1–2) (2010) 73–83.
- [39] R. Ducloux, E. Nobecourt, J.M. Chevallier, H. Ducloux, N. Elian, J.J. Altman, Vitamin D deficiency before bariatric surgery: should supplement intake be routinely prescribed? *Obes. Surg.* 21 (5) (2011) 556–560.
- [40] S. Christakos, M. Hewison, D.G. Gardner, C.L. Wagner, I.N. Sergeev, E. Rutten, A. G. Pittas, R. Boland, L. Ferrucci, D.D. Bikle, Vitamin D: beyond bone, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1287 (2013) 45–58.
- [41] C.K. Chakraborti, Vitamin D as a promising anticancer agent, *Indian J. Pharmacol.* 43 (2) (2011) 113–120.
- [42] S. Brakta, J.S. Diamond, A. Al-Hendy, M.P. Diamond, S.K. Halder, Role of vitamin D in uterine fibroid biology, *Fertil. Steril.* 104 (3) (2015) 698–706.
- [43] I.N. Sergeev, 1,25-Dihydroxyvitamin D3 induces Ca2+-mediated apoptosis in adipocytes via activation of calpain and caspase-12, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 384 (1) (2009) 18–21.
- [44] J.I. Botella-Carretero, F. Alvarez-Blasco, J.J. Villafruela, J.A. Balsa, C. Vazquez, H. F. Escobar-Morreale, Vitamin D deficiency is associated with the metabolic syndrome in morbid obesity, *Clin. Nutr.* 26 (5) (2007) 573–580.
- [45] E.E. Delvin, M. Lambert, E. Levy, J. O'Loughlin, S. Mark, K. Gray-Donald, G. Paradis, Vitamin D status is modestly associated with glycemia and indicators of lipid metabolism in French-Canadian children and adolescents, *J. Nutr.* 140 (5) (2010) 987–991.
- [46] U. Ekelund, H. Sepp, S. Brage, W. Becker, R. Jakes, M. Hennings, N.J. Wareham, Criterion-related validity of the last 7-day, short form of the International Physical Activity Questionnaire in Swedish adults, *Public Health Nutr.* 9 (2) (2006) 258–265.
- [47] W.T. Friedewald, R.I. Levy, D.S. Fredrickson, Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge, *Clin. Chem.* 18 (6) (1972) 499–502.
- [48] C.F. Markarian, G.Z. Frey, M.D. Silveira, E.M. Chem, A.R. Milani, P.B. Ely, A.P. Horn, N.B. Nardi, M. Camassola, Isolation of adipose-derived stem cells: a comparison among different methods, *Biotechnol. Lett.* 36 (4) (2014) 693–702.
- [49] L.C. Hermeto, R. DeRossi, R.J. Oliveira, J.R. Pesarini, A.C. Antonioli-Silva, P.H. Jardim, A.E. Santana, E. Deffune, J.C. Rinaldi, L.A. Justulin, Effects of intra-articular injection of mesenchymal stem cells associated with platelet-rich plasma in a rabbit model of osteoarthritis, *Genet. Mol. Res.* 15 (3) (2016).
- [50] L.C. Hermeto, R. Rossi, P.H. Jardim, A.E. Santana, J.C. Rinaldi, L.A. Justulin, Comparison between two different experimental models of osteoarthritis in rabbits. Intra-articular collagenase injection and anterior cruciate ligament transection, *Acta Cir. Bras.* 31 (9) (2016) 602–607.
- [51] P.A. Zuk, M. Zhu, H. Mizuno, J. Huang, J.W. Futrell, A.J. Katz, P. Benhaim, H.P. Lorenz, M.H. Hedrick, Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies, *Tissue Eng.* 7 (2) (2001) 211–228.
- [52] A. Urt-Filho, R.J. Oliveira, L.C. Hermeto, J.R. Pesarini, N. David, B. Cantero Wde, G. Falcao, G. Marks, A.C. Antonioli-Silva, Mesenchymal stem cell therapy promotes the improvement and recovery of renal function in a preclinical model, *Genet. Mol. Biol.* 39 (2) (2016) 290–299.
- [53] M. Camassola, L.M. de Macedo Braga, P.C. Chagastelles, N.B. Nardi, Methodology, biology and clinical applications of human mesenchymal stem cells, *Methods Mol. Biol.* 879 (2012) 491–504.
- [54] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods* 65 (1–2) (1983) 55–63.
- [55] M.O. Mauro, D. Sartori, R.J. Oliveira, P.L. Ishii, M.S. Mantovani, L.R. Ribeiro, Activity of selenium on cell proliferation, cytotoxicity, and apoptosis and on the expression of CASP9, BCL-XL and APC in intestinal adenocarcinoma cells, *Mutat. Res.* 715 (1–2) (2011) 7–12.
- [56] T. Karonova, O. Belyaeva, E.B. Jude, A. Tsiberkin, A. Andreeva, E. Grineva, P. Pludowski, Serum 25(OH)D and adipokines levels in people with abdominal obesity, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* (2016), doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jsmb.2016.09.005> (in press) S0960-0760(16)30241-2.
- [57] S.S. Maeda, I.S. Kunii, L. Hayashi, M. Lazaretti-Castro, The effect of sun exposure on 25-hydroxyvitamin D concentrations in young healthy subjects living in the city of São Paulo, Brazil, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 40 (2007) 1653–1659.
- [58] F. Cobayashi, B.H. Lourenco, M.A. Cardoso, 25-Hydroxyvitamin D3 levels, Bsm1 polymorphism and insulin resistance in Brazilian amazonian children, *Int. J. Mol. Sci.* 16 (6) (2015) 12531–12546.
- [59] V.M. Lopes, J.R. Lopes, J.P. Brasileiro, I. Oliveira, R.P. Lacerda, M.R. Andrade, N.J. Tierno, R.C. Souza, L.A. Motta, Highly prevalence of vitamin D deficiency among Brazilian women of reproductive age, *Arch. Endocrinol. Metab.* 61 (1) (2017) 21–27.
- [60] Ministério da Saúde-Governo Federal (2011). (Ministry of Health (Brazil), Federal Government; 2011). Fact sheet. Pesquisa de Orçamento Familiar (POF-2008/2009) - Antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil. <<http://www.abeso.org.br/uploads/downloads/70/553a23f27da68.pdf>> (Accessed 17 April 2017).
- [61] J. MacLaughlin, M.F. Holick, Aging decreases the capacity of human skin to produce vitamin D3, *J. Clin. Invest.* 76 (4) (1985) 1536–1538.
- [62] L. Flicker, K. Mead, R.J. MacInnis, C. Nowson, S. Scherer, M.S. Stein, J. Thomas, J. L. Hopper, J.D. Wark, Serum vitamin D and falls in older women in residential care in Australia, *J. Am. Geriatr. Soc.* 51 (11) (2003) 1533–1538.
- [63] Ministério da Saúde – Governo Federal (2017). (Ministry of Health (Brazil), Federal Government; 2017). Fact sheet. Sistema de vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico <http://portal.arquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/abril/17/Vigilei_17-4-17-final.pdf> (Accessed 17 April 2017).
- [64] M.J. Bolland, A.B. Grey, R.W. Ames, B.H. Mason, A.M. Horne, G.D. Gamble, I.R. Reid, Determinants of vitamin D status in older men living in a subtropical climate, *Osteoporos. Int.* 17 (12) (2006) 1742–1748.
- [65] M.F. Holick, Vitamin D: a d-lightful solution for health, *J. Invest. Med.* 59 (6) (2011) 872–880.
- [66] S. Kannan, H.W. Lim, Photoprotection and vitamin D: a review, *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 30 (2–3) (2014) 137–145.
- [67] J. Wortsman, L.Y. Matsuoka, T.C. Chen, Z. Lu, M.F. Holick, Decreased bioavailability of vitamin D in obesity, *Am. J. Clin. Nutr.* 72 (3) (2000) 690–693.
- [68] F. Alshahrani, N. Aljohani, Vitamin D: deficiency, sufficiency and toxicity, *Nutrients* 5 (9) (2013) 3605–3616.
- [69] N.M. Aljefree, P. Lee, J.M. Alsaqqaf, F. Ahmed, Association between Vitamin D status and coronary heart disease among adults in Saudi Arabia: a case-control study, *Healthcare (Basel)* 4 (4) (2016).
- [70] K.J. Rawat, N.H. Sabnis, U. Saraf, G. Surana, Myopathy effect of Vitamin D deficiency beyond bones, *J. Assoc. Physicians India* 64 (10) (2016) 86–87.
- [71] S. Salekzamani, H. Mehrizadeh, A. Ghezeli, Y. Salekzamani, M.A. Jafarabadi, A. S. Babil, B.P. Gargari, Effect of high-dose vitamin D supplementation on cardiometabolic risk factors in subjects with metabolic syndrome: a randomized controlled double-blind clinical trial, *J. Endocrinol. Invest.* 39 (11) (2016) 1303–1313.
- [72] X. Yin, Q. Sun, X. Zhang, Y. Lu, C. Sun, Y. Cui, S. Wang, Serum 25(OH)D is inversely associated with metabolic syndrome risk profile among urban middle-aged Chinese population, *Nutr. J.* 11 (2012) 68.
- [73] A. Tedgui, Z. Mallat, Atherosclerotic plaque formation, *Rev. Prat.* 49 (19) (1999) 2081–2086.
- [74] M.C. Phillips, Molecular mechanisms of cellular cholesterol efflux, *J. Biol. Chem.* 289 (35) (2014) 24020–24029.
- [75] K. Yin, D.K. Agrawal, Vitamin D and inflammatory diseases, *J. Inflamm. Res.* 7 (2014) 69–87.
- [76] J. Oh, S. Weng, S.K. Felton, S. Bhandare, A. Riek, B. Butler, B.M. Proctor, M. Petty, Z. Chen, K.B. Schechtman, L. Bernal-Mizrachi, C. Bernal-Mizrachi, 1,25(OH)2 vitamin d inhibits foam cell formation and suppresses macrophage cholesterol uptake in patients with type 2 diabetes mellitus, *Circulation* 120 (8) (2009) 687–698.
- [77] P. Costet, Y. Luo, N. Wang, A.R. Tall, Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor, *J. Biol. Chem.* 275 (36) (2000) 28240–28245.
- [78] F. Matsuura, N. Wang, W. Chen, X.C. Jiang, A.R. Tall, HDL from CETP-deficient subjects shows enhanced ability to promote cholesterol efflux from macrophages in an apoE- and ABCG1-dependent pathway, *J. Clin. Invest.* 116 (5) (2006) 1435–1442.
- [79] K.A. Rye, C.A. Bursill, G. Lambert, F. Tabet, P.J. Barter, The metabolism and anti-atherogenic properties of HDL, *J. Lipid Res.* (2009) S195–S200.
- [80] R.F. Chun, A.L. Lauridsen, L. Suon, L.A. Zella, J.W. Pike, R.L. Modlin, A.R. Martineau, R.J. Wilkinson, J. Adams, M. Hewison, Vitamin D-binding protein

- directs monocyte responses to 25-hydroxy- and 1,25-dihydroxyvitamin D, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95 (7) (2010) 3368–3376.
- [81] K. Yin, Y. You, V. Swier, L. Tang, M.M. Radwan, A.N. Pandya, D.K. Agrawal, Vitamin D protects against atherosclerosis via regulation of cholesterol efflux and macrophage polarisation in hypercholesterolemic swine, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 35 (11) (2015) 2432–2442.
- [82] P.S. Jellinger, D.A. Smith, A.E. Mehta, O. Ganda, Y. Handelsman, H.W. Rodbard, M.D. Shepherd, J.A. Seibel, A.T.F.F.M.o. Dyslipidemia, A. Prevention of, American Association of Clinical Endocrinologists' Guidelines for Management of Dyslipidemia and Prevention of Atherosclerosis: executive summary, *Endocr. Pract.* 18(2) (2012) 269–93.
- [83] T. Skaaby, L.L. Husemoen, T. Martinussen, J.P. Thyssen, M. Melgaard, B.H. Thuesen, C. Pisinger, T. Jorgensen, J.D. Johansen, T. Menne, B. Carlsen, P.B. Szecsi, S. Stender, R.V. Fenger, M. Fenger, A. Linneberg, Vitamin D status, flaggrin genotype, and cardiovascular risk factors: a Mendelian randomization approach, *PLoS One* 8 (2) (2013) e57647.
- [84] L.H. Li, X.Y. Yin, C.Y. Yao, X.C. Zhu, X.H. Wu, Serum 25-hydroxyvitamin D, parathyroid hormone, and their association with metabolic syndrome in Chinese, *Endocrine* 44 (2) (2013) 465–472.
- [85] Z. Asemi, T. Hashemi, M. Karamali, M. Samimi, A. Esmailzadeh, Effects of vitamin D supplementation on glucose metabolism, lipid concentrations, inflammation, and oxidative stress in gestational diabetes: a double-blind randomized controlled clinical trial, *Am. J. Clin. Nutr.* 98 (6) (2013) 1425–1432.
- [86] A.M. Heikkinen, M.T. Tuppurainen, L. Niskanen, M. Komulainen, I. Penttilä, S. Saarikoski, Long-term vitamin D3 supplementation may have adverse effects on serum lipids during postmenopausal hormone replacement therapy, *Eur. J. Endocrinol.* 137 (5) (1997) 495–502.
- [87] J.C. Zhou, Y.M. Zhu, P. Guo, Z. Chen, F.Z. Xie, X.L. Liu, S. He, Serum 25(OH)D and lipid levels in Chinese obese and normal weight males before and after oral vitamin D supplementation, *Biomed. Environ. Sci.* 26 (10) (2013) 801–807.
- [88] H. Wang, N. Xia, Y. Yang, D.Q. Peng, Influence of vitamin D supplementation on plasma lipid profiles: a meta-analysis of randomized controlled trials, *Lipids Health Dis.* 11 (2012) 42.
- [89] R.J. Wood, Vitamin D and adipogenesis: new molecular insights, *Nutr. Rev.* 66 (1) (2008) 40–46.
- [90] W. H. Organization, Obesity and Overweight. Fact Sheet 311 Jun 2016, (2016).
- [91] Ministério da Saúde-Governo Federal (2013). (Ministry of Health (Brazil), Federal Government; 2013). Fact sheet. Prevenção e tratamento: Doenças ligadas à obesidade custam R\$ 488 milhões. < <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/noticias-antiores-agencia-saude/3414->> (Accessed 17 April 2017).
- [92] S. Oliai Araghi, S.C. van Dijk, A.C. Ham, E.M. Brouwer-Broisma, A.W. Enneman, E. Sohl, K.M.A. Swart, N.L. van der Zwaluw, J.P. van Wijngaarden, R.A.M. Dhonukshe-Rutten, N.M. van Schoor, M.C. Zillikens, P. Lips, L. de Groot, A.G. Uitterlinden, N. van der Velde, BMI and body fat mass is inversely associated with vitamin D levels in older individuals, *J. Nutr. Health Aging* (2015) 1–6.
- [93] A. Bellia, C. Garcovich, M. D'Adamo, M. Lombardo, M. Tesaro, G. Donadel, P. Gentileschi, D. Lauro, M. Federici, R. Lauro, P. Sbraccia, Serum 25-hydroxyvitamin D levels are inversely associated with systemic inflammation in severe obese subjects, *Intern. Emerg. Med.* 8 (1) (2013) 33–40.
- [94] Y.L. Valle, S.G. Almalki, D.K. Agrawal, Vitamin D machinery and metabolism in porcine adipose-derived mesenchymal stem cells, *Stem Cell Res. Ther.* 7 (1) (2016) 118.

APÊNDICE A – Termo de Consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezado(a) Senhor(a)

Gostaríamos de convidá-lo a participar da pesquisa “Influência da vitamina D na diferenciação de células mesenquimais em adipócitos e na indução de apoptose mediada por cálcio: Biomarcadores genéticos e terapia inovadora no controle da obesidade?”. Você tem tempo para refletir, e a decisão final se gostaria ou não de participar da pesquisa é sua. Lembre-se que, à medida que surgirem dúvidas, você poderá perguntar ao pesquisador responsável.

Este estudo será conduzido pelos Pesquisadores João Renato Pesarini e Rodrigo Juliano Oliveira com o auxílio médico de Wilson de Barros Cantero e visa conhecer os efeitos de uma vitamina (Vitamina D) nas células de gordura do organismo humano. Atualmente, a obesidade é uma importante questão de saúde pública, principalmente em função das complicações decorrentes da mesma. Logo, há que se lançar mão de novos conhecimentos que possam ser mais efetivos, em especial na prevenção da obesidade, buscando o benefício do paciente. Caso a pesquisa seja um sucesso, a população poderia ser beneficiada com novos tratamentos (menos invasivos) para pacientes debilitados pela obesidade.

Nesta pesquisa em específico, cinquenta pacientes já de posse dos exames de risco cirúrgico e cirurgia marcada, serão convidados a **doar durante o seu respectivo procedimento cirúrgico**, células de gordura de seu organismo. Sendo assim, caso decida participar desta pesquisa, no momento de seu procedimento cirúrgico suas células de gordura serão armazenadas apenas para obtenção de dados desta pesquisa, sendo posteriormente descartadas. Reforço a ideia de que você não está sendo convidado(a) a fazer procedimento cirúrgico, e sim, consentindo que algumas de suas células de gordura sejam coletadas e analisadas.

Rubrica do pesquisador

Rubrica do pesquisado

Os riscos inerentes à coleta dessas células poderão ocorrer através de pequenos sangramentos gerando hematomas no pós-operatório, sendo que o pesquisador e equipe se responsabilizam em prontamente atender qualquer situação que se fizer necessário.

Ainda, fique sabendo que se você aceitar participar, poderá desistir do estudo a qualquer momento sem prejuízos médicos, nutricionais ou pessoais, informando esta decisão a mim pessoalmente ou pelo telefone que encontra-se mais abaixo.

Não participam da pesquisa pessoas menores de 18 anos. Não haverá qualquer compensação financeira para os que decidirem participar da pesquisa e os benefícios serão obtidos quando os resultados da pesquisa forem usados pelos médicos que buscam novos tratamentos para a prevenção da obesidade por alternativas acessíveis e pouco invasivas. Os dados obtidos nesse estudo serão armazenados e publicados em revistas, jornais, eventos, teses, porém em nenhum momento serão divulgados nomes, ou seja, **os dados da pesquisa são anônimos e apenas o pesquisador e você**, terão acesso a este documento em que consta o seu nome.

Para perguntas ou problemas referentes ao estudo ligue para João Renato Pesarini, telefone (43)9933-4204 ou (67)3345-3068, Rodrigo Juliano Oliveira (67) 8417-6510. Para perguntas sobre seus direitos como participante no estudo você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFMS, no telefone (67)3345-7187.

Como já informado, sua participação no estudo é voluntária. Caso não queira participar da pesquisa, você não perderá qualquer benefício ao qual você tem direito.

Rubrica do pesquisador

Rubrica do pesquisado

Declaro que li e entendi este formulário de consentimento e todas as minhas dúvidas foram esclarecidas e que sou voluntário a fazer parte deste estudo. Declaro que estou recebendo uma via assinada deste termo de consentimento.

Nome do Pesquisado

Assinatura do Pesquisado

Data____/____/____ Telefone (opcional) _____

Assinatura do pesquisador responsável

João Renato Pesarini

Assinatura do orientador do estudo

Rodrigo Juliano Oliveira

Data____/____/____

**APÊNDICE B – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo
Seres Humanos, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Influência da vitamina D na diferenciação de células mesenquimais em adipócitos e na indução de apoptose mediada por cálcio: Biomarcadores genéticos e terapia inovadora no controle da obesidade

Pesquisador: João Renato Pesarini

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 37847714.4.0000.0021

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 867.377

Data da Relatoria: 02/11/2014

Apresentação do Projeto:

Estudos recentes demonstram que a vitamina D associada ao cálcio é capaz de causar apoptose, mediada pelo gene CASP12, em pré-adipócitos. Mas, na literatura consultada não foi encontrado nenhum trabalho que indique esse mesmo fenômeno em células-tronco mesenquimais estimuladas à diferenciação. A junção dessas informações sugere estudos que possam demonstrar se a vitamina D, o cálcio e/ou o calcitriol podem influenciar na diferenciação e sobrevivência de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo que podem gerar renovação dos adipócitos e/ou hiperplasia desse tecido em pacientes com obesidade. Caso esse fato seja provado, novas terapias para o tratamento da obesidade, baseadas na origem, diferenciação e sobrevivência de células-tronco do tecido adiposo, poderão ser iniciadas com base na suplementação desses micronutrientes e/ou desse hormônio. Frente ao exposto a presente pesquisa propõe um estudo in vitro que avaliará os efeitos da vitamina D, do cálcio e do calcitriol na diferenciação e sobrevivência de células-tronco mesenquimais e de células-tronco mesenquimais estimuladas à diferenciação

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral

Avaliar a influência da vitamina D na diferenciação de células mesenquimais em adipócitos e na

Endereço: Pró Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação/UFMS
Bairro: Caixa Postal 549 **CEP:** 79.070-110
UF: MS **Município:** CAMPO GRANDE
Telefone: (67)3345-7187 **Fax:** (67)3345-7187 **E-mail:** bioetica@propp.ufms.br



Continuação do Parecer: 867.377

indução de apoptose mediada por cálcio no desenvolvimento de biomarcadores genéticos e de terapia inovadora para o controle da obesidade.

Objetivos Específicos

Influência da suplementação de vitamina D, do cálcio e do calcitriol na diferenciação de células mesenquimais do tecido adiposo humano em modelo in vitro.

Identificar as células-tronco mesenquimais do tecido adiposo por meio de citometria de fluxo.

Diferenciar as células-tronco mesenquimais do tecido adiposo humano em adipócitos in vitro.

Avaliar a influência da suplementação de vitamina D, do cálcio, do calcitriol, e da associação da vitamina D com o cálcio, da vitamina D com o calcitriol e do cálcio com o calcitriol na diferenciação de células mesenquimais do tecido adiposo humano em adipócitos.

Avaliar a influência da suplementação de vitamina D, do cálcio, do calcitriol, e da associação da vitamina D com o cálcio, da vitamina D com o calcitriol e do cálcio com o calcitriol na indução de apoptose durante a diferenciação de células mesenquimais do tecido adiposo em adipócitos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O paciente será informado sobre os riscos inerentes ao procedimentos cirúrgicos de coleta. Estes envolvem pequenos sangramentos que poderiam causar pequenos hematomas no pós-operatório, o qual o pesquisador e equipe se responsabilizam em pronto atender em qualquer situação que se fizer necessário.

Benefícios:

Esse estudo pode ser fonte de uma nova terapia para o tratamento/prevenção da Obesidade, baseando-se na morte de células-tronco mesenquimais e/ou em células induzidas ao processo de diferenciação adipogênica, tendo impacto em importantes questões de saúde pública. No entanto, o principal benefício que é visto pelos pesquisadores é a possibilidade de melhoria da qualidade de vida de pacientes que são acometidos pela Obesidade. Ainda, para o pesquisado, o benefício se dará por meio de informativo sobre os benefícios já comprovados da manutenção de níveis ideais de vitamina D no organismo humano

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

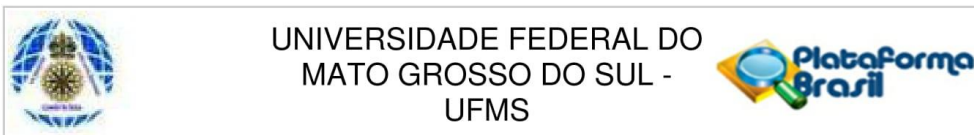
Pesquisa de relevância científica

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta autorização do hospital

Apresenta Termo de responsabilidade de descarte adequado de material

Endereço: Pró Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação/UFMS
Bairro: Caixa Postal 549 **CEP:** 79.070-110
UF: MS **Município:** CAMPO GRANDE
Telefone: (67)3345-7187 **Fax:** (67)3345-7187 **E-mail:** bioetica@propp.ufms.br



Continuação do Parecer: 867.377

Apresenta Autorização do laboratório para análise CeTroGen/NHU

Apresenta TCLE

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto bem delineado, sem recomendações

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

CAMPO GRANDE, 11 de Novembro de 2014

Assinado por:
Edilson dos Reis
(Coordenador)

Endereço: Pró Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação/UFMS
Bairro: Caixa Postal 549 **CEP:** 79.070-110
UF: MS **Município:** CAMPO GRANDE
Telefone: (67)3345-7187 **Fax:** (67)3345-7187 **E-mail:** bioetica@propp.ufms.br

**APÊNDICE C – Documento de aprovação emitido pelo Comitê de Ética em Pesquisa
envolvendo Seres Humanos, Universidade Estadual de Londrina**



COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA ENVOLVENDO
SERES HUMANOS



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

COMITE DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS
Universidade Estadual de Londrina
Registro CONEP 268

Parecer CEP/UEL: 116/2011

CAAE: 0098.0.268.000-11

Processo: 12590/2011

Folha de Rosto: 424989

Pesquisador: João Renato Pesarini

Unidade/Orgão: UNESP – Rio Claro – Instituto de Biociências. Programa de Mestrado em Biologia Celular e Molecular

Prezado(a) Senhor(a):

O “**Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres humanos da Universidade Estadual de Londrina**” (Registro CONEP 268) – de acordo com as orientações da Resolução 196/06 do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções complementares, avaliou o projeto:

“Investigação da Associação de níveis de Vitamina D [25(OH)D3] com Indicadores de Síndrome Metabólica na População Brasileira”

Situação do Projeto: APROVADO

Informamos que deverá ser comunicada, por escrito, qualquer modificação que ocorrer no desenvolvimento da pesquisa, bem como deverá apresentar ao CEL/UEL relatório final da pesquisa.

Londrina, 02 de Junho de 2011

Profa Dra. Alexandrina Aparecida Maciel Cardelli

Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos
Universidade Estadual de Londrina

ADELA, R.; BORKAR, R. M.; BHANDI, M. M.; VISHWAKARMA, G.; REDDY, P. N.; SRINIVAS, R.; BANERJEE, S. K. Lower Vitamin D Metabolites Levels Were Associated With Increased Coronary Artery Diseases in Type 2 Diabetes Patients in India. **Sci Rep**, v. 6, p. 37593, Nov 24, 2016.

AL-DAGHRI, N. M.; GUERINI, F. R.; AL-ATTAS, O. S.; ALOKAIL, M. S.; ALKHARFY, K. M.; DRAZ, H. M.; AGLIARDI, C.; COSTA, A. S.; SAULLE, I.; MOHAMMED, A. K.; BIASIN, M.; CLERICI, M. Vitamin D receptor gene polymorphisms are associated with obesity and inflammome activity. **PLoS One**, v. 9, n. 7, p. e102141, 2014.

ALSHAHRANI, F.; ALJOHANI, N. Vitamin D: deficiency, sufficiency and toxicity. **Nutrients**, v. 5, n. 9, p. 3605-16, Sep 13, 2013.

ARTAZA, J. N.; SIRAD, F.; FERRINI, M. G.; NORRIS, K. C. 1,25(OH)₂vitamin D₃ inhibits cell proliferation by promoting cell cycle arrest without inducing apoptosis and modifies cell morphology of mesenchymal multipotent cells. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 119, n. 1-2, p. 73-83, Mar, 2010.

ARUNABH, S.; POLLACK, S.; YEH, J.; ALOIA, J. F. Body fat content and 25-hydroxyvitamin D levels in healthy women. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 88, n. 1, p. 157-61, Jan, 2003.

AUTIER, P.; BONIOL, M.; PIZOT, C.; MULLIE, P. Vitamin D status and ill health: a systematic review. **Lancet Diabetes Endocrinol**, v. 2, n. 1, p. 76-89, Jan, 2014.

BARJA-FERNANDEZ, S.; AGUILERA, C. M.; MARTINEZ-SILVA, I.; VAZQUEZ, R.; GIL-CAMPOS, M.; OLZA, J.; BEDOYA, J.; CADARSO-SUAREZ, C.; GIL, A.; SEOANE, L. M.; LEIS, R. 25-Hydroxyvitamin D levels of children are inversely related to adiposity assessed by body mass index. **J Physiol Biochem**, Jul 25, 2017.

BENER, A.; AL-ALI, M.; HOFFMANN, G. F. Vitamin D deficiency in healthy children in a sunny country: associated factors. **Int J Food Sci Nutr**, v. 60 Suppl 5, p. 60-70, 2009.

BERRY, D. J.; VIMALESWARAN, K. S.; WHITTAKER, J. C.; HINGORANI, A. D.; HYPPONEN, E. Evaluation of genetic markers as instruments for Mendelian randomization studies on vitamin D. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e37465, 2012.

BEVERIDGE, L. A.; WITHAM, M. D. Vitamin D and the cardiovascular system. **Osteoporos Int**, v. 24, n. 8, p. 2167-80, Aug, 2013.

BHALLA, A. K.; AMENTO, E. P.; CLEMENS, T. L.; HOLICK, M. F.; KRANE, S. M. Specific high-affinity receptors for 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in human peripheral blood mononuclear cells:

presence in monocytes and induction in T lymphocytes following activation. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 57, n. 6, p. 1308-10, Dec, 1983.

BIKLE, D. D.; GEE, E.; HALLORAN, B.; KOWALSKI, M. A.; RYZEN, E.; HADDAD, J. G. Assessment of the free fraction of 25-hydroxyvitamin D in serum and its regulation by albumin and the vitamin D-binding protein. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 63, n. 4, p. 954-9, Oct, 1986.

BISCHOFF-FERRARI, H. A.; WILLETT, W. C.; WONG, J. B.; STUCK, A. E.; STAEHELIN, H. B.; ORAV, E. J.; THOMA, A.; KIEL, D. P.; HENSCHKOWSKI, J. Prevention of nonvertebral fractures with oral vitamin D and dose dependency: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Arch Intern Med**, v. 169, n. 6, p. 551-61, Mar 23, 2009.

BRAKTA, S.; DIAMOND, J. S.; AL-HENDY, A.; DIAMOND, M. P.; HALDER, S. K. Role of vitamin D in uterine fibroid biology. **Fertil Steril**, v. 104, n. 3, p. 698-706, Sep, 2015.

BROWN, S.; DE LA CERDA, A.; STEPHEN, M. D. Netherton syndrome in association with vitamin D deficiency. **Cutis**, v. 99, n. 6, p. E8-E9, Jun, 2017.

BUNNELL, B. A.; FLAAT, M.; GAGLIARDI, C.; PATEL, B.; RIPOLL, C. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. **Methods**, v. 45, n. 2, p. 115-20, Jun, 2008.

BURAS, R. R.; SCHUMAKER, L. M.; DAVOODI, F.; BRENNER, R. V.; SHABAHANG, M.; NAUTA, R. J.; EVANS, S. R. Vitamin D receptors in breast cancer cells. **Breast Cancer Res Treat**, v. 31, n. 2-3, p. 191-202, 1994.

CAMBI, M. P. C.; MARCHESINI, S. D.; BARETTA, G. A. P. Post-bariatric surgery weight regain: evaluation of nutritional profile of candidate patients for endoscopic argon plasma coagulation. **ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)**, v. 28, p. 40-43, 2015.

CASHMAN, K. D.; DOWLING, K. G.; SKRABAKOVA, Z.; GONZALEZ-GROSS, M.; VALTUENA, J.; DE HENAUW, S.; MORENO, L.; DAMSGAARD, C. T.; MICHAELSEN, K. F.; MOLGAARD, C.; JORDE, R.; GRIMNES, G.; MOSCHONIS, G.; MAVROGIANNI, C.; MANIOS, Y.; THAMM, M.; MENSINK, G. B.; RABENBERG, M.; BUSCH, M. A.; COX, L.; MEADOWS, S.; GOLDBERG, G.; PRENTICE, A.; DEKKER, J. M.; NIJPELS, G.; PILZ, S.; SWART, K. M.; VAN SCHOOR, N. M.; LIPS, P.; EIRIKSDOTTIR, G.; GUDNASON, V.; COTCH, M. F.; KOSKINEN, S.; LAMBERG-ALLARDT, C.; DURAZO-ARVIZU, R. A.; SEMPOS, C. T.; KIELY, M. Vitamin D deficiency in Europe: pandemic? **Am J Clin Nutr**, v. 103, n. 4, p. 1033-44, Apr, 2016.

CAUCI, S.; MAIONE, V.; BULIGAN, C.; LINUSSIO, M.; SERRAINO, D.; STINCO, G. BsmI (rs1544410) and FokI (rs2228570) vitamin D receptor polymorphisms, smoking, and body mass index as risk factors of cutaneous malignant melanoma in northeast Italy. **Cancer Biol Med**, v. 14, n. 3, p. 302-318, Aug, 2017.

CERIT, Z. Bermuda triangle; obesity, asthma, and vitamin D deficiency. **Clin Nutr**, Sep 23, 2017.

CHAKRABORTI, C. K. Vitamin D as a promising anticancer agent. **Indian J Pharmacol**, v. 43, n. 2, p. 113-20, Apr, 2011.

CHRISTAKOS, S.; HEWISON, M.; GARDNER, D. G.; WAGNER, C. L.; SERGEEV, I. N.; RUTTEN, E.; PITTAS, A. G.; BOLAND, R.; FERRUCCI, L.; BIKLE, D. D. Vitamin D: beyond bone. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1287, p. 45-58, May, 2013.

COLOTTA, F.; JANSSON, B.; BONELLI, F. Modulation of inflammatory and immune responses by vitamin D. **J Autoimmun**, Jul 18, 2017.

CORDEIRO, A.; PEREIRA, S.; SABOYA, C. J.; RAMALHO, A. Relationship between Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Vitamin D Nutritional Status in Extreme Obesity. **Can J Gastroenterol Hepatol**, v. 2017, p. 9456897, 2017a.

CORDEIRO, A.; SANTOS, A.; BERNARDES, M.; RAMALHO, A.; MARTINS, M. J. Vitamin D metabolism in human adipose tissue: could it explain low vitamin D status in obesity? **Horm Mol Biol Clin Investig**, Jul 18, 2017b.

COREY, K. E.; KAPLAN, L. M. Obesity and liver disease: the epidemic of the twenty-first century. **Clin Liver Dis**, v. 18, n. 1, p. 1-18, Feb, 2014.

COSTA, L. D.; VALEZI, A. C.; MATSUO, T.; DICI, I.; DICI, J. B. Repercussão da perda de peso sobre parâmetros nutricionais e metabólicos de pacientes obesos graves após um ano de gastroplastia em Y-de-Roux. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgias**, v. 37, p. 096-101, 2010.

CURTAIN, C. M.; WILLIAMS, M.; COUSINS, J. M.; PETERSON, G. M.; WINZENBERG, T. Vitamin D Supplementation in Tasmanian Nursing Home Residents. **Drugs Aging**, v. 33, n. 10, p. 747-754, Oct, 2016.

DA CUNHA, A. T.; PEREIRA, H. T.; DE AQUINO, S. L.; SALES, C. H.; SENA-EVANGELISTA, K. C.; LIMA, J. G.; LIMA, S. C.; PEDROSA, L. F. Inadequacies in the habitual nutrient intakes of patients with metabolic syndrome: a cross-sectional study. **Diabetol Metab Syndr**, v. 8, p. 32, 2016.

DALY, R. M.; GAGNON, C.; LU, Z. X.; MAGLIANO, D. J.; DUNSTAN, D. W.; SIKARIS, K. A.; ZIMMET, P. Z.; EBELING, P. R.; SHAW, J. E. Prevalence of vitamin D deficiency and its determinants in Australian adults aged 25 years and older: a national, population-based study. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v. 77, n. 1, p. 26-35, Jul, 2012.

DE SOUSA STUDART, S. A.; LEITE, A. C.; MARINHO, A. L.; PINTO, A. C.; RABELO JUNIOR, C. N.; DE MELO NUNES, R.; ROCHA, H. A.; ROCHA, F. A. Vitamin D levels in juvenile idiopathic arthritis from an equatorial region. **Rheumatol Int**, v. 35, n. 10, p. 1717-23, Oct, 2015.

DUCLOUX, R.; NOBECOURT, E.; CHEVALLIER, J. M.; DUCLOUX, H.; ELIAN, N.; ALTMAN, J. J. Vitamin D deficiency before bariatric surgery: should supplement intake be routinely prescribed? **Obes Surg**, v. 21, n. 5, p. 556-60, May, 2011.

EINARSDOTTIR, K.; PREEN, D. B.; CLAY, T. D.; KIELY, L.; HOLMAN, C. D.; COHEN, L. D. Effect of a single 'megadose' intramuscular vitamin D (600,000 IU) injection on vitamin D concentrations and bone mineral density following biliopancreatic diversion surgery. **Obes Surg**, v. 20, n. 6, p. 732-7, Jun, 2010.

ELJAAFARI, A.; ROBERT, M.; CHEHIMI, M.; CHANON, S.; DURAND, C.; VIAL, G.; BENDRID, N.; MADEC, A. M.; DISSE, E.; LAVILLE, M.; RIEUSSET, J.; LEFAI, E.; VIDAL, H.; PIROLA, L. Adipose Tissue-Derived Stem Cells From Obese Subjects Contribute to Inflammation and Reduced Insulin Response in Adipocytes Through Differential Regulation of the Th1/Th17 Balance and Monocyte Activation. **Diabetes**, v. 64, n. 7, p. 2477-88, Jul, 2015.

ERBEN, R. G. Vitamin D analogs and bone. **J Musculoskelet Neuronal Interact**, v. 2, n. 1, p. 59-69, Sep, 2001.

FAN, S.; NI, X.; WANG, J.; ZHANG, Y.; TAO, S.; KONG, W.; LI, Y.; LI, J. High Prevalence of Suboptimal Vitamin D Status and Bone Loss in Adult Short Bowel Syndrome Even After Weaning Off Parenteral Nutrition. **Nutr Clin Pract**, Sep 1, 2016.

FELTON, S. J.; COOKE, M. S.; KIFT, R.; BERRY, J. L.; WEBB, A. R.; LAM, P. M.; DE GRUIJL, F. R.; VAIL, A.; RHODES, L. E. Concurrent beneficial (vitamin D production) and hazardous (cutaneous DNA damage) impact of repeated low-level summer sunlight exposures. **Br J Dermatol**, Jul 14, 2016.

FIGUIREDO-DIAS, V.; CUPPARI, L.; GARCIA-LOPES, M. G.; DE CARVALHO, A. B.; DRAIBE, S. A.; KAMIMURA, M. A. Risk factors for hypovitaminosis D in nondialyzed chronic kidney disease patients. **J Ren Nutr**, v. 22, n. 1, p. 4-11, Jan, 2012.

GANNAGE-YARED, M. H.; TOHME, A.; HALABY, G. [Hypovitaminosis D: a major worldwide public health problem]. **Presse Med**, v. 30, n. 13, p. 653-8, Apr 07, 2001.

GEE, J.; BAILEY, H.; KIM, K.; KOLESAR, J.; HAVIGHURST, T.; TUTSCH, K. D.; SEE, W.; COHEN, M. B.; STREET, N.; LEVAN, L.; JARRARD, D.; WILDING, G. Phase II open label, multi-

center clinical trial of modulation of intermediate endpoint biomarkers by 1 α -hydroxyvitamin D₂ in patients with clinically localized prostate cancer and high grade pin. **Prostate**, v. 73, n. 9, p. 970-8, Jun, 2013.

GODALA, M. M.; MATEREK-KUSMIERKIEWICZ, I.; MOCZULSKI, D.; RUTKOWSKI, M.; SZATKO, F.; GASZYNSKA, E.; TOKARSKI, S.; KOWALSKI, J. The risk of plasma vitamin A, C, E and D deficiency in patients with metabolic syndrome: a case-control study. **Adv Clin Exp Med**, Jun 27, 2017.

GOZDZIK, A.; BARTA, J. L.; WU, H.; WAGNER, D.; COLE, D. E.; VIETH, R.; WHITING, S.; PARRA, E. J. Low wintertime vitamin D levels in a sample of healthy young adults of diverse ancestry living in the Toronto area: associations with vitamin D intake and skin pigmentation. **BMC Public Health**, v. 8, p. 336, Sep 26, 2008.

HANNAH, S. S.; NORMAN, A. W. 1 α ,25(OH)₂ vitamin D₃-regulated expression of the eukaryotic genome. **Nutr Rev**, v. 52, n. 11, p. 376-82, Nov, 1994.

HATHCOCK, J. N.; SHAO, A.; VIETH, R.; HEANEY, R. Risk assessment for vitamin D. **Am J Clin Nutr**, v. 85, n. 1, p. 6-18, Jan, 2007.

HAUSSLER, M. R.; WHITFIELD, G. K.; HAUSSLER, C. A.; HSIEH, J. C.; THOMPSON, P. D.; SELZNICK, S. H.; DOMINGUEZ, C. E.; JURUTKA, P. W. The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. **J Bone Miner Res**, v. 13, n. 3, p. 325-49, Mar, 1998.

HAVAN, M.; RAZI, C. H.; BULUS, A. D.; KOKSAL, A. O.; ANDIRAN, N. Effects of 25 hydroxy vitamin D levels on the severity and asthma control in school age asthma patients. **Arch Argent Pediatr**, v. 115, n. 4, p. 336-342, Aug 01, 2017.

HIBLER, E. A.; SARDO MOLMENTI, C. L.; DAI, Q.; KOHLER, L. N.; WARREN ANDERSON, S.; JURUTKA, P. W.; JACOBS, E. T. Physical activity, sedentary behavior, and vitamin D metabolites. **Bone**, v. 83, p. 248-55, Feb, 2016.

HOLICK, M. F. Vitamin D deficiency. **N Engl J Med**, v. 357, n. 3, p. 266-81, Jul 19, 2007.

HOLICK, M. F. Vitamin D status: measurement, interpretation, and clinical application. **Ann Epidemiol**, v. 19, n. 2, p. 73-8, Feb, 2009.

HOLICK, M. F. The vitamin D deficiency pandemic: Approaches for diagnosis, treatment and prevention. **Rev Endocr Metab Disord**, v. 18, n. 2, p. 153-165, Jun, 2017.

HOLICK, M. F.; BINKLEY, N. C.; BISCHOFF-FERRARI, H. A.; GORDON, C. M.; HANLEY, D. A.; HEANEY, R. P.; MURAD, M. H.; WEAVER, C. M.; ENDOCRINE, S. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 96, n. 7, p. 1911-30, Jul, 2011.

HOLICK, M. F.; CHEN, T. C. Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. **Am J Clin Nutr**, v. 87, n. 4, p. 1080S-6S, Apr, 2008.

HOLLANDER, D.; MURALIDHARA, K. S.; ZIMMERMAN, A. Vitamin D-3 intestinal absorption in vivo: influence of fatty acids, bile salts, and perfusate pH on absorption. **Gut**, v. 19, n. 4, p. 267-72, Apr, 1978.

HOSSEIN-NEZHAD, A.; HOLICK, M. F. Vitamin D for health: a global perspective. **Mayo Clin Proc**, v. 88, n. 7, p. 720-55, Jul, 2013.

JO, J.; GAVRILOVA, O.; PACK, S.; JOU, W.; MULLEN, S.; SUMNER, A. E.; CUSHMAN, S. W.; PERIWAL, V. Hypertrophy and/or Hyperplasia: Dynamics of Adipose Tissue Growth. **PLoS Comput Biol**, v. 5, n. 3, p. e1000324, Mar, 2009.

JORDE, R.; FIGENSCHAU, Y.; HUTCHINSON, M.; EMAUS, N.; GRIMNES, G. High serum 25-hydroxyvitamin D concentrations are associated with a favorable serum lipid profile. **Eur J Clin Nutr**, v. 64, n. 12, p. 1457-64, Dec, 2010.

KILLESTEIN, J.; DEN DRIJVER, B. F.; VAN DER GRAAFF, W. L.; UITDEHAAG, B. M.; POLMAN, C. H.; VAN LIER, R. A. Intracellular cytokine profile in T-cell subsets of multiple sclerosis patients: different features in primary progressive disease. **Mult Scler**, v. 7, n. 3, p. 145-50, Jun, 2001.

KIMLIN, M. G.; DOWNS, N. J.; PARISI, A. V. Comparison of human facial UV exposure at high and low latitudes and the potential impact on dermal vitamin D production. **Photochem Photobiol Sci**, v. 2, n. 4, p. 370-5, Apr, 2003.

KONG, J.; LI, Y. C. Molecular mechanism of 1,25-dihydroxyvitamin D3 inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 cells. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 290, n. 5, p. E916-24, May, 2006.

LAGUNOVA, Z.; POROJNICU, A. C.; LINDBERG, F.; HEXEBERG, S.; MOAN, J. The dependency of vitamin D status on body mass index, gender, age and season. **Anticancer Res**, v. 29, n. 9, p. 3713-20, Sep, 2009.

LEBLANC, E. S.; RIZZO, J. H.; PEDULA, K. L.; ENSRUD, K. E.; CAULEY, J.; HOCHBERG, M.; HILLIER, T. A.; STUDY OF OSTEOPOROTIC, F. Associations between 25-hydroxyvitamin D and weight gain in elderly women. **J Womens Health (Larchmt)**, v. 21, n. 10, p. 1066-73, Oct, 2012.

LIPS, P. Vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly: consequences for bone loss and fractures and therapeutic implications. **Endocr Rev**, v. 22, n. 4, p. 477-501, Aug, 2001.

LUONG, K.; NGUYEN, L. T. Impact of vitamin D in the treatment of tuberculosis. **Am J Med Sci**, v. 341, n. 6, p. 493-8, Jun, 2011.

MAHON, B. D.; GORDON, S. A.; CRUZ, J.; COSMAN, F.; CANTORNA, M. T. Cytokine profile in patients with multiple sclerosis following vitamin D supplementation. **J Neuroimmunol**, v. 134, n. 1-2, p. 128-32, Jan, 2003.

MANSON, J. E.; MAYNE, S. T.; CLINTON, S. K. Vitamin D and prevention of cancer--ready for prime time? **N Engl J Med**, v. 364, n. 15, p. 1385-7, Apr 14, 2011.

MELAMED, M. L.; MICHOS, E. D.; POST, W.; ASTOR, B. 25-hydroxyvitamin D levels and the risk of mortality in the general population. **Arch Intern Med**, v. 168, n. 15, p. 1629-37, Aug 11, 2008.

MORAES, R. B.; FRIEDMAN, G.; WAWRZENIAK, I. C.; MARQUES, L. S.; NAGEL, F. M.; LISBOA, T. C.; CZEPIELEWSKI, M. A. Vitamin D deficiency is independently associated with mortality among critically ill patients. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 70, n. 5, p. 326-32, May, 2015.

MUHAIRI, S. J.; MEHAIRI, A. E.; KHOURI, A. A.; NAQBI, M. M.; MASKARI, F. A.; AL KAABI, J.; AL DHAHERI, A. S.; NAGELKERKE, N.; SHAH, S. M. Vitamin D deficiency among healthy adolescents in Al Ain, United Arab Emirates. **BMC Public Health**, v. 13, p. 33, Jan 14, 2013.

MUTT, S. J.; HYPPONEN, E.; SAARNIO, J.; JARVELIN, M. R.; HERZIG, K. H. Vitamin D and adipose tissue-more than storage. **Front Physiol**, v. 5, p. 228, 2014.

NAEEM, Z. Vitamin d deficiency- an ignored epidemic. **Int J Health Sci (Qassim)**, v. 4, n. 1, p. V-VI, Jan, 2010.

NAIR, R.; MASEEH, A. Vitamin D: The "sunshine" vitamin. **J Pharmacol Pharmacother**, v. 3, n. 2, p. 118-26, Apr, 2012.

NG, M.; FLEMING, T.; ROBINSON, M.; THOMSON, B.; GRAETZ, N.; MARGONO, C.; MULLANY, E. C.; BIRYUKOV, S.; ABBAFATI, C.; ABERA, S. F.; ABRAHAM, J. P.; ABU-RMEILEH, N. M.; ACHOKI, T.; ALBUHAIRAN, F. S.; ALEMU, Z. A.; ALFONSO, R.; ALI, M. K.;

ALI, R.; GUZMAN, N. A.; AMMAR, W.; ANWARI, P.; BANERJEE, A.; BARQUERA, S.; BASU, S.; BENNETT, D. A.; BHUTTA, Z.; BLORE, J.; CABRAL, N.; NONATO, I. C.; CHANG, J. C.; CHOWDHURY, R.; COURVILLE, K. J.; CRIQUI, M. H.; CUNDIFF, D. K.; DABHADKAR, K. C.; DANDONA, L.; DAVIS, A.; DAYAMA, A.; DHARMARATNE, S. D.; DING, E. L.; DURRANI, A. M.; ESTEGHAMATI, A.; FARZADFAR, F.; FAY, D. F.; FEIGIN, V. L.; FLAXMAN, A.; FOROUZANFAR, M. H.; GOTO, A.; GREEN, M. A.; GUPTA, R.; HAFEZI-NEJAD, N.; HANKEY, G. J.; HAREWOOD, H. C.; HAVMOELLER, R.; HAY, S.; HERNANDEZ, L.; HUSSEINI, A.; IDRISOV, B. T.; IKEDA, N.; ISLAMI, F.; JAHANGIR, E.; JASSAL, S. K.; JEE, S. H.; JEFFREYS, M.; JONAS, J. B.; KABAGAMBE, E. K.; KHALIFA, S. E.; KENGNE, A. P.; KHADER, Y. S.; KHANG, Y. H.; KIM, D.; KIMOKOTI, R. W.; KINGE, J. M.; KOKUBO, Y.; KOSEN, S.; KWAN, G.; LAI, T.; LEINSALU, M.; LI, Y.; LIANG, X.; LIU, S.; LOGROSCINO, G.; LOTUFO, P. A.; LU, Y.; MA, J.; MAINOO, N. K.; MENSAH, G. A.; MERRIMAN, T. R.; MOKDAD, A. H.; MOSCHANDREAS, J.; NAGHAVI, M.; NAHEED, A.; NAND, D.; NARAYAN, K. M.; NELSON, E. L.; NEUHOUSER, M. L.; NISAR, M. I.; OHKUBO, T.; OTI, S. O.; PEDROZA, A.; PRABHAKARAN, D.; ROY, N.; SAMPSON, U.; SEO, H.; SEPANLOU, S. G.; SHIBUYA, K.; SHIRI, R.; SHIUE, I.; SINGH, G. M.; SINGH, J. A.; SKIRBEKK, V.; STAPELBERG, N. J.; STURUA, L.; SYKES, B. L.; TOBIAS, M.; TRAN, B. X.; TRASANDE, L.; TOYOSHIMA, H.; VAN DE VIJVER, S.; VASANKARI, T. J.; VEERMAN, J. L.; VELASQUEZ-MELENDEZ, G.; VLASSOV, V. V.; VOLLSET, S. E.; VOS, T.; WANG, C.; WANG, X.; WEIDERPASS, E.; WERDECKER, A.; WRIGHT, J. L.; YANG, Y. C.; YATSUYA, H.; YOON, J.; YOON, S. J.; ZHAO, Y.; ZHOU, M.; ZHU, S.; LOPEZ, A. D.; MURRAY, C. J.; GAKIDOU, E. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **Lancet**, v. 384, n. 9945, p. 766-81, Aug 30, 2014.

NIMITPHONG, H.; HOLICK, M. F. Vitamin D, neurocognitive functioning and immunocompetence. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 14, n. 1, p. 7-14, Jan, 2011.

NOWSON, C. A.; MCGRATH, J. J.; EBELING, P. R.; HAIKERWAL, A.; DALY, R. M.; SANDERS, K. M.; SEIBEL, M. J.; MASON, R. S.; WORKING GROUP OF, A.; NEW ZEALAND, B.; MINERAL SOCIETY, E. S. O. A.; OSTEOPOROSIS, A. Vitamin D and health in adults in Australia and New Zealand: a position statement. **Med J Aust**, v. 196, n. 11, p. 686-7, Jun 18, 2012.

OMDAHL, J. L.; BOBROVNIKOVA, E. A.; CHOE, S.; DWIVEDI, P. P.; MAY, B. K. Overview of regulatory cytochrome P450 enzymes of the vitamin D pathway. **Steroids**, v. 66, n. 3-5, p. 381-9, Mar-May, 2001.

OMDAHL, J. L.; MORRIS, H. A.; MAY, B. K. Hydroxylase enzymes of the vitamin D pathway: expression, function, and regulation. **Annu Rev Nutr**, v. 22, p. 139-66, 2002.

OSANAI, M.; LEE, G. H. CYP24A1-induced vitamin D insufficiency promotes breast cancer growth. **Oncol Rep**, v. 36, n. 5, p. 2755-2762, Nov, 2016.

PESARINI, J. R.; OLIVEIRA, R. J.; PESSATTO, L. R.; ANTONIOLLI-SILVA, A.; FELICIDADE, I.; NARDI, N. B.; CAMASSOLA, M.; MANTOVANI, M. S.; RIBEIRO, L. R. Vitamin D:

Correlation with biochemical and body composition changes in a southern Brazilian population and induction of cytotoxicity in mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue. **Biomed Pharmacother**, v. 91, p. 861-871, May 11, 2017.

PETERS, B. S.; DOS SANTOS, L. C.; FISBERG, M.; WOOD, R. J.; MARTINI, L. A. Prevalence of vitamin D insufficiency in Brazilian adolescents. **Ann Nutr Metab**, v. 54, n. 1, p. 15-21, 2009.

PETTIFOR, J. M. Nutritional rickets: deficiency of vitamin D, calcium, or both? **Am J Clin Nutr**, v. 80, n. 6 Suppl, p. 1725S-9S, Dec, 2004.

PIERROT-DESEILLIGNY, C.; SOUBERBIELLE, J. C. Vitamin D and multiple sclerosis: An update. **Mult Scler Relat Disord**, v. 14, p. 35-45, May, 2017.

PREMAOR, M. O.; FURLANETTO, T. W. Hipovitaminose D em adultos: entendendo melhor a apresentação de uma velha doença. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, p. 25-37, 2006.

QUEIROZ, J. C. F. D.; ALONSO-VALE, M. I. C.; CURI, R.; LIMA, F. B. Controle da adipogênese por ácidos graxos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, p. 582-594, 2009.

REDDY, S. V.; RAMESH, V.; BHATIA, E. Double blind randomized control study of intramuscular vitamin D3 supplementation in tropical calcific pancreatitis. **Calcif Tissue Int**, v. 93, n. 1, p. 48-54, Jul, 2013.

RIZZOLI, R.; STOERMANN, C.; AMMANN, P.; BONJOUR, J. P. Hypercalcemia and hyperosteolysis in vitamin D intoxication: effects of clodronate therapy. **Bone**, v. 15, n. 2, p. 193-8, Mar-Apr, 1994.

ROSSNER, S. Obesity: the disease of the twenty-first century. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 26 Suppl 4, p. S2-4, Dec, 2002.

SADAF, F. Vitamin D deficiency – still a dilemma! **Anaesthesia, Pain & Intensive Care**, v. 20, n. 2, p. 2, 2016.

SAVASTIO, S.; CADARIO, F.; GENONI, G.; BELLOMO, G.; BAGNATI, M.; SECCO, G.; PICCHI, R.; GIGLIONE, E.; BONA, G. Vitamin D Deficiency and Glycemic Status in Children and Adolescents with Type 1 Diabetes Mellitus. **PLoS One**, v. 11, n. 9, p. e0162554, 2016.

SCRAGG, R. Seasonality of cardiovascular disease mortality and the possible protective effect of ultra-violet radiation. **Int J Epidemiol**, v. 10, n. 4, p. 337-41, Dec, 1981.

SERGEEV, I. N. Calcium signaling in cancer and vitamin D. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 97, n. 1-2, p. 145-51, Oct, 2005.

_____. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ induces Ca²⁺-mediated apoptosis in adipocytes via activation of calpain and caspase-12. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 384, n. 1, p. 18-21, Jun 19, 2009.

SERGEEV, I. N. The Role of Vitamin D in Obesity and Diabetes: Ca²⁺ Signaling, Insulin Secretion, Adipocyte Apoptosis, and Bone Mineralization. **The FASEB Journal**, v. 30, n. 1 Supplement, p. 128.1, April 1, 2016, 2016.

SIDDAMALLA, S.; REDDY, T. V.; GOVATATI, S.; ERRAM, N.; DEENADAYAL, M.; SHIVAJI, S.; BHANOORI, M. Vitamin D receptor gene polymorphisms and risk of polycystic ovary syndrome in South Indian women. **Gynecol Endocrinol**, p. 1-5, Sep 03, 2017.

SIDDIQUI, A. M.; KAMFAR, H. Z. Prevalence of vitamin D deficiency rickets in adolescent school girls in Western region, Saudi Arabia. **Saudi Med J**, v. 28, n. 3, p. 441-4, Mar, 2007.

SNIJDER, M. B.; VAN DAM, R. M.; VISSER, M.; DEEG, D. J.; DEKKER, J. M.; BOUTER, L. M.; SEIDELL, J. C.; LIPS, P. Adiposity in relation to vitamin D status and parathyroid hormone levels: a population-based study in older men and women. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 90, n. 7, p. 4119-23, Jul, 2005.

SONG, Q.; SERGEEV, I. N. Calcium and vitamin D in obesity. **Nutr Res Rev**, v. 25, n. 1, p. 130-41, Jun, 2012.

SPALDING, K. L.; ARNER, E.; WESTERMARK, P. O.; BERNARD, S.; BUCHHOLZ, B. A.; BERGMANN, O.; BLOMQVIST, L.; HOFFSTEDT, J.; NASLUND, E.; BRITTON, T.; CONCHA, H.; HASSAN, M.; RYDEN, M.; FRISEN, J.; ARNER, P. Dynamics of fat cell turnover in humans. **Nature**, v. 453, n. 7196, p. 783-7, Jun 05, 2008.

SUN, X.; MORRIS, K. L.; ZEMEL, M. B. Role of calcitriol and cortisol on human adipocyte proliferation and oxidative and inflammatory stress: a microarray study. **J Nutrigenet Nutrigenomics**, v. 1, n. 1-2, p. 30-48, 2008.

SUTHERLAND, E. R.; GOLEVA, E.; JACKSON, L. P.; STEVENS, A. D.; LEUNG, D. Y. Vitamin D levels, lung function, and steroid response in adult asthma. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 181, n. 7, p. 699-704, Apr 01, 2010.

THEODORATOU, E.; TZOULAKI, I.; ZGAGA, L.; IOANNIDIS, J. P. Vitamin D and multiple health outcomes: umbrella review of systematic reviews and meta-analyses of observational studies and randomised trials. **BMJ**, v. 348, p. g2035, Apr 01, 2014.

ULLAH, I.; SUBBARAO, R. B.; RHO, G. J. Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. **Biosci Rep**, v. 35, n. 2, Apr 28, 2015.

UNGER, M. D.; CUPPARI, L.; TITAN, S. M.; MAGALHAES, M. C.; SASSAKI, A. L.; DOS REIS, L. M.; JORGETTI, V.; MOYSES, R. M. Vitamin D status in a sunny country: where has the sun gone? **Clin Nutr**, v. 29, n. 6, p. 784-8, Dec, 2010.

VALLE, Y. L.; ALMALKI, S. G.; AGRAWAL, D. K. Vitamin D machinery and metabolism in porcine adipose-derived mesenchymal stem cells. **Stem Cell Res Ther**, v. 7, n. 1, p. 118, Aug 17, 2016.

VANLINT, S. Vitamin D and obesity. **Nutrients**, v. 5, n. 3, p. 949-56, Mar 20, 2013.

VIERUCCI, F.; DEL PISTOIA, M.; RANDAZZO, E.; MASSART, F.; FEDERICO, G. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**, v. 125, n. 7, p. 478-484, Jul, 2017.

VINKHUYZEN, A. A. E.; EYLES, D. W.; BURNE, T. H. J.; BLANKEN, L. M. E.; KRUTHOF, C. J.; VERHULST, F.; WHITE, T.; JADDOE, V. W.; TIEMEIER, H.; MCGRATH, J. J. Gestational vitamin D deficiency and autism spectrum disorder. **BJPsych Open**, v. 3, n. 2, p. 85-90, Mar, 2017.

VOGT, S.; BAUMERT, J.; PETERS, A.; THORAND, B.; SCRAGG, R. Waist circumference modifies the association between serum 25(OH)D and systolic blood pressure: results from NHANES 2001-2006. **J Hypertens**, v. 34, n. 4, p. 637-45, Apr, 2016.

VUOLO, L.; DI SOMMA, C.; FAGGIANO, A.; COLAO, A. Vitamin D and cancer. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 3, p. 58, 2012.

VUPPUTURI, M. R.; GOSWAMI, R.; GUPTA, N.; RAY, D.; TANDON, N.; KUMAR, N. Prevalence and functional significance of 25-hydroxyvitamin D deficiency and vitamin D receptor gene polymorphisms in Asian Indians. **Am J Clin Nutr**, v. 83, n. 6, p. 1411-9, Jun, 2006.

WALSH, J. S.; BOWLES, S.; EVANS, A. L. Vitamin D in obesity. **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes**, Sep 14, 2017.

WELSH, J. Vitamin D and Breast Cancer: Past and Present. **J Steroid Biochem Mol Biol**, Jul 23, 2017.

WOO, J.; LAM, C. W.; LEUNG, J.; LAU, W. Y.; LAU, E.; LING, X.; XING, X.; ZHAO, X. H.; SKEAFF, C. M.; BACON, C. J.; ROCKELL, J. E.; LAMBERT, A.; WHITING, S. J.; GREEN, T. J. Very high rates of vitamin D insufficiency in women of child-bearing age living in Beijing and Hong Kong. **Br J Nutr**, v. 99, n. 6, p. 1330-4, Jun, 2008.

WOOD, R. J. Vitamin D and adipogenesis: new molecular insights. **Nutr Rev**, v. 66, n. 1, p. 40-6, Jan, 2008.

YE, J.; GIMBLE, J. M. Regulation of stem cell differentiation in adipose tissue by chronic inflammation. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 38, n. 12, p. 872-8, Dec, 2011.

ZITTERMANN, A. Vitamin D in preventive medicine: are we ignoring the evidence? **Br J Nutr**, v. 89, n. 5, p. 552-72, May, 2003.

ZITTERMANN, A.; GUMMERT, J. F. Nonclassical vitamin D action. **Nutrients**, v. 2, n. 4, p. 408-25, Apr, 2010.