



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Thais Christine Maia Ceciliano

**A deficiência materna de vitamina D leva a alterações na morfologia da
ilhota pancreática e na cascata de sinalização da insulina na ilhota da prole
de camundongos *C57Bl/6* machos adultos**

Rio de Janeiro

2015

Thais Christine Maia Ceciliano

A deficiência materna de vitamina D leva a alterações na morfologia da ilhota pancreática e na cascata de sinalização da insulina na prole de camundongos C57BL/6 adultos

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Tatiane da Silva Faria
Coorientadora: Prof.^a Dra. Sandra Barbosa da Silva

Rio de Janeiro

2015

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CBA

C388 Ceciliano, Thais Christine Maia.

A deficiência materna de vitamina D leva a alterações na morfologia da ilhota pancreática e na cascata de sinalização da insulina na ilhota da prole de camundongos *CB57Bl/6* machos adultos / Thais Christine Maia Ceciliano. – 2015. 95 f.

Orientadora: Tatiane da Silva Faria.

Coorientadora: Sandra Barbosa da Silva.

Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes.

1. Vitamina D - Teses. 2. Deficiência de Vitamina D - Teses. 3. Ilhotas pancreáticas. 4. Pâncreas – Teses. I. Faria, Tatiane da Silva. II. Silva, Sandra Barbosa da. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 616.39

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB/7 - 6382

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Thais Christine Maia Ceciliano

A deficiência materna de vitamina D leva a alterações na morfologia da ilhota pancreática e na cascata de sinalização da insulina na prole de camundongos C57BL/6 adultos

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 27 de agosto de 2015.

Coorientadora: Prof^a Dra. Sandra Barbosa da Silva

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Tatiane da Silva Faria (Orientadora)

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Elaine de Oliveira

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Isis Hara Trevenzoli

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2015

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho as pessoas mais importantes da minha vida: meus pais Cristina e Valter.
Sem vocês, eu nada seria.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me permitir estar aqui;

À UERJ, pela oportunidade de realizar mais um sonho;

Aos meus pais, pelo amor incondicional, pelo exemplo e por me ensinar a nunca aceitar a derrota;

À minha orientadora, Prof. Dr. Tatiane da Silva Faria, por sua dedicação para que este trabalho e ao nosso tão suado artigo;

À minha co, Sandrinha, pelos conselhos, dicas e ajudas nos momentos importantes;

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarin-de-Lacerda, pela oportunidade em mais um passo do meu crescimento intelectual e profissional;

Aos meus ICs, Marina, Beatriz, Suzanne e Pedro, por todo auxílio nos momentos mais enrolados. E por aturar essa PG louca que queria fazer três coisas ao mesmo tempo;

À melhor amiga Rosane, minha bióloga favorita, por estar comigo em todos os momentos, e por ler essa dissertação por várias vezes, sempre com várias dicas. E obrigada por continuar dividindo a Jujuba (Júlia) comigo;

À amiga Mari, irmã que a UERJ me deu, pela companhia de sempre;

Às amigas Thaty e Verônica, companheiras de profissão, pelas ajudas e risadas sem fim no laboratório;

Ao amigo Victor, pela amizade, pelas conversas sem fim, pelos almoços mais legais e as primordiais ajudas quando o endnote não funciona ou o computador não liga mais;

Aos companheiros e técnicas do LMMC por toda ajuda e convivência;

Aos professores dessa jornada, que dividiram conosco seu bem mais preciso: o conhecimento;

Aos meus anjinhos, Vô Daniel, Dinda Dalva, Tia Regina, por sempre me amar, torcer e olhar por mim. Vocês me fazem muita falta!

Descobrir consiste em olhar para o que todo mundo está vendo e pensar em algo diferente.

Roger Von Oech

RESUMO

CECILIANO, Thais Christine Maia. **A deficiência materna de vitamina D leva a alterações na morfologia da ilhota pancreática e na cascata de sinalização da insulina na prole de camundongos *C57BL/6* adultos.** 2015. 95f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Investigar os efeitos da deficiência materna de Vitamina D no metabolismo da glicose, morfologia pancreática e na cascata de sinalização da insulina. Foi estudada a prole de camundongos *C57BL/6* provenientes de mães alimentadas com uma das duas dietas: SC (controle) ou VitD⁻ (deficiente em vitamina D). Avaliou-se a biometria, a bioquímica, a morfologia pancreática e a expressão de proteínas das ilhotas pancreáticas. Os camundongos VitD⁻ tiveram a massa corporal aumentada do nascimento até a 5^a semana de vida quando comparadas com os camundongos SC. A prole VitD⁻ apresentou uma maior área sob a curva no teste oral de tolerância a glicose, hiperglicemia, seguido de menores massas de células-beta pancreática e da ilhota, seguida de hipoinsulinemia. Além disso, os camundongos VitD⁻ demonstraram uma redução dos componentes da cascata de sinalização da insulina, IRS-1, PI3-K, PDK-1, AKT e aumento de FoxO1 que possivelmente reduziu a expressão de PDX-1, o provável responsável pelas alterações pancreáticas. Juntamente a isto, a expressão de GLUT-2 e GLK foram reduzidas. Estes resultados fornecem evidências convincentes de que a deficiência materna de vitamina D afeta o desenvolvimento do pâncreas da prole causando alteração metabólica no metabolismo de glicose, alterações estruturais e na cascata de insulina.

Palavras-chave: Deficiência de vitamina D. Morfologia pancreática. Cascata da insulina.

Pâncreas.

ABSTRACT

CECILIANO, Thais Christine Maia. **Maternal vitamin D deficiency leads to changes in pancreatic islet morphology and in the insulin signaling pathway in the pancreatic islet of offspring male c57bi/6 mice.** 2015. 95f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

To investigate the effects of maternal vitamin D deficiency in glucose metabolism, pancreatic morphology and insulin signaling pathway. We studied the *C57BL/6* offspring of from mothers fed one of two diets: SC (standard chow) or VitD⁻ (vitamin-D-deficient). We evaluated the biometry, biochemistry, pancreatic morphology and the expression of proteins in the pancreatic islets. The VitD⁻ mice had increased body weight from birth until the 5th week of life when compared with mice SC. The VitD⁻ offspring showed greater area under the curve of the oral glucose tolerance test, hyperglycemia, followed by reduced the pancreatic beta-cells and the islet masses, then showed hypoinsulinemia. Furthermore, VitD⁻ mice demonstrate a reduction of components of the insulin signaling pathway, IRS-1, PI3-K, PDK-1, AKT and increased FoxO1 as possibly reduced the expression of PDX-1, likely responsible for pancreatic alterations. Along with this, the expression of GLUT-2 and GLK was reduced. These results provide compelling evidence that maternal vitamin D deficiency affects the development of the offspring of the pancreas causing metabolic changes in glucose metabolism, structural changes and insulin cascade.

Keywords: Vitamin D deficiency. Pancreatic morphology. Insulin pathway. Pancreas.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Desenvolvimento da programação fetal, alterações a níveis orgânicos e doenças crônicas a longo prazo.....	20
Figura 2 –	Metabolismo da Vitamina D, desde a obtenção, a sua forma circulante e ativa e as diversas funções no organismo devido a vasta presença de VDR em quase todos os órgãos.....	23
Figura 3 –	Ativação de VDR por $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e a transcrição de genes regulados pela vitamina D.....	24
Figura 4 –	Fatores de risco para baixos níveis séricos de $25(\text{OH})\text{D}$	27
Figura 5 –	Hipovitaminose D durante a gestação.....	30
Figura 6 –	Representação ilustrativa das células pancreáticas.....	33
Figura 7 –	Ativação de PDX-1 através da fosforilação.....	35
Figura 8 –	A atuação de elevados níveis de PDX-1 e a regulação da célula-beta pancreática pelo receptor peroxissomal gama ativado por proliferadores (PPAR).....	36
Figura 9 –	Via de sinalização da insulina PI3-K/AKT e sua relação da FoxO1 com PDX-1 em células-beta pancreática.....	39
Figura 10 –	Fosforilação da FoxO1 regulando a transcrição do PDX-1	44
Figura 11 –	Linha do tempo do experimento.....	47
Figura 12 –	Procedimento de isolamento de ilhota pancreática.....	51
Figura 13 –	Análise do diâmetro da ilhota pancreática.....	53
Figura 14 –	Determinação da área média da ilhota.....	54
Figura 15 –	Segmentação da ilhota pancreática para obtenção da densidade de volume da insulina.....	56
Figura 16 –	Evolução de massa corporal nas fases iniciais da vida.....	62
Figura 17 –	Evolução de massa corporal do nascimento à 12 ^a semana de idade.....	63
Figura 18 –	Teste oral de tolerância à glicose (TOTG) dos grupos aos três meses de idade.....	64
Figura 19 –	Massa pancreática obtida no momento do sacrifício com e sem correção da massa corporal.....	66
Figura 20 –	Morfometria da ilhota.....	67

Figura 21 – Massa de células-beta da ilhota pancreática e fotomicrografias de ilhotas pancreáticas em imunofluorescência.....	68
Figura 22 – Análise da expressão de VDR e CYP27B1 pelo <i>western blotting</i> nas ilhotas pancreáticas aos três meses de vida.....	69
Figura 23 – Análise da expressão de PDX-1 e Insulina pelo <i>western blotting</i> nas ilhotas pancreáticas aos três meses de vida.....	70
Figura 24 – Análise da expressão de GLUT-2 e GLK pelo <i>western blotting</i> nas ilhotas pancreáticas aos três meses de vida.....	71
Figura 25 – Análise da expressão de IRS-1 e PI3-K pelo <i>western blotting</i> nas ilhotas pancreáticas aos três meses de vida.....	72
Figura 26 – Análise da expressão de PDK-1 e a razão entre pAKT e AKT pelo <i>western blotting</i> nas ilhotas pancreáticas aos três meses de vida.....	73
Figura 27 – Análise da expressão de FoxO1 e a razão entre pFoxO1 e FoxO1 pelo <i>western blotting</i> nas ilhotas pancreáticas aos três meses de vida.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Composição das dietas experimentais.....	46
Tabela 2 –	Dados de ganho de peso, crescimento, glicemia e dosagem de vitamina D circulante das progenitoras.....	60
Tabela 3 –	Dados de ingestão alimentar e bioquímicos da prole aos três meses de idade.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1,25(OH) ₂ D ₃	1 α ,25-di-hidroxitamina D ₃ , calcitriol
25(OH)D	25-hidroxitamina D
A _[ilhota]	Área seccional média da ilhota
AIN93G	Dieta segundo o Instituto Americano de Nutrição
AKT	Proteína cinase B
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
ASC	Área Sob a Curva
CYP27B1	Citocromo P450, família 27, subfamília B, polipeptídeo 1 mitocondrial, 1 α -hidroxilase
DAB	Cromógeno diaminobenzidina
DBP	Proteína de ligação da vitamina D
DCV	Doenças cardiovasculares
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DP	Desvio padrão da média
DHGNA	Doença Hepática Gordurosa Não-alcoólica
FoxO1	Fator de transcrição <i>forkhead box</i> O1
G-6-P	Glicose-6-fosfato
GLK	Glicocinase
GLP-1	Peptídeo semelhante ao glucagon 1
GLUT-2	Transportador de glicose 2
GSIS	Secreção de insulina estimulada pela glucose
HE	Hematoxilina e eosina
IGFR	Fator de crescimento semelhante a insulina
IL-1	Interleucina 1
IRS	Substrato do receptor de insulina
IURG	Retardo no crescimento intrauterino
M/SC	Mães alimentada com dieta padrão, com vitamina D;
M/VitD ⁻	Mães alimentadas com dieta deficiente em vitamina D.
M _[células-beta]	Massa de células-beta
MC	Massa corporal
MP	Massa do pâncreas

miRNA	MicroRNA
mVDR	Receptor de membrana não clássico da vitamina D
pFoxo	Fator de transcrição <i>forkhead box</i> O1 fosforilado
PDK-1	3-fosfoinosítídeo proteína cinase dependente 1
PI3-K	Fosfatidilinositol-3-cinase
PIP ₃	Fosfatidilinositol (3, 4, 5) trifosfato
PKA	Proteína Cinase A
PKB	Proteína Cinase B
PTEN	Proteína tirosina fosfatase
PTH	Paratormônio
Q _A área total	Número de ilhotas por área teste pela área total
SLN	Sinal de localização nuclear
SRA	Sistema renina-angiotensina
TOTG	Teste oral de tolerância à glicose
UVb	Radiação Ultravioleta do tipo B
VDR	Receptor de vitamina D
VDR-RXR	Complexo receptor da vitamina D
VDRE	Elemento responsivo a vitamina D
VitD ⁻	Prole macho oriunda de mãe deficiente de vitamina D, do grupo M/VitD ⁻
Vitamina D ₂	Ergocalciferol
Vitamina D ₃	Colecalciferol
V _{v[células-beta]}	Densidade de volume de células-beta
V _{v[ilhota]}	Densidade de volume da ilhota

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
μm	Micrometro
cm	Centímetro
dL	Decilitro
g	Gramma
Kg	Kilogramma
L	Litro
M	Mol
mL	Mililitro
nm	Nanometro

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	16
1	OBJETIVOS	18
1.1	Objetivo geral	18
1.2	Objetivos específicos	18
2	REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1	Programação Fetal	19
2.2	Vitamina D	22
2.2.1	<u>Receptor de Vitamina D (VDR)</u>	24
2.2.2	<u>1α-hidroxilase (CYP27B1)</u>	25
2.2.3	<u>Deficiência de Vitamina D</u>	26
2.3	Programação Fetal e Deficiência de Vitamina D	28
2.4	Vitamina D e Ilhota Pancreática	30
2.5	Pâncreas	32
2.5.1	<u>Insulina</u>	33
2.5.2	<u>PDX-1</u>	34
2.5.3	<u>GLUT-2 e GLK</u>	37
2.6	Via de Sinalização da Insulina	38
2.6.1	<u>IRS-1</u>	39
2.6.2	<u>PI3-K</u>	40
2.6.3	<u>PDK-1</u>	41
2.6.4	<u>AKT e pAKT</u>	42
2.6.5	<u>FoxO1 e pFoxO1</u>	42
3	MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1	Animais e Dieta	45
3.2	Experimentos Maternos	47
3.3	Experimentos na Prole	48
3.3.1	<u>Biometria e Ingestão Alimentar</u>	48
3.3.2	<u>Glicemia e Teste Oral de Tolerância a Glicose</u>	49
3.3.3	<u>Eutanásia</u>	49
3.3.4	<u>Bioquímica</u>	50

3.3.5	<u>Isolamento de Ilhotas Pancreáticas</u>	50
3.3.6	<u>Análise Microscópica do Pâncreas</u>	52
3.3.7	<u>Diâmetro da Ilhota</u>	52
3.3.8	<u>Área Média da Ilhota</u>	53
3.3.9	<u>Imunoperoxidase</u>	55
3.3.10	<u>Massa de Células-Beta</u>	55
3.3.11	<u>Imunofluorescência</u>	56
3.3.12	<u>Western Blotting</u>	57
3.4	Análise Estatística dos Dados	59
4	RESULTADOS	60
4.1	Dados maternos	60
4.2	Dados da prole	61
4.2.1	<u>Dados Biométricos: Ingestão alimentar e da massa corporal das proles</u>	61
4.2.2	<u>Teste Oral de Tolerância a Glicose (TOTG) das proles</u>	64
4.2.3	<u>Análise bioquímica das proles</u>	65
4.2.4	<u>Avaliação da massa do pâncreas das proles</u>	66
4.2.5	<u>Avaliação estereológica das ilhotas pancreáticas das proles</u>	67
4.2.6	<u>Avaliação da expressão proteica de VRD e CYP27B1 na ilhota pancreática</u>	69
4.2.7	<u>Avaliação da expressão proteica de PDX-1, Insulina, GLUT-2 e GLK na ilhota pancreática</u>	70
4.2.8	<u>Avaliação da expressão proteica dos componentes da via de sinalização da insulina na ilhota pancreática</u>	72
5	DISCUSSÃO	75
	CONCLUSÃO	80
	REFERÊNCIAS	81
	ANEXO A – Comitê de ética	84
	ANEXO B – Prêmio de apresentação oral.....	85
	ANEXO C – Artigo final publicado.....	86

INTRODUÇÃO

A vitamina D foi descoberta no início do século XX e na época tinha como função curar e prevenir o raquitismo (Bouillon *et al.*, 2008). Sua origem pode advir pela comida, em peixes gordurosos, como salmão, ovo, manteiga e fígado e principalmente através da síntese cutânea através da exposição aos raios UVb (Holick, 2006; Wagner *et al.*, 2008). A forma ativa da vitamina D3, 1,25-di-hidroxitamina D3 [1,25(OH)₂D₃], regula o metabolismo do cálcio e a maioria dos seus efeitos biológicos em tecidos-alvo, incluindo os rins, intestino e osso (DeLuca, 1988; Reichel *et al.*, 1989) através da ativação do receptor de vitamina D (VDR) (Haussler *et al.*, 1998). As funções clássicas da vitamina D incluem transporte de cálcio manutenção fisiológica e mineralização óssea (DeLuca e Zierold, 1998) aumentando a absorção intestinal de cálcio (Holick, 1994). As concentrações circulantes de 25-hidroxitamina D (25(OH)D) são consideradas um indicador de *status* da vitamina D (Heaney, 2004). Estudos têm demonstrado que a deficiência de vitamina D é um fator de risco de doenças crônicas, como doença cardiovascular (Pilz *et al.*, 2011), hipertensão (Vaidya e Forman, 2010) e síndrome metabólica (Martini e Wood, 2006).

Tem sido demonstrado que a vitamina D influencia na homeostase da glicose (Pittas *et al.*, 2007). A vitamina D atua em células-beta pancreáticas (Johnson *et al.*, 1994), também regula a expressão da enzima 1 α -hidroxilase, também conhecido como citocromo P450, família 27, subfamília B, polipeptídeo 1 mitocondrial (CYP27B1), em células-beta do pâncreas, que catalisam a conversão de 25(OH)D para 1,25(OH)₂D₃ (Zeitz *et al.*, 2003).

Além disso, a literatura não é conclusiva sobre a relação da programação fetal pela deficiência materna de vitamina D (Materna/VitD). Embora os mecanismos ainda não tenham sido definidos, a deficiência ou restrição em vitamina D pode atuar diretamente sobre a organogênese da prole (Nascimento *et al.*, 2012, 2013). Estudos recentes têm mostrado que a restrição materna de vitamina D pode causar alterações metabólicas (Nascimento *et al.*, 2013), doenças crônicas na idade adulta, como hipertensão (Nascimento *et al.*, 2012) e aumento da adiposidade (Crozier *et al.*, 2012). Uma nutrição adequada durante os períodos de pré-natal e pós-natal imediato é fundamental para o desenvolvimento do pâncreas endócrino. Os dados epidemiológicos de diferentes estudos em humanos (Green *et al.*, 2010) e em animais (Fernandez-Twinn *et al.*, 2005) demonstraram que a desnutrição durante a vida intrauterina é ligada a um aumento da incidência de tolerância diminuída à glicose e diabetes mellitus tipo 2 em adultos (Fowden e Hill, 2001).

O fator mais importante para o crescimento e função das células-beta é a transcrição do gene pancreato-duodenal *homebox-1* (PDX-1) (Jonsson *et al.*, 1994; Ahlgren *et al.*, 1998). Durante a organogênese pancreática de camundongos, o PDX-1 é produzido no epitélio pancreático entre os dias embrionários 9,5 e 14,5 e torna-se exclusivamente produzida em células-beta no período pós-natal (Guz *et al.*, 1995; Ahlgren *et al.*, 1996). Além de ser o principal regulador do gene da insulina, o PDX-1 também regula a expressão do transportador de glicose 2 (GLUT-2) (Waeber *et al.*, 1996), glicocinase (GLK) (Watada *et al.*, 1996b) e polipeptídeo amiloide das ilhotas pancreáticas (Watada *et al.*, 1996a).

Estudos sobre o mecanismo da ação da insulina levou à descoberta do receptor tirosina-cinase da insulina, o papel central da fosforilação de tirosina durante a sinalização da insulina, e várias proteínas de ligação de sinalização diretamente acionados por motivos de fosfotirosina que ocorrem nos complexos de receptores ativados (Hancer *et al.*, 2014). Estudos genéticos revelaram que a sinalização de insulina desempenha um papel no crescimento e função das células-beta (Kulkarni *et al.*, 1999; Ueki *et al.*, 2006).

Os substratos do receptor de insulina (IRSs) são as principais proteínas envolvidas em vias de sinalização intracelular (Burnol *et al.*, 2013). A 3-fosfoinositídeo proteína cinase dependente 1 (PDK-1) é uma serina-treonina-cinase que medeia a sinalização juntamente a fosfatidilinositol-3-cinase (PI3-K). O papel da PDK-1 na regulação do crescimento de ilhotas foi demonstrado pela eliminação específica de PDK-1 em células-beta em camundongos (Hashimoto *et al.*, 2006). A proteína cinase B (AKT) é um mediador importante dos efeitos da insulina como metabolismo de glicose, apoptose, proliferação celular através de uma variedade de fatores de crescimento, migração celular e transcrição de genes, incluindo o da própria insulina (Peng *et al.*, 2012).

Um outro fator, o fator de transcrição *forkhead box O1* (FoxO1) desempenha um papel-chave no processo de apoptose, proliferação e diferenciação celular e no metabolismo da glicose, através da regulação da transcrição de vários genes alvo (Accili e Arden, 2004). O FoxO1 é um regulador negativo da proliferação das células-beta e neogênese (Kitamura *et al.*, 2002). Além disso, os componentes da via de sinalização de insulina regulam negativamente a atividade do FoxO1. (Kitamura e Ido Kitamura, 2007).

Estudos relacionando a deficiência materna de vitamina D e via de sinalização da insulina no pâncreas são escassos. Então, sugerimos que baixas concentrações de vitamina D durante o período de desenvolvimento causa alterações metabólicas e morfológicas no pâncreas e na via de sinalização da insulina da prole durante a vida adulta.

1. OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da deficiência materna de vitamina D, durante a gestação e a lactação, no metabolismo da glicose, no remodelamento pancreático e na cascata de sinalização da insulina na prole adulta de camundongos *C57Bl/6* machos.

1.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar o impacto da dieta materna sobre a massa corporal da prole;
- b) Avaliar a tolerância à glicose e os níveis séricos de insulina da prole;
- c) Avaliar o remodelamento pancreático da prole na vida adulta, sobre:
 - Área média da ilhota;
 - Diâmetro da ilhota;
 - Massa de células-beta;
- d) Avaliar a expressão pancreática das proteínas ligadas a/ao:
 - Receptor de vitamina D (VDR) e da enzima ativadora da vitamina D, a 1α -hidroxilase (CYP27B1);
 - Desenvolvimento e manutenção do pâncreas (PDX-1);
 - Participantes do metabolismo de glicose (GLUT-2 e GLK);
 - Cascata de sinalização de insulina (Insulina, IRS-1, PI3-K, PDK-1, AKT, pAKT, FoxO1 e pFoxO1).

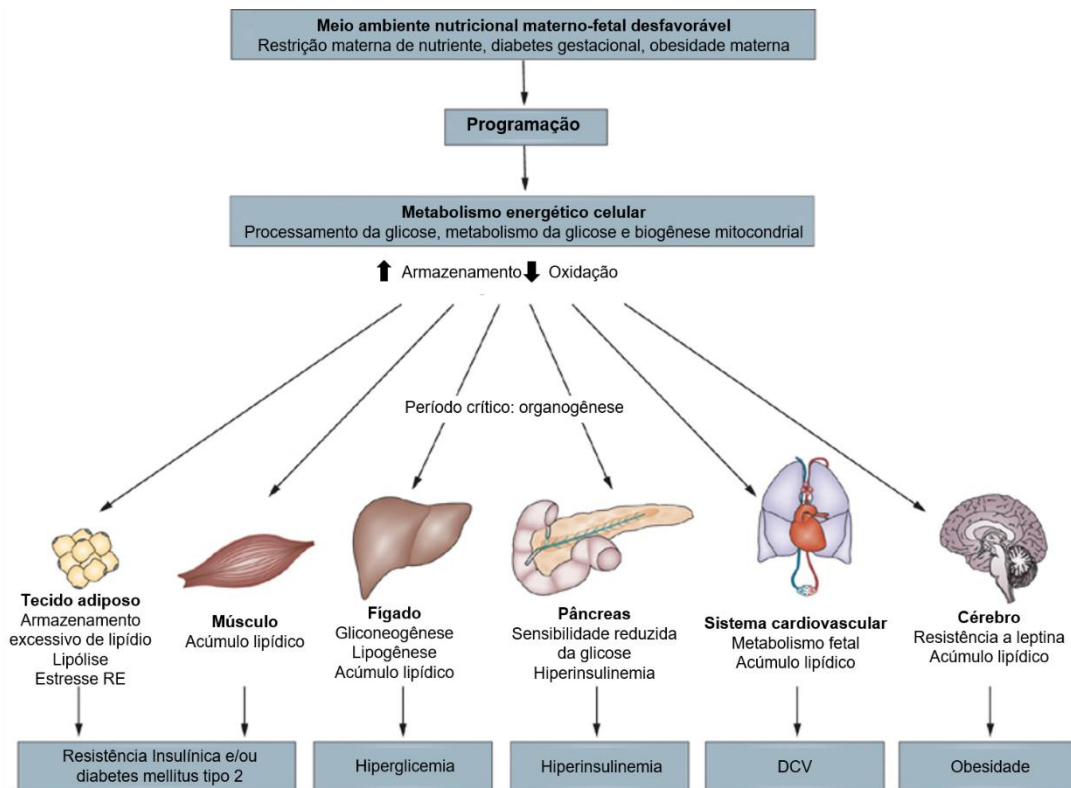
2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Programação

O crescimento intrauterino normal depende do potencial genético do indivíduo, e pode ser modulado por fatores hormonais, ambientais, e ou fatores biológicos incluindo a saúde e a nutrição materna (Botero e Lifshitz, 1999). Em 1991, o conceito de programação fetal foi definido como uma resposta permanente do organismo a um estímulo ou insulto durante o período crítico de desenvolvimento (Lucas, 1991), porém este conceito pode ser estendido para incluir a origem fetal do desempenho do crescimento pós-natal, porque o processo depende tanto das taxas quanto da eficiência das transformações metabólicas dos nutrientes, que são influenciadas por perturbações metabólicas, endócrinas e cardiovasculares (Wu *et al.*, 2006).

A programação fetal pressupõe que alterações nas funções de órgãos específicos é resultado da exposição intrauterina a condições ambientais adversas (Hoet e Hanson, 1999; Armitage *et al.*, 2004), determinando a funcionalidade de órgãos e sistemas e a susceptibilidade do recém-nascido ao desenvolvimento de doenças na vida adulta. Assim, o ambiente intrauterino determina as possíveis circunstâncias ambientais as quais o feto estará exposto após o nascimento e as modificações estruturais e funcionais que permitiriam ao recém-nato maiores chances de sobrevivência. Na maioria das vezes, no entanto, estas modificações contribuem para o desenvolvimento de doenças a longo prazo (Figura 1), se estas adaptações são contraditórias com o ambiente encontrado após o nascimento (Hales e Barker, 2013).

Figura 1 - Desenvolvimento da programação fetal, função dos órgãos e doenças crônicas a longo prazo



Legenda: Estresse RE, estresse do retículo endoplasmático; DCV, doenças cardiovasculares.
 Fonte: (Symonds *et al.*, 2009).

O modelo animal é amplamente estudado a fim de avaliar fisiologicamente e bioquimicamente os mecanismos moleculares que causam um *imprinting* metabólico na prole. Devido a isto, é crescente o número de estudos sobre a programação fetal em diversos modelos animais com a exposição intrauterina da prole sobre diversos fatores como: tabagismo (Al-Odat *et al.*, 2014), exposição ao álcool (Sarkar, 2015), exposição a cafeína (Serapiao-Moraes *et al.*, 2013), hipóxia placentária (Hauton *et al.*, 2015) e o estresse nutricional (Ornellas *et al.*, 2015). Diferentes estudos são encontrados na literatura destacando o estresse nutricional como crítico para alterações em diversos órgãos como coração (Beauchamp *et al.*, 2015), pâncreas (Graus-Nunes *et al.*, 2015), rins (Nascimento *et al.*, 2012) além de alterações metabólicas destes animais (Li *et al.*, 2015b).

Langley-Evans e Sculley confirmaram que a restrição proteica materna durante a gestação reduz a expectativa de vida em ratos, quando a restrição persiste por todo o período

gestacional (Langley-Evans e Sculley, 2006). O mecanismo para esta programação ainda é uma lacuna aberta, porém a literatura sugere que o encurtamento dos telômeros é mais rápido em ratos expostos a dieta hipoproteica materna gestacional do que em ratos que oriundo de mães alimentadas com uma dieta normoproteica (Jennings *et al.*, 1999). Diversos estudos tem surgido a fim de entender a programação fetal, e com isso tem encontrado um importante papel dos processos moleculares epigenéticos na produção destes efeitos, processos que são alvos de regiões promotoras de genes específicos de tecidos específicos. Isto inclui alterações na metilação de DNA, e também na estrutura de histonas associada com a supressão da transcrição genética (Hanson e Gluckman, 2008).

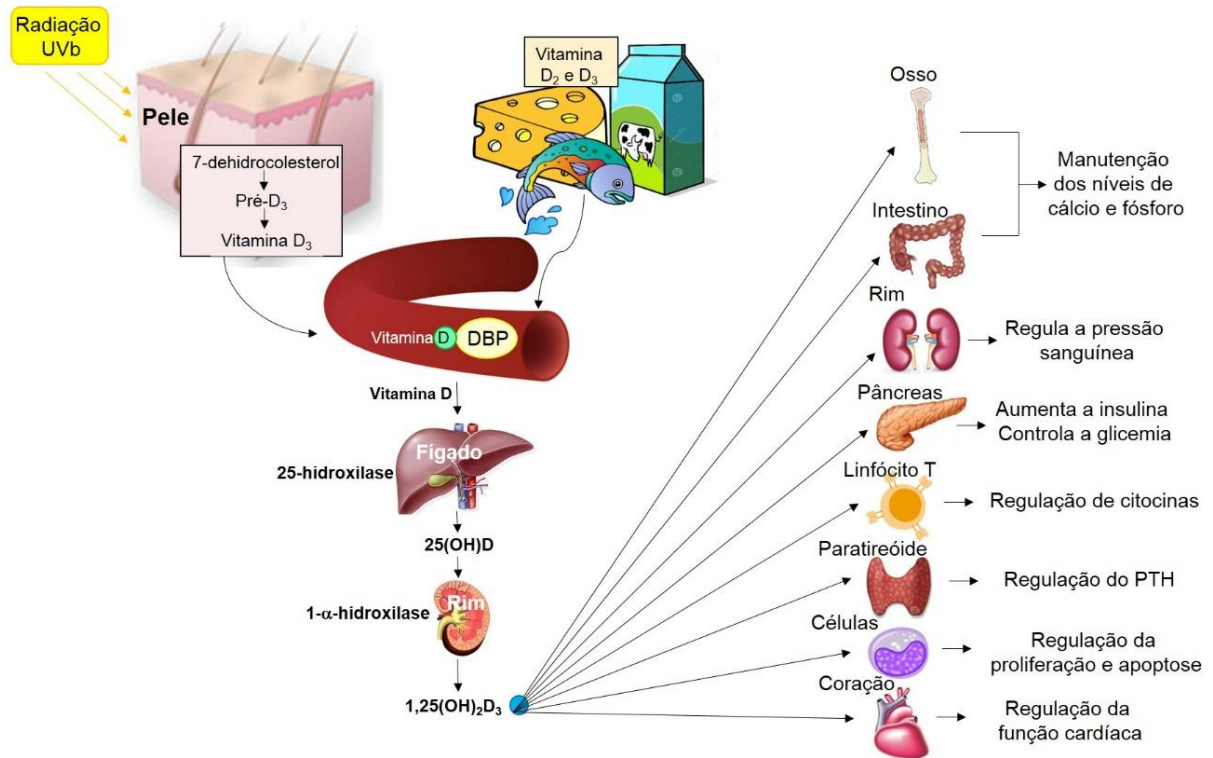
Em roedores, assim como em humanos, a glicose é o principal substrato energético para o desenvolvimento fetal, sendo decorrente da circulação materna. O principal hormônio para o crescimento fetal é a insulina produzida e secretada pelas ilhotas pancreáticas fetais (Brett *et al.*, 2014; Araujo *et al.*, 2015; Sosa-Larios *et al.*, 2015). Ao fim da gestação, o feto já é capaz de regular autonomamente sua própria homeostasia da glicose (Aerts e Van Assche, 2003). Assim, a insulina produzida pelo feto exerce duas principais funções: estimular o crescimento fetal e controlar a glicemia. O diabetes materno durante a gestação, induz a alterações e adaptações na atividade do pâncreas fetal, em resposta ao aumento do suprimento de glicose da mãe para o feto (Holemans *et al.*, 2003). A hiperglicemia crônica no meio intrauterino em ratas prenhas induz a hiperglicemia e hipoinsulinemia na prole logo ao nascimento, além de retardo no crescimento intrauterino (Van Assche *et al.*, 2001). O peso do pâncreas fetal está diminuído embora a porcentagem de tecido endócrino estar aumentada (Aerts e van Assche, 1977). A maneira como a hiperglicemia materna causa distúrbios no desenvolvimento e função da prole ainda permanece por ser elucidada.

Em neonatos submetidos a dieta hipoproteica durante a fase fetal, observou-se uma redução no tamanho da ilhota pancreática, assim como alterações na capacidade de proliferação das células (Snoeck *et al.*, 1990). Entretanto, em ratos recém-desmamados, submetidos a restrição proteica durante a fases gestacional e lactacional, constatou-se que a capacidade proliferativa das células beta-pancreáticas aparenta normalidade, embora a massa de células-beta estivesse diminuída. Estes achados suportam a ideia que os mecanismos pelos quais a desnutrição afeta o desenvolvimento da célula-beta podem variar com o período que ela foi imposta (Garofano *et al.*, 1997; Holness *et al.*, 2000).

2.2 Vitamina D

A vitamina D é um hormônio esteroide essencial que participa de variadas reações fisiológicas, classicamente conhecida como o regulador do metabolismo ósseo (Christakos *et al.*, 2014; Szabo *et al.*, 2015), porém atualmente lhe foi atribuída diversas outras funções nos mais variados tecidos (Christakos *et al.*, 2013). Suas fontes, funções e metabolismo encontram-se extensivamente listados na literatura (Sinha *et al.*, 2013; Wacker e Holick, 2013; Halfon *et al.*, 2015). Existem duas principais formas de vitamina D, que se diferem apenas na cadeia lateral: a vitamina D₂ (ergocalciferol) e a D₃ (colecalfiferol). A vitamina D₂ provém de fontes vegetais, levedura e centeio, e também é disponibilizada comercialmente sob a forma de suplemento vitamínico; já a vitamina D₃ provém de fontes animais presentes na dieta, principalmente na gema de ovo, óleo de fígado de bacalhau e peixes como o salmão, atum e sardinha; mas sua maior fonte de produção é a pele. As glândulas sebáceas presentes na derme atuam na conversão da pró-vitamina, a 7-dehidrocolesterol em vitamina D₃ quando exposta à radiação ultravioleta b (UVb), com comprimento de onda entre 290 e 315 nm, e ao calor. Uma vez que, absorvida no intestino (D₂) ou formada principalmente na pele (D₃), a vitamina D é transportada para o fígado, através da circulação sanguínea, conjugada à proteína de ligação da vitamina D (DBP), onde sofre sua primeira hidroxilação pela 25-hidroxilase, tornando-se 25(OH)D, também conhecida calcidiol, que pode se acumular nos tecidos adiposos ou permanecer circulante no sangue quando associada a DBP. No entanto, para a vitamina D exercer as funções fisiológicas nas células-alvo, a 25(OH)D precisa ser convertida em sua forma ativa, também chamada de calcitriol (1,25-dihidroxitammina D (1,25(OH)₂D₃)), pela 1-hidroxilase, também conhecida como CYP27B1, localizada na membrana mitocondrial interna nas células do túbulo proximal dos rins, através da segunda hidroxilação ocorrida no rim sendo capaz de ativar efetivamente o VDR e regular diretamente a expressão gênica (Hamilton, 2010) (Figura 2).

Figura 2 - Metabolismo da Vitamina D, desde a obtenção, a sua forma circulante e ativa e as diversas funções no organismo devido a vasta presença de VDR em quase todos os órgãos



Legenda: UVb, radiação ultravioleta do tipo B; DBP, proteína de ligação da vitamina D; 25(OH)D, calcidiol; 1,25(OH)₂D₃, calcitriol; PTH, paratormônio.

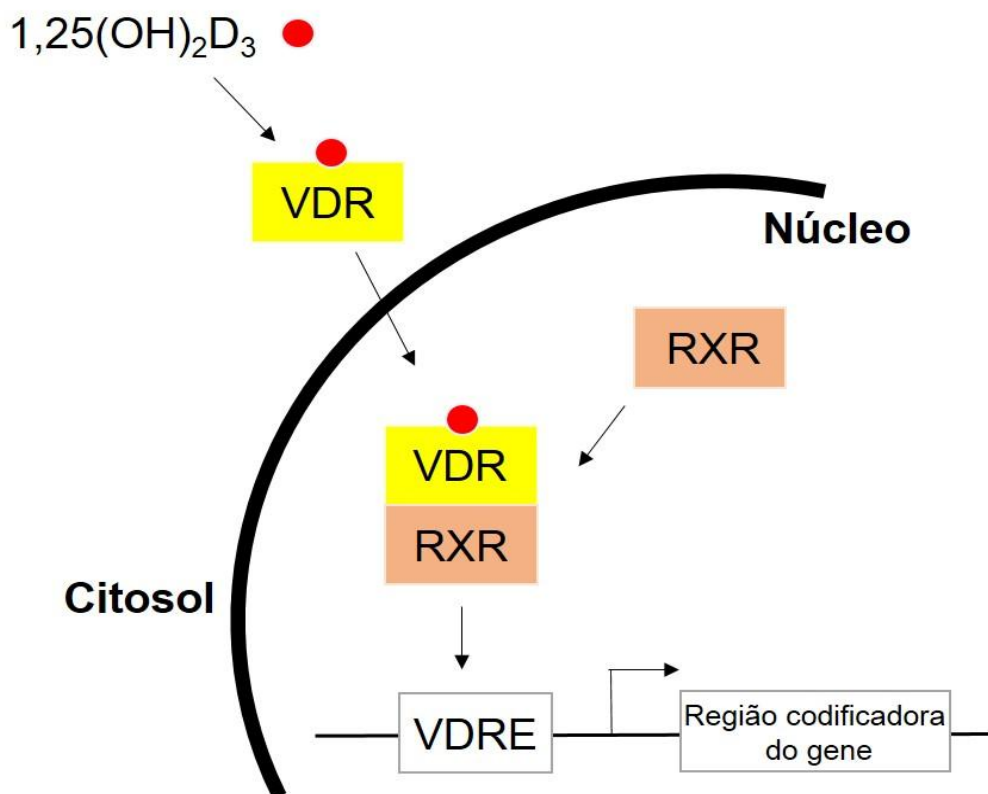
Fonte: A autora, 2015.

A vitamina D exerce suas funções de duas maneiras: pela via de sinalização genômica e por vias não-genômicas. A primeira é ativada pela ligação hormônio/VDR em que estes receptores intracelulares específicos se ligam a sequencias regulatórias dos genes alvo, modulando a atividade transcricional da região promotora. Enquanto as vias não-genômicas são ativadas pela ligação da vitamina D a um receptor de membrana não clássico (mVDR), causando uma série de alterações intracelulares transitória e rápida (de segundos a minutos) não dependentes da síntese proteica. Esses efeitos envolvem alterações transitórias no transporte transmembranar de íons como o cálcio (Walters, 1992).

2.2.1 Receptor de vitamina D (VDR)

O receptor da vitamina D pertence à superfamília dos receptores nucleares dos fatores reguladores da transcrição dos hormônios esteroides, ácido retinóico, hormônio tireoidiano e vitamina D. Após a ligação da $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ com o VDR, este interage com o receptor do ácido retinóico, formando um complexo heterodimérico (RXR-VDR) que, por sua vez, se liga a sequências específicas do DNA, conhecidas como elemento responsivo à vitamina D (VDRE) (Walters, 1992) (Figura 3).

Figura 3 - Ativação de VDR por $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e a transcrição de genes regulados pela vitamina D



Legenda: Após a ligação de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e a translocação para o núcleo da célula, VDR sofre de heterodimerização com RXR e, em seguida, liga-se a elementos específicos da região do promotor de genes responsivos de vitamina D VDR, receptor de vitamina D; RXR, receptor retinóico X; VDRE, elemento responsivo a vitamina D.

Fonte: A autora, 2015.

O VDR é um receptor nuclear ligante dependente que regula a expressão de mais de 900 genes ao longo do genoma (Kongsbak *et al.*, 2013).

Vários sistemas biológicos possuem o VDR e são sensíveis à vitamina D. Uma vez que, uma das principais funções biológicas desta vitamina é o de manter a homeostase do cálcio, através da reabsorção de cálcio e fosfato nos intestinos e rins. Outra ação típica de vitamina D é a supressão da síntese de paratormônio (PTH) devido a ligação do calcitriol ao VDR nas glândulas paratireoides. Atualmente, é crescente o número de estudos relacionando a função extraesquelética da vitamina D devido a presença de VDR em diferentes tecidos humanos (Saccone *et al.*, 2015), tornando assim a maioria dos tecidos humanos e tipos de células responsivos a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Carlberg, 2014). Por exemplo, o complexo Vitamina D-VDR controla a expressão tanto de genes envolvidos na inibição do sistema renina-angiotensina (SRA), influenciando na pressão sanguínea, assim como genes que promovem a secreção de insulina e a proliferação e diferenciação celular (Mozos e Marginean, 2015)

2.2.2 1 α -hidroxilase (CYP27B1)

A ampla distribuição de VDR em seres humanos, a influência da vitamina D em mais do que 3% do humano do genoma, e a presença extra renal de 1 α -hidroxilase são frequentemente apresentados como fatores que a vitamina D influencia na saúde e na doença (Bendik *et al.*, 2014).

A síntese de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$, a partir do principal metabolito circulante, $25(\text{OH})\text{D}$, é catalisada pela enzima 1 α -hidroxilase, também conhecida CYP27B1. Embora a 1 α -hidroxilase seja expressa predominantemente no rim, a produção extra renal de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ também já foi demonstrado a em tecidos tais como linfonodos e pele. A firme regulação de 1 α -hidroxilase que ocorre em ambos os tecidos renal e periféricos torna estudos sobre a expressão e regulação desta enzima notavelmente difícil. No entanto, a clonagem em camundongos, em ratos e em cDNAs humanos para 1 α -hidroxilase permitiu uma caracterização mais completa desta enzima. Em particular, a análise do gene da CYP1 α identificou mutações que causam o raquitismo de tipo 1 dependente de vitamina D também conhecido como raquitismo de pseudo-deficiência da vitamina D. Diversos estudos tem surgidos sobre a distribuição nos tecidos renais e extra renais, indicando que a enzima é expressa em todo o néfron, sugerindo funções endócrinas discreta e autócrinas (Hewison *et al.*, 2000).

2.2.3 Deficiência de Vitamina D

A 25(OH)D é a principal forma circulante da vitamina D, tendo meia vida circulante de 2 a 3 semanas, e representa o melhor indicador da deficiência, insuficiência e toxicidade da vitamina D, enquanto a 1,25(OH)₂D₃ tem uma meia vida circulante aproximadamente de 4 horas e circula em concentrações 1000 vezes menor que a 25(OH)D (Institute of Medicine (U.S.). Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes., 1997).

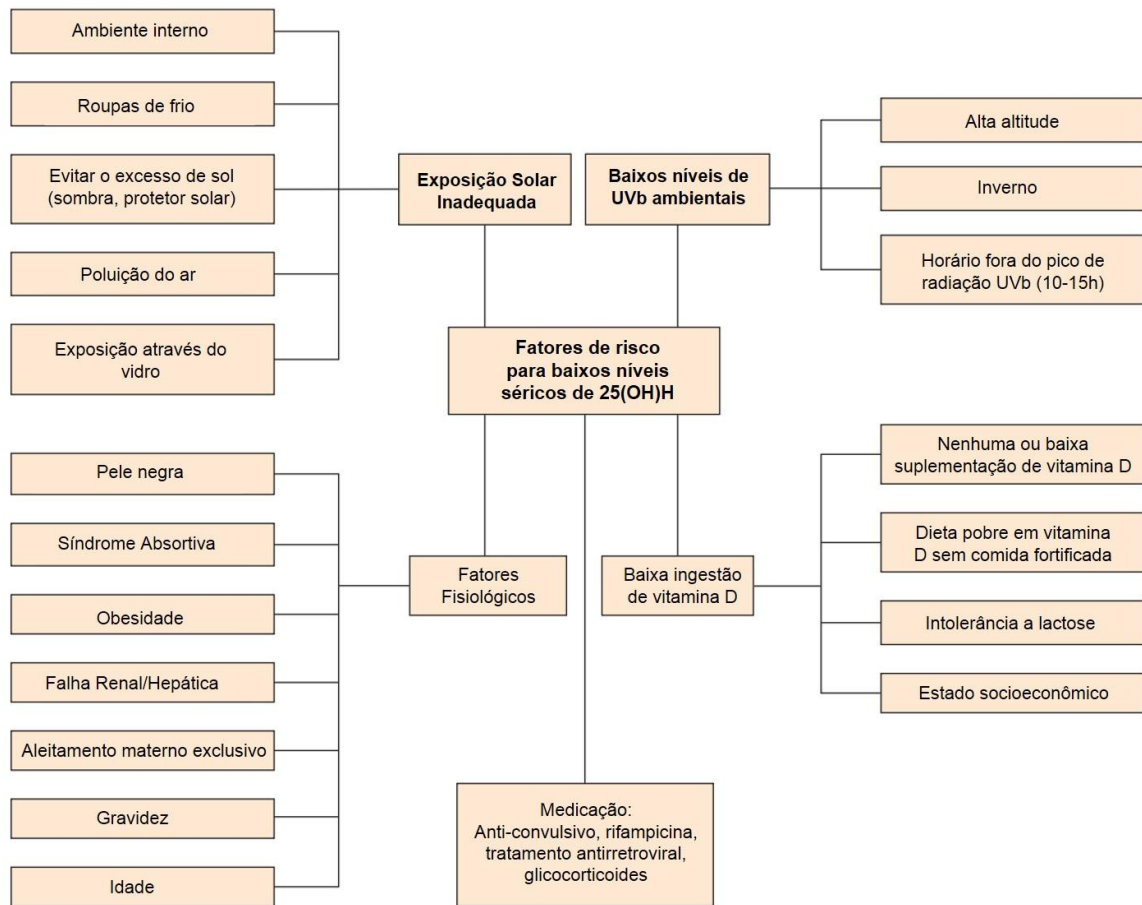
A deficiência severa de vitamina D, geralmente associada à concentração sorológica de 25(OH)D abaixo de 25 nmol/L (média de 25-40 nmol/L ou 10 ng/mL) em humanos e 50 nmol/L em roedores (Fleet *et al.*, 2008), pode levar à doenças metabólicas como hipertensão (Weng *et al.*, 2013) e resistência a insulina (Sung *et al.*, 2012; Prasad e Kochhar, 2015), devido a redução de 25(OH)D causado por diversos fatores (Figura 4). Embora não exista um consenso definitivo sobre a concentração sorológica de 25(OH)D que represente a condição de insuficiência, os baixos níveis de vitamina D constituem um problema atual da população mundial (Holick, 2008; Hossein-nezhad e Holick, 2013).

O Departamento de Metabolismo Ósseo e Mineral da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM) está de acordo com as diretrizes publicadas pela *Endocrine Society*, que não recomenda a avaliação da 25(OH)D para a população geral considerando-se o custo dessa mensuração. Recomenda-se a avaliação laboratorial em indivíduos com risco para a hipovitaminose D ou naqueles para cuja situação clínica seja relevante. Os candidatos à mensuração seriam: pacientes com quadro de raquitismo ou osteomalácia, portadores de osteoporose, idosos com história de quedas e fraturas, obesos, grávidas e lactentes, pacientes com síndromes de má-absorção (fibrose cística, doença inflamatória intestinal, doença de Crohn, cirurgia bariátrica), insuficiência renal ou hepática, hiperparatireoidismo, medicações que interfiram no metabolismo da vitamina D (anticonvulsivantes, glicocorticoides, antifúngicos, antirretrovirais, colestiramina, orlistat), doenças granulomatosas e linfomas (Maeda *et al.*, 2014)

Segundo a organização mundial da Saúde (OMS), a deficiência de vitamina D em gestantes está associada a um maior risco de pré-eclâmpsia, diabetes mellitus gestacional e parto prematuro. Portanto, é recomendada a suplementação com vitamina D durante a gravidez¹.

¹ http://www.who.int/elena/titles/vitamind_pregnancy/en/

Figura 4 - Fatores de risco para baixos níveis séricos de 25(OH)D



Legenda: 25(OH)D, 25-hydroxyvitamin D.

Fonte: (Hosseini-zhad e Holick, 2013).

2.3 Programação Fetal e Deficiência de Vitamina D

O desenvolvimento da placenta desempenha um papel crítico durante a gravidez e sua ligação com a deficiência materna de vitamina D pode explicar os diversos efeitos adversos relacionados (Hosseini-zhad e Holick, 2013). A deficiência de vitamina D materna em camundongos é acompanhada de alterações metabólicas e estruturais no fígado, pâncreas e adiposidade, assim como alterações renais no desenvolvimento, maturação glomerular e prolongamento da nefrogênese (Nascimento *et al.*, 2012, 2013), entre diversas adversidades.

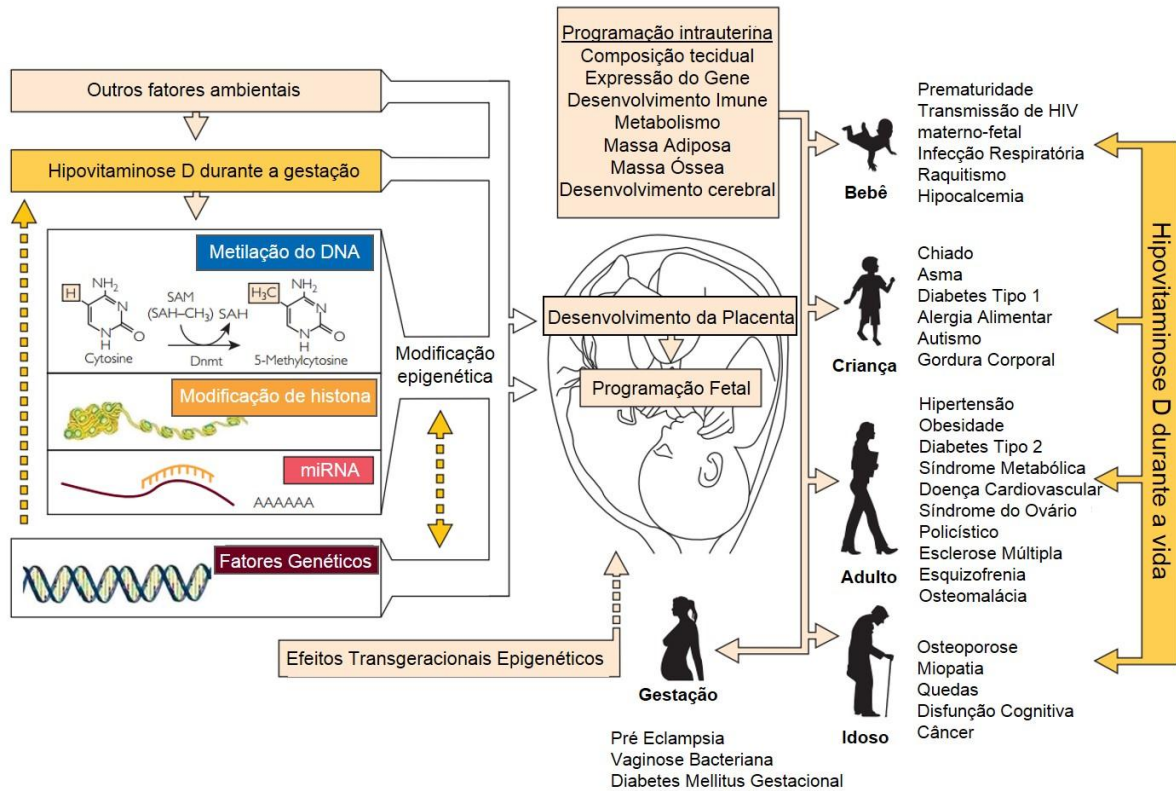
As modificações epigenéticas são alterações hereditárias em que a expressão do gene não são mediadas por alterações na sequência de DNA (Plass e Soloway, 2002). Esta hipótese, primeiramente sugerido por Barker et al (Barker, 1995), postulou que no útero ocorra a programação fetal epigenética (como um resultado de eventos ambientais durante a gravidez) através da indução específica genes e vias genômicas que controlam o desenvolvimento fetal e risco de doença futura. O papel da vitamina D na modificação epigenética e na programação fetal poderia explicar por que a deficiência de vitamina D tem sido relatada a ter tais malefícios na saúde abrangentes.

Efeitos epigenéticos primários da vitamina D estão ligadas a modificações de histonas, principalmente sua acetilação. O dímero VDR/RXR interage com histonas acetiltransferases para induzir a ativação da transcrição (Karlic e Varga, 2011). Estudos tem sugerido que a vitamina D pode também afetar a metilação do DNA (Fetahu *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014). Um estudo recente demonstrou que uma severa deficiência de vitamina D pode causar modificações no DNA através metilação em leucócitos, embora as diferenças observadas fossem relativamente pequenas (Zhu *et al.*, 2013). Este estudo sugeriu que indivíduos com deficiência de vitamina D eram mais propensos a apresentar redução da síntese e aumento do catabolismo da vitamina D. Porém não se pode afirmar que foi devido a deficiência de vitamina D ou a consequência do mesma, necessitando de mais estudos na área. Contudo, já fora demonstrado que a vitamina D é, por um lado regulado por mecanismos epigenéticos e, por outro lado, está envolvido na regulação de outros eventos epigenéticos (Fetahu *et al.*, 2014). Genes críticos envolvidos no metabolismo da vitamina D podem ser silenciado por metilação do DNA. A proteína VDR interage, diretamente ou indiretamente, com modificadores e remodeladores da cromatina. Quando ocorre a ligação ao VDR, é regulada a expressão de vários desses modificadores de cromatina e podendo até mesmo regular a metilação do DNA. A regulação epigenética da expressão do gene é um mecanismo de ajuste fino e a sua desregulação pode conduzir a condições patológicas (Fetahu *et al.*, 2014). O impacto da vitamina D na manutenção no epigenoma ainda requer muitos estudos.

Diversos fatores ambientais, como já citados anteriormente somadas as modificações da expressão dos genes que codificam os transportadores de cálcio da placenta, através da regulação epigenética do calcitriol, com modificações por metilação do DNA, modificações da histona ou por miRNA, juntamente a fatores genéticos podem representar o meio pelo qual o *status* da vitamina D materna poderia influenciar na mineralização óssea do neonato. Contudo, a deficiência materna durante a gestação pode, portanto, não só prejudicar manutenção óssea da mãe e a formação do esqueleto fetal, mas também influencia no

imprinting fetal que pode aumentar a suscetibilidade de doenças crônicas logo após o nascimento, bem como mais tarde na vida, como prematuridade, autismo, obesidade, câncer, entre outras, juntamente ao quadro de hipovitaminose durante a vida (Figura 5) (Hosseinezhad e Holick, 2013).

Figura 5 - Hipovitaminose D durante a gestação, podendo causar modificações epigenéticas e a subsequente programação fetal, levando a doenças crônicas durante todos os períodos da vida, assim como o efeito direto da hipovitaminose D



Legenda: miRNA, microRNA.

Fonte: (Hosseini-zhad e Holick, 2013).

2.4 Vitamina D e Ilhota Pancreática

A vitamina D interfere na função das células-beta de diversas maneiras. A $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ entra na célula-beta pancreática e interage com o complexo receptor da vitamina D (VDR-RXR), que se liga aos elementos responsivos da vitamina D (VDRE), encontrado nos genes promotores da insulina humana, com a finalidade aumentar a ativação da transcrição do gene da insulina e a síntese insulínica. Alternativamente, a ativação da vitamina D pode ocorrer dentro da célula-beta através da 1α -hidroxilase, a qual é expressa nas células-beta.

Um efeito indireto da vitamina D sobre a célula-beta pode ser mediado por sua regulação na concentração extracelular do cálcio e do influxo do cálcio através da célula-beta

(Sergeev e Rhoten, 1995). A secreção de insulina é um processo dependente do cálcio, por conseguinte, alterações no fluxo do cálcio podem afetar a secreção de insulina (Milner e Hales, 1967).

A literatura já relatou que a administração de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ em pacientes com diabetes do tipo 1 recém diagnosticados, pode proteger a função das células-beta das ilhotas pancreáticas de forma eficaz. Além disso, tanto em modelos animais quanto em humanos, foi descrita a síntese e secreção de insulina alteradas devido a deficiência de vitamina D (Guo *et al.*, 2013). Ao estudar modelos animais, Norman *et al.* demonstrou que a deficiência de vitamina D inibiu a secreção de insulina das ilhotas pancreáticas de rato (Norman *et al.*, 1980). Os pâncreas de ratos com deficiência de vitamina D que foram estimulados com glicose e arginina apresentaram redução na secreção de insulina em comparação com aqueles com níveis normais de vitamina D. Contudo, sugere-se que a suplementação de vitamina D pode restaurar a capacidade de síntese de insulina (Norman *et al.*, 1980). Santos *et al.* constatou que a suplementação de vitamina D pode aumentar a secreção de insulina e diminuir a concentração de glicose no sangue em ratos Wistar obesos (modelo animal clássico de diabetes tipo 2) (de Souza Santos e Vianna, 2005). Em estudos com seres humanos, Palomer *et al.* informou que a deficiência de vitamina D pode predispor à intolerância à glicose e a suplementação com vitamina D melhorou a secreção de insulina no diabetes tipo 2 com hipovitaminose D já estabelecida (Palomer *et al.*, 2008).

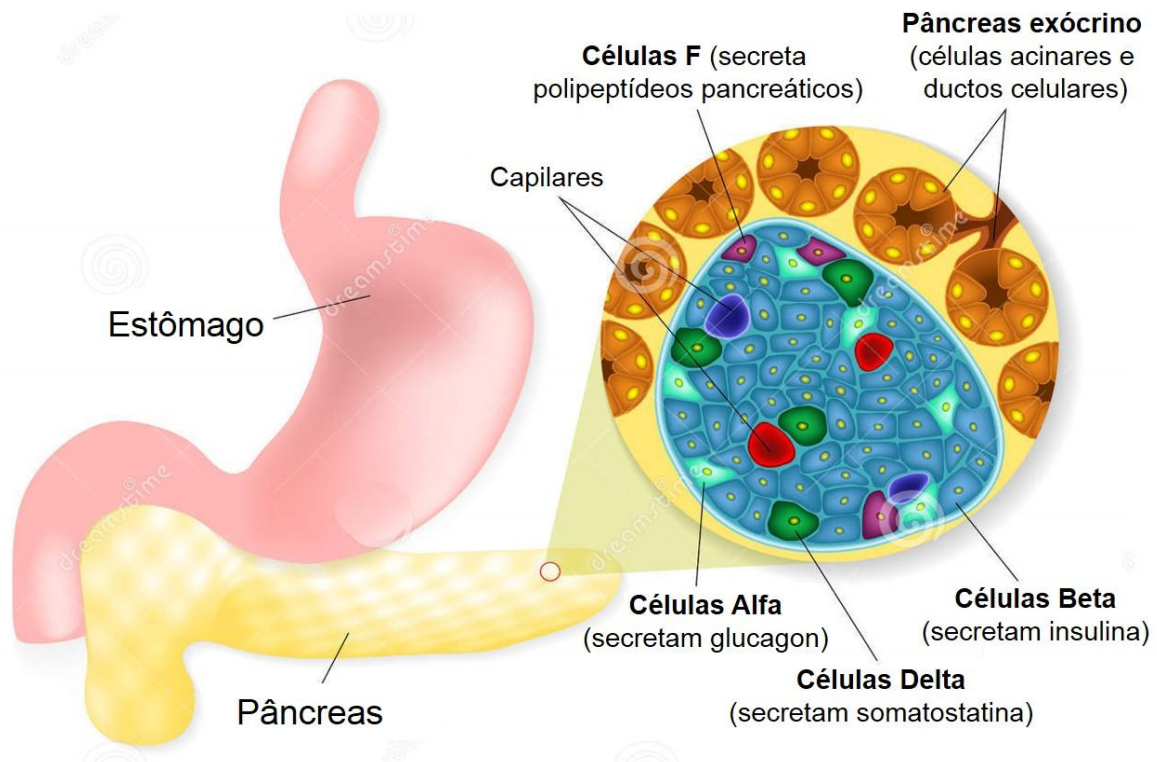
A vitamina D também pode desempenhar um papel importante no desenvolvimento da diabetes tipo 2, influenciando na função das células-beta através de múltiplas vias, afetando assim a síntese e secreção de insulina, bem como a sensibilidade à insulina. A deficiência de vitamina D pode causar e piorar a resistência à insulina, e agravar o dano para função da célula-beta. O mecanismo de como a $25(\text{OH})\text{D}$ influencia na glicose sanguínea e na função das células-beta do pâncreas ainda não está totalmente compreendido. Novos estudos ainda são necessários para esclarecer o papel da vitamina D em pacientes com diabetes tipo 2 em nível molecular (Guo *et al.*, 2013).

2.5 Pâncreas

O pâncreas é uma glândula mista, exercendo tanto função endócrina quanto exócrina. A parte exócrina apresenta-se como uma glândula acinosa composta que, além de íons e água,

secreta enzimas digestivas. As ilhotas pancreáticas constituem a parte endócrina do pâncreas, representando cerca de 1,5% do seu volume total, apresentando-se sob a forma de aglomerados arredondados de células, imersos no tecido pancreático exócrino (von Schonfeld *et al.*, 1994). Geralmente é indicado em livros de texto que as ilhotas pancreáticas constituem em torno de 2-3% do pâncreas e o pâncreas possui em torno de um milhão de ilhotas pancreáticas. No entanto, o número total de ilhotas no pâncreas, depende da idade, massa corporal, tamanho do pâncreas e condições, tais como a gravidez (Kin *et al.*, 2006). As ilhotas pancreáticas são constituídas por quatro tipos principais de células: beta, alfa, delta e PP (polipeptídeo pancreático) (Figura 6). As células PP (1-2% do total), se distribuem tanto na ilhota quanto no pâncreas exócrino, estimula a secreção gástrica das enzimas intestinais e inibem a motilidade do intestino. As células delta secretam somatostatina e constituem de 5 a 10 % da população celular. As células alfa (20% do total) secretam glucagon e, as células-beta, que representam aproximadamente 70% da população celular das ilhotas, e se caracterizam pela presença de grânulos citoplasmáticos de depósito e liberação de insulina (Prado *et al.*, 2004).

Figura 6 - Representação ilustrativa das células pancreáticas



Fonte: <http://pt.dreamstime.com/imagem-de-stock-ilhotas-de-langerhans-image39677481>

2.5.1 Insulina

A insulina é um hormônio polipeptídico produzido pelas células-beta das ilhotas pancreáticas cuja síntese é ativada pela elevação da glicemia. Sua biossíntese envolve dois precursores inativos, a pré-pró-insulina e a pró-insulina, que após clivagens sequenciais formam o hormônio ativo. No aparelho de Golgi, a pró-insulina é quebrada em duas unidades, originando a insulina e o peptídeo C que é essencial para a organização correta da molécula de insulina. Além disso, devido à sua meia-vida mais longa no plasma, o peptídeo C é um bom indicador da produção e secreção de insulina no diabetes tipo 1. A insulina está presente em grânulos no citosol que, após estímulo apropriado, são liberados por exocitose. A insulina é degradada pela enzima insulinase, presente no fígado e, em menor quantidade, nos rins (Grune, 2015). Possui uma meia-vida plasmática de aproximadamente seis minutos. Essa curta duração de ação permite alterações rápidas nos níveis circulantes desse hormônio (Ledet *et al.*, 2015). A glicose é o estímulo mais importante para a secreção de insulina (Komatsu *et*

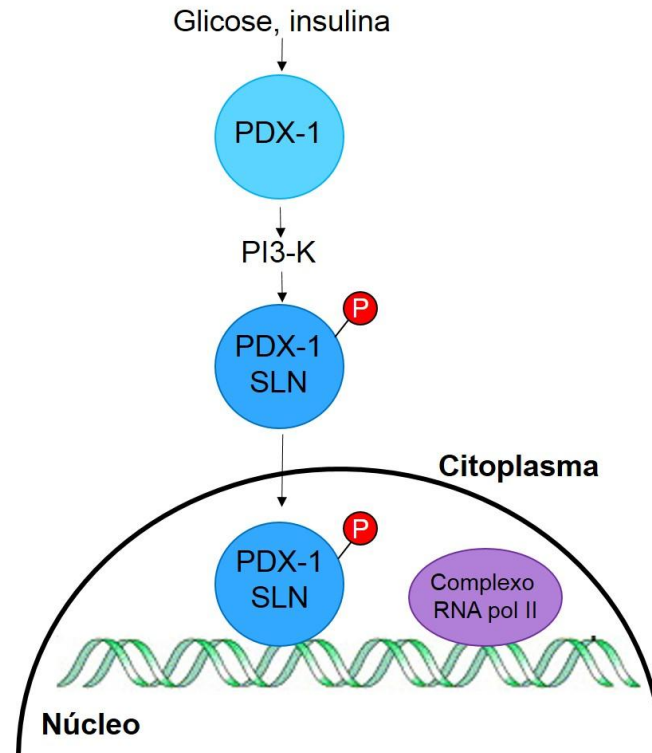
al., 2013). A principal função da insulina é transportar a glicose através da membrana celular. Com isso, ocorre um aumento da intensidade do metabolismo da glicose pelas células e um aumento do armazenamento do glicogênio, tanto no fígado como nas células musculares. A insulina exerce sua ação sobre receptores específicos de membrana. O número de receptores de insulina (RI) na superfície celular altera-se dependendo das condições metabólicas. Além disso, eles possuem uma alta taxa de renovação (Starks *et al.*, 2015).

As alterações glicêmicas podem induzir flutuações na secreção de insulina e mudanças a longo prazo na massa de células-beta podem ser encontradas como uma forma de adaptação as variações sistêmicas da insulina, necessárias para o normoglicemia. O pâncreas adulto possui uma capacidade de proliferação de células-beta, ainda que este seja um potencial limitado de replicação. (Valtat *et al.*, 2011)

2.5.2 PDX-1

O fator de transcrição PDX-1, também conhecido como IPF-1, IDX-1, STF-1, IUF-1 e GSF, é responsável pela diferenciação das células na ilhota pancreática e transcrição do gene da insulina. Entre as diversas vias de sinalização que regulam as funções da célula-beta, o PDX-1 é conhecido como um regulador chave no desenvolvimento das células-beta pancreáticas, modulando a expressão do gene da insulina em resposta à glicose e os níveis do peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1) (Macfarlane *et al.*, 1999). A função reguladora do gene de insulina através de PDX-1, sendo o PDX-1 descrito como mediador da via de sinalização da insulina intermediada por fosfatidilinositol que envolve translocação da sua forma fosforilada do citoplasma para o núcleo, seguida por ativação do gene da insulina sobre ligação aos elementos a seus receptores (Lebrun *et al.*, 2005), visto que elevadas concentrações de glicose na ilhota madura, proporcionam a fosforilação do PDX-1 e subsequente translocação para o núcleo, onde se liga ao promotor do gene da insulina e promove a transcrição do mesmo. E esta ativação é dependente de PI3-K, que é importante para a regulação de PDX-1, uma vez que, utilizando inibidores da PI3-K não há ativação do PDX-1 (Rafiq *et al.*, 2000) (Figura 7).

Figura 7 - Ativação de PDX-1 através da fosforilação. Os variados estímulos (como a glicose a insulina) ativam a fosforilação de PDX-1, resultando na emissão de um sinal de localização nuclear (SLN). PDX-1 é também translocado ao núcleo quando ocorre a sua ligação ao DNA e ativa a transcrição

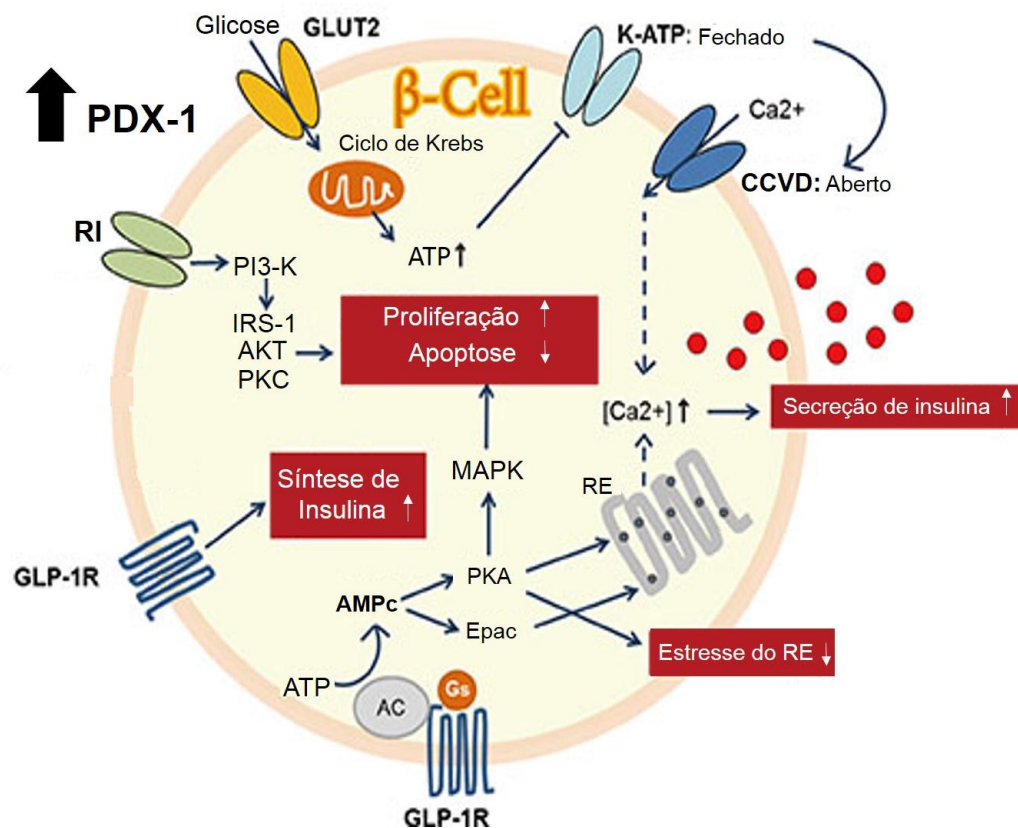


Legenda: PI3-K, phosphoinositol-3-kinase; RNA pol II complexo, complexo RNA polimerase II.
 Fonte: (Emery *et al.*, 2001)

Um estudo anterior demonstrou que camundongo homocigoto para uma mutação seletiva do gene PDX-1 apresenta agenesia pancreática. Esses neonatos mutantes sobrevivem ao desenvolvimento fetal, mas morrem poucos dias após o nascimento (Jonsson *et al.*, 1994). Já foi demonstrado que PDX-1 regula genes envolvidos na função e identidade da célula. Em células beta maduras, o PDX-1 ativa o gene da insulina e outros genes envolvidos na detecção de glicose e seu metabolismo, tais como GLUT-2 e GLK, (Watada *et al.*, 1996b; Ahlgren *et al.*, 1998), promovendo sua transcrição através da ação de GLP-1, que tem a sua secreção de insulina aumentada estimulada pela glicose através da ativação de monofosfato de adenosina cíclico (AMPC). A elevação do AMPC regula positivamente a proteína cinase A (PKA) e a proteína de troca ativada pelo AMPC, leva a um rápido aumento no cálcio intracelular, através dos canais de K^+ e Ca^{++} , e a exocitose da insulina de uma maneira dependente de glicose (Buteau, 2008). A ativação de cascatas de cinases conduz à ativação ou repressão da

transcrição de genes e, finalmente, estimulando a expansão da massa de células-beta (Buteau *et al.*, 1999). O GLP-1 também promove a expressão do gene da insulina e a sua biossíntese, através do aumento da expressão do fator de transcrição PDX-1 e a ligação ao promotor do gene da insulina (Buteau *et al.*, 1999) (Figura 8).

Figura 8 - A atuação de elevados níveis de PDX-1 e a regulação da célula-beta pancreática pelo receptor peroxissomal gama ativado por proliferadores (PPAR)



Legenda: RXR, receptor de retinóide X; GLP-1R, o peptídeo semelhante ao glucagon 1R; De PI3-K, fosfatidilinositol-3-cinase; IRS-1, o substrato do receptor da insulina 1; AKT, proteína cinase B; PKC, proteína cinase C; ATP, adenosina trifosfato; PDX-1, pâncreas duodeno homeobox-1; GLUT-2, transportador de glicose 2, RI, receptor de insulina; Ca²⁺, cálcio; K-ATP, canal de cálcio ATP-sensível; CCVD, canal de cálcio voltagem dependente; AMPc, adenosina monofosfato cíclico; PKA, proteína cinase A; Epac, proteína trocadora diretamente ativada pelo AMPc; ER, retículo endoplasmático

Fonte: (Jung *et al.*, 2014).

2.5.3 GLUT-2 e GLK

Em condições fisiológicas, a glicemia é mantida relativamente dentro de limites estreitos, apesar de uma variedade de perturbações potenciais. Este controle é efetuado por respostas fisiológicas homeostáticas, coordenadas no pâncreas, fígado e músculo esquelético (Ogunnowo-Bada *et al.*, 2014). Nos últimos anos, tornou-se aparente que o cérebro também desempenha um papel fundamental no controle da energia e na homeostase metabólica periférica, incluindo o controle da glicose no sangue. Esta dependência também ocorre devido ao cérebro possuir a necessidade de um constante fornecimento ininterrupto de glicose da corrente sanguínea para seu metabolismo. Uma parte fundamental deste processo homeostático é que o cérebro precisa para detectar rapidamente e com precisão alterações na glicemia. Os sensores de combustível do cérebro especializadas monitorar as alterações na glicose ambiente, assim como os níveis de hormônios circulantes, tais como insulina e glucagon, para responder as alterações na glicemia (Ogunnowo-Bada *et al.*, 2014).

Os transportadores de glicose vem sendo amplamente descritos desde o início dos anos 90 (Bell *et al.*, 1990). A família dos transportadores de glicose de difusão facilitada (GLUTs, codificadas pelos genes SLC2A) compreendem 14 isoformas. Estas possuem sequências de aminoácidos distintas, especificidades de substrato, propriedades cinéticas e tecido e localizações celulares (Mueckler e Thorens, 2013). GLUT-2 tem uma afinidade para a glicose excepcionalmente baixa, e também pode usar manose, galactose e frutose como substratos de baixa afinidade. GLUT-2 é principal transportador de glicose na membrana de plasma de hepatócitos, e estudos em camundongos knock-out para GLUT-2 demonstra a sua necessidade para a absorção de glicose, mas a dispensa na produção de glicose. Em células-beta pancreáticas de roedores, GLUT-2 é o principal transportador de glicose e a sua inativação genética suprime a absorção de glicose e a secreção de insulina estimulada pela glicose (GSIS). Assim, embora a função de GLUT-2 seja principalmente catalisar o transporte passivo de glicose através das membranas plasmáticas, estudos com camundongos knock-out revelaram que esta atividade de transporte é importante para o controle de mecanismos celulares que incidem sobre a expressão do gene, a regulação dos caminhos metabólicos intracelulares, e indução de sinais hormonais e neuronais que, juntos, formam a base de um sistema de comunicações integrado inter-órgão para controlar a homeostase da glicose (Thorens, 2015).

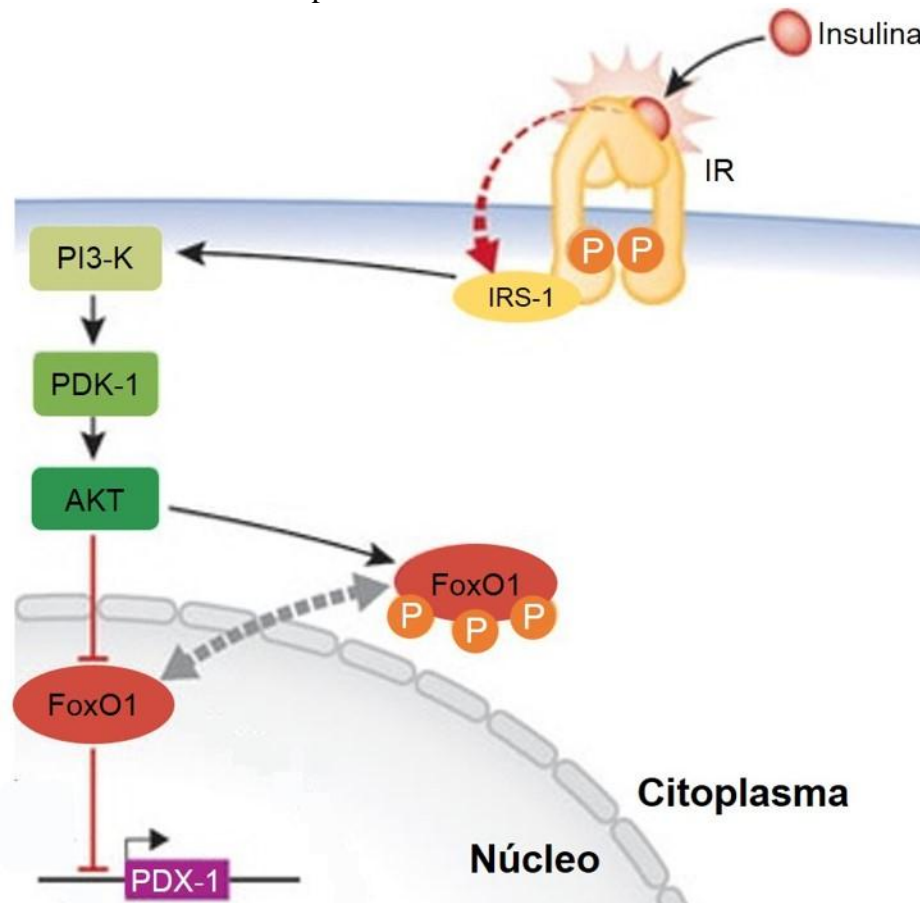
No metabolismo das células-beta, a GLK serve como um sensor de glicose (Matschinsky, 1990) e, através do reconhecimento de glicose, e atuando sobre a esta transformando-a em glicose 6-fosfato, a qual será armazenada no fígado na forma de glicogênio, e iniciando a secreção de insulina induzida pela glicose. Quando ocorre o aumento dos níveis de glicose no sangue durante a fase pós-prandial, a GLK é o fosforilador dominante da glicose porque, em contraste com a GLK, a hexocinase, uma isoenzima de alta afinidade é inibida pela glicose-6-fosfato (G-6-P) (Lenzen e Panten, 1988; Schuit *et al.*, 1999). Assim, a regulação da atividade da GLK é o determinante fundamental para a regularização de fluxo glicólise durante o estado pós-prandial (Lenzen, 2014).

2.6 Via de Sinalização da Insulina

A cascata de sinalização da insulina tem um papel importante em vários processos fisiológicos como o metabolismo de carboidratos e lipídeos, a reprodução, o crescimento celular e a sobrevivência celular (White, 2003).

Proteínas recrutados pelo receptor de insulina (RI) ativado incluem as proteínas do substrato do receptor da insulina (IRS), mediando a maior parte da sinalização intracelular de insulina. Contudo, IRSs possuem sítios de fosforilação de tirosina e serina, e são capazes de se ligar a vários receptores ou proteínas adaptadoras (White, 2003). Proteínas IRS, quando fosforilada ativam três principais vias de sinalização intracelular. A primeira é a fosfoinositol 3-cinase (PI3-K) - fosfoinositol-dependente 1 (PDK-1) - AKT, que está relacionado com a maior parte das ações metabólicas da insulina. Essas respostas incluem modulação de glicose, enzimas metabólicas lipídicas e diversas proteínas, incluindo a ativação de fatores de transcrição que regulam o metabolismo, tais como o fator de transcrição *forkhead* O1 (FoxO1), com a regulação de sua fosforilação, conseqüentemente a translocação entre o núcleo e o citoplasma e sua posterior transcrição ou inibição, dentre outras vias (Taniguchi *et al.*, 2006) (Figura 9).

Figura 9 - Via de sinalização da insulina PI3-K/AKT e sua relação da FoxO1 com PDX-1 em células-beta pancreática



Legenda: IRS-1, receptor de insulina 1; PI3-K, fosfatidilinositol-3-cinase; PDK-1, 3-fosfoinositídeo proteína cinase dependente 1; AKT, proteína cinase B; FoxO1, fator de transcrição *forkhead box 1*; PDX-1, pancreato-duodenal *homebox 1*, P, fósforo; RI, receptor de insulina

Fonte: A autora, 2015.

2.6.1 IRS-1

Os substratos do receptor de insulina são uma família de seis (IRS-1 a IRS-6) proteínas adaptadoras de sinalização intracelular estruturalmente relacionadas que integram e coordenam numerosos sinais extracelulares com a célula (Dearth *et al.*, 2007). O IRS-1, inicialmente identificado como intermediário do receptor de insulina (RI), foi primeira proteína a ser identificada e clonada, foi originalmente descrito em hepatoma murino, mostrando ser ativado por fator de crescimento semelhante a insulina (IGFR) e RI, e posteriormente foi descrito em tecidos tais como cérebro, miocárdio, músculo, adipócito, rins,

ovários e glândulas mamárias. Codificado pelo éxon 2q36-37, apresenta peso molecular de 132 kDa, mas devido a fosforilação em serina, migra em gel de poliacrilamida com peso aparente de 185 kDa. Sua expressão é induzida por hormônios esteróides e inibida por citocinas pró-inflamatórias, como interleucina 1 (IL-1). Camundongos *knockout* para IRS-1 apresentam alterações ligados ao crescimento, desenvolvimento e homeostase da glicose (Laustsen *et al.*, 2002). O IRS-2 apresenta expressão nos mesmos tecidos é controlada por fatores semelhantes aos implicados na do IRS-1 (Sesti *et al.*, 2001), incluindo o crescimento e sobrevivência das células-beta pancreáticas (White, 2006). Outros membros da família IRS têm expressão restrita quanto à espécie e aos tecidos. O IRS-3 é expresso apenas em roedores. IRS-4 é limitado ao cérebro e ao timo. O camundongo knock-out para IRS-1 e IRS-3 resulta em deficiência severa do tecido adiposo branco, fornecendo a evidência de que a IRS-1 e IRS-3 são complementares nos seus papéis em adipogênese. Em contraste, knock-out para IRS-4 ainda não possui seu papel fisiológico descrito (Laustsen *et al.*, 2002). IRS-5 e IRS-6 (também chamados DOK4 e DOK5), apresentam maior similaridade entre si que com os demais IRS (Dearth *et al.*, 2007). Os IRS não possuem atividade tirosina cinase, mas são fosforilados após ligarem-se aos seus receptores ativados. A auto-fosforilação carboxiterminal em tirosina das proteínas IRS cria sítios de reconhecimento para moléculas contendo domínios SH2 incluindo a diversos fatores como a PI3-K para iniciar uma via de sinalização culminando no efeito biológico das proteínas IRS (Guo, 2014). A ativação das proteínas IRS é conhecida por ser crítica para a mitogênese celular (Wang *et al.*, 1993).

2.6.2 PI3-K

As proteínas PI3-K são uma família de cinases de lipídeos que fosforilam a terceira hidroxila dos fosfoinosítidos em membranas celulares. Estruturalmente, estas enzimas partilham um núcleo comum, que consiste de um domínio C₂, um domínio helicoidal e um (cinase) de domínio catalítico. PI3-K são classificadas em três famílias com base na estrutura e na especificidade do substrato, com a classe I de PI3-K sendo subdividida em classes IA e IB (Fry, 1994). Estudos com modelos animais ajudaram a compreensão da sinalização da PI3-K. PI3-K de classe I desempenham um papel importante na regulação imunológica, e as quatro isoformas diferem em termos de distribuição e a função do tecido. Uma desta isoformas, a PI3-K α está relacionada com a angiogênese e sinalização da insulina. Estudos

demonstram que a via de sinalização de PI3-K/AKT desempenha um papel complexo na orquestração vias tanto pró-inflamatórias e anti-inflamatórias para manter uma imunidade eficaz (Stark *et al.*, 2015).

A via de sinalização PI3-K / Proteína tirosina fosfatase (PTEN) é um regulador principal de muitos processos celulares, por meio da ativação de diversos substratos pelo regulador principal dependente da PDK-1 (Mora *et al.*, 2004).

A PI3-K que ativa a AKT, tem sido amplamente estudada por estar envolvida em vários processos biológicos, incluindo a proliferação, diferenciação e sobrevivência celular, o tráfico de membrana, migração celular, captação de glicose e metabolismo. A desregulação dos níveis de PI3-K foi relatada como contribuinte para o desenvolvimento de problemas cardiovasculares, cancro, alergia, inflamação crônica, e distúrbios metabólicas, como a diabetes mellitus tipo 2. Assim, a regulação em PI3-K via de sinalização pode ser útil para o tratamento dessas doenças (Guo *et al.*, 2014).

2.6.3 PDK-1

PDK-1 e AKT são importantes para a regulação do crescimento e da função da célula beta. PDK-1 é um mediador central da resposta celular induzida pela sinalização da PI3-K, uma vez que promove a ativação dependente da fosforilação da AKT. (Guo *et al.*, 2014)

Estudos anteriores já demonstraram que PDK-1 é necessário para manter a homeostase de glucose em camundongos adultos porque a sua atividade promove a sobrevivência, a proliferação, e de tamanho adequado das células-beta pancreáticas maduras (Hashimoto *et al.*, 2006). Desta forma, a descoberta de PDK-1, como a enzima que medeia a este evento em muitas proteínas cinases introduziu um novo e importante passo em vias de sinalização que regulam vários processos celulares importantes, porém o mecanismo subjacente a secreção de insulina através da via de sinalização PI3-K/AKT, no entanto, ainda está sob investigação (Guo *et al.*, 2014).

2.6.4 AKT e pAKT

A proteína AKT, também conhecida como PKB é uma serina-treonina-quinase que está no eixo central das vias de sinalização que regulam vários aspectos de funções celulares, incluindo a sobrevivência, crescimento e metabolismo (Vadlakonda *et al.*, 2013). Estes processos são mediados por três isoformas de AKT (AKT1, AKT2 e AKT3), as quais estão intimamente relacionadas e amplamente expressas em mamíferos (Clark e Toker, 2014). Notavelmente, a desregulação da sinalização de AKT está associada com uma diversidade de doenças humanas incluindo hipertrofia cardíaca, diabetes, degeneração neuronal, perturbações vasculares e cancro (Altomare e Testa, 2005; Bellacosa *et al.*, 2005; Cheung e Testa, 2013). Com isso, as vias dependentes de AKT são consideradas um alvo atraente para intervenções terapêuticas. Por conseguinte, uma profunda compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes à regulamentação desta atividade cinase torna-se de suma importância (Hers *et al.*, 2011). A ativação da AKT juntamente a citocinas, integrinas e outros sinais extracelulares consiste de recrutamento dos fosfatidilinositol (3, 4, 5) trifosfato (PIP3) da membrana plasmática através da sua ligação a PI3-K (fosfoinositol 3 cinase), que conduz para a translocação de AKT a partir do citoplasma para a membrana (Hanada *et al.*, 2004) e permitindo a fosforilação de dois resíduos diferentes no interior da molécula, culminando na AKT fosforilada (pAKT) (Risso *et al.*, 2015).

Em células quiescentes, a AKT reside no citoplasma em uma conformação de baixa atividade. Após a estimulação celular, AKT é ativada através do recrutamento de membranas celulares por produtos lipídicos PI3-K e fosforilação por PDK-1, podendo assim desempenhar suas funções (Guo *et al.*, 2014).

2.6.5 FoxO1 e pFoxO

Convencionalmente, as proteínas FoxO são fosforiladas pela AKT, em três dos resíduos (Thr24, Ser253 e Ser316 – pFoxO1), resultando na translocação de FoxO do núcleo para o citoplasma. Fatores de crescimento e a insulina são regulados negativamente pela atividade transcricional de FoxO1 através de fosforilação e exclusão nuclear induzida pela

fosforilação de AKT, através da via de sinalização PI3-K/AKT (Kitamura e Ido Kitamura, 2007).

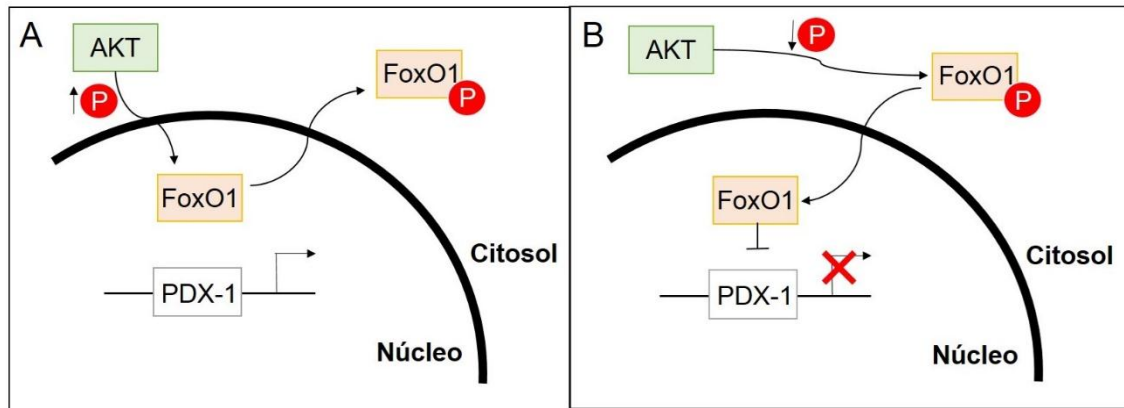
FoxO1, o primeiro membro identificado da família do gene FoxO, é uma proteína multifuncional que regula a apoptose, proliferação, senescência, etc. É responsável pela redução da massa de células-beta sob e estresse oxidativo e metabolismo em ambos diabetes tipo 1 e tipo 2 (Kitamura e Ido Kitamura, 2007).

Fatores de transcrição da família *forkhead* tem papéis importantes na proliferação celular, apoptose, diferenciação. As proteínas FoxO também desempenham um papel importante no metabolismo de organismos complexos. FoxO1 regula o metabolismo da glucose e de lipídeos no fígado, bem como de pré-adipócitos, mioblastos e diferenciação de células endoteliais vasculares. No hipotálamo, FoxO controla a ingestão de alimentos. Células-beta pancreáticas secretam insulina para manter os níveis de glicose no plasma em uma faixa fisiológica rigorosa e os defeitos em sua função celular causam diabetes. O padrão de expressão de FoxO1 durante a organogênese pancreática é semelhante ao do PDX-1, ou seja, é um fator de transcrição crítico para o desenvolvimento de células beta. FoxO1 é expresso num subconjunto de células do ducto pancreático, em que a insulina e/ou PDX-1 são ocasionalmente expressos.

A Figura 10 demonstra a como FoxO1 inibe a proliferação de células-beta através da supressão de PDX-1, com a translocação do núcleo para o citoplasma e vice-versa dependendo da fosforilação pela AKT, que em condições normais, a fosforilação inibe a FoxO1, permitindo a transcrição do PDX-1 e na alteração da fosforilação, o FoxO1, ativo, transloca para o núcleo silenciando o PDX-1.

Assim, uma série de estudos no pâncreas sugeriu que FoxO1 desempenha um papel importante na diferenciação de células-beta pancreáticas, na neogênese, na proliferação e na resistência ao stress (Kitamura e Ido Kitamura, 2007).

Figura 10 - Fosforilação da FoxO1 regulando a transcrição do PDX-1. **A.** Quando a AKT fosforila a FoxO1, transloca-se do núcleo para o citoplasma, tornando-se inativa e permitindo a transcrição do PDX-1; **B.** Quando a fosforilação da FoxO1 não ocorre (ou é reduzida), ela transloca-se do citoplasma para o núcleo, tornando-se ativa e silenciando o PDX-1



Legenda: AKT, proteína cinase B, FoxO1, fator de transcrição *forkhead box 1*; PDX-1, pancreato-duodenal *homebox 1*.

Fonte: A autora, 2015.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e dieta

Todos os procedimentos realizados estavam de acordo com as normas internacionais de experimentação animal (NIH Publication No. 85 – 23, revisada 1996) e foram aprovados pelo comitê de ética da Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ sob o nº CEA/023/2013. A linhagem utilizada foi proveniente do Núcleo de Animais de Laboratório (NAL), da Universidade Federal Fluminense – UFF, Niterói, RJ. Além disso, todos os animais foram acondicionados em caixas de polietileno e permaneceram com condições controladas em temperatura ($21\pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade ($60\pm 10\%$) e ciclo claro-escuro (12:12 h).

Fêmeas da linhagem *C57Bl/6* (n=30) foram adquiridas com cinco semanas de idade. Ao completarem seis semanas, as mesmas foram separadas aleatoriamente de acordo com a dieta experimental em:

- a) **M/SC** (fêmeas do grupo controle; alimentadas com dieta padrão, seguindo as recomendações da AIN-93G, com vitamina D_3) e;
- b) **M/VitD** (fêmeas do grupo deficiente em vitamina D; alimentadas com dieta seguindo as recomendações da AIN-93G e isenta apenas em vitamina D_3).

As dietas experimentais foram fornecidas pela empresa PragSoluções (Jau, São Paulo, Brasil, www.pragsolucoes.com.br) e seguiram as recomendações da AIN-93G, na qual a dieta SC seguiu a recomendação para vitamina D que corresponde a 400.000 UI/kg de dieta ou 0,25g de colecalciferol/kg de dieta (Tabela 1) (Reeves *et al.*, 1993). Após sete semanas de dieta, parte das fêmeas (n=5, cada grupo) foram direcionadas a eutanásia para a coleta sanguínea e a posterior confirmação da deficiência causada durante esse período de restrição e as demais progenitoras (n=10, cada grupo) foram acasaladas com machos da mesma idade, também adquiridos da UFF, e que receberam durante toda a vida dieta padrão. A restrição foi mantida por este período para garantir a deficiência da vitamina, uma vez que a mesma é lipossolúvel e dispõe de reserva hepática, como descrito anteriormente (Maka *et al.*, 2008).

Tabela 1 - Composição das dietas experimentais. Todos os nutrientes correspondem às recomendações do AIN-93G para roedores

Nutriente (g/kg)	Dietas	
	M/SC	M/VitD ⁻
Amido de milho	397,50	397,50
Caseína	200,00	200,00
Amido dextrinizado	132,00	132,00
Sacarose	100,00	100,00
Óleo de soja	70,00	70,00
Fibra	50,00	50,00
L-cistina	3,00	3,00
Colina	2,50	2,50
Mix de minerais	35,00	35,00
Carbonato de calico	357,00	357,00
Mix de vitaminas	10,00	10,00
Vitamina D ₃ (400.000 UI/kg) – (1kg Mix)	0,25	0,00
Energia (Kcal/Kg)	3950,00	3950,00
Hidratos de Carbono (%)	64,00	64,00
Proteínas (%)	19,00	19,00
Lipídios (%)	17,00	17,00

Legenda: M/SC, mães alimentada com dieta padrão, com níveis normais de vitamina D; M/VitD⁻, mães alimentadas com dieta deficiente em vitamina D.

Fonte: (Reeves *et al.*, 1993).

Ao nascimento, o sexo dos filhotes foi identificado pelo método da distância ânus-genital (Cao *et al.*, 2008). Após esse procedimento, cada progenitora recebeu uma ninhada fixada em seis filhotes, a fim de aprimorar o processo de lactação (Langley-Evans *et al.*, 1996). Para as análises foi retirado um filhote de cada mãe para evitar a análise entre irmãos. A deficiência de vitamina D ocorreu nos períodos pré-gestacional, gestacional e lactacional.

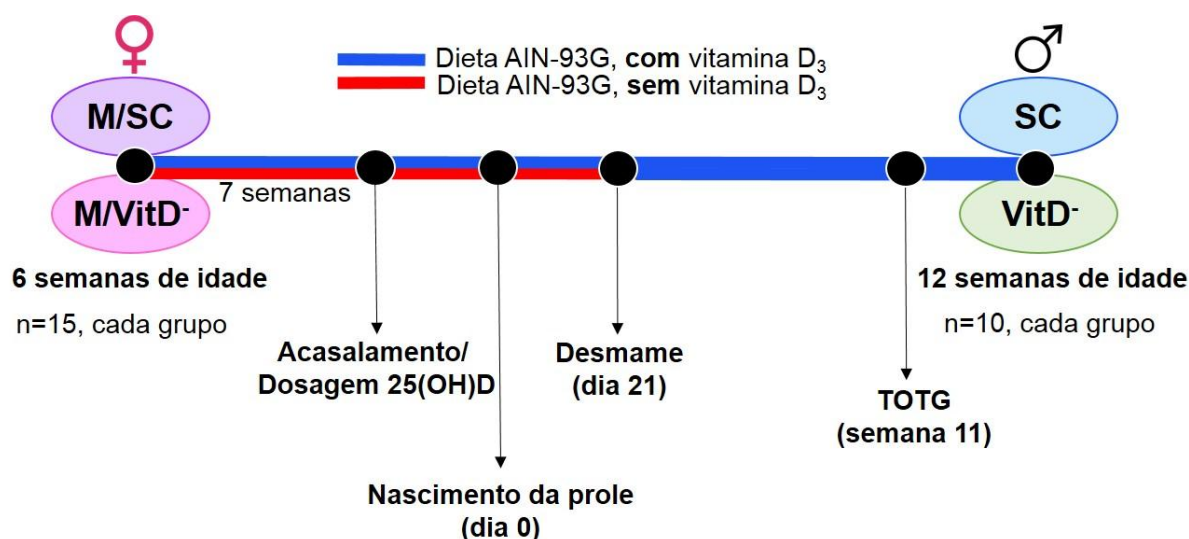
Ao desmame (21 dias), os filhotes machos compuseram a prole estudada (n=10, cada grupo):

- a) SC (prole macho oriunda de mãe controle, do grupo M/SC) e;

b) **VitD⁻** (prole macho oriunda de mãe deficiente de vitamina D, do grupo M/VitD⁻).

A prole foi alimentada apenas com dieta padrão, AIN-93G, com vitamina D₃. É importante ressaltar que todos os animais receberam as dietas experimentais *ad libitum* e tiveram livre acesso à água. As proles foram acompanhadas até os três meses de idade, e os grupos experimentais foram formados com no mínimo cinco animais para cada experimento, uma vez que a probabilidade necessária para um $P < 0,05$ é de $P = (1/2)^n < 0,05$, sendo este $n = 5$ (Figura 11).

Figura 11 - Linha do tempo do experimento, demonstrando o período de administração das dietas com e sem vitamina D, experimentos maternos e da prole e configuração dos grupos materno e prole experimental



Fonte: A autora, 2015

3.2 Experimentos Maternos

Todas as fêmeas foram acompanhadas para avaliação da massa corporal (MC) para determinação do ganho de peso e acompanhamento de possíveis alterações no crescimento ($n = 15$, cada grupo), desde a sexta semana de vida, quando foram divididas nos grupos e foi iniciada a administração das dietas até o acasalamento/eutanásia.

Na semana anterior ao acasalamento, as fêmeas que seriam colocadas para acasalar,

foram colocadas em jejum de seis horas (das 7h da manhã às 13h da tarde) para determinação da glicemia de jejum. Uma pequena incisão na cauda do animal foi realizada para aferição da glicose sérica pelo glicosímetro (Accu-check performa, Roche, Mannheim, Alemanha).

Após a restrição por sete semanas, as fêmeas que seriam destinadas para a comprovação da deficiência, foram deixadas em jejum de seis horas. Em seguida, todos os animais (n=5, cada grupo) foram anestesiados na câmara de CO₂ e uma incisão mediana na região torácica foi realizada, para exposição cardíaca. A coleta de sangue ocorreu, em temperatura ambiente de 21° C, através de punção cardíaca no átrio direito e o sangue foi armazenado em tubos de ensaio para posterior centrifugação e análise da concentração de 25(OH)D para comprovar a deficiência de vitamina D.

A análise da vitamina D foi realizada em duplicata pelo método de Ensaio Imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA) (25-Hydroxy Vitamin D EIA, AC-57F1, Immunodiagnostic System Limited, UK).

3.3 Experimentos na Prole

3.3.1 Biometria e Ingestão Alimentar

prole foi acompanhada semanalmente e teve a MC e aferidos do nascimento até a eutanásia. A ingestão alimentar foi acompanhada diariamente para o controle alimentar da prole. A aferição da MC e a ingestão alimentar ocorrem em balança de precisão de 0,01g.

3.3.2 Glicemia e Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG)

Na prole, o teste oral de tolerância à glicose (TOTG) foi realizado na semana anterior à eutanásia, após jejum de seis horas (7h da manhã às 13h da tarde). O método utilizado foi o mesmo descrito na aferição das progenitoras. Após esse procedimento, os animais foram gavados com uma solução de glicose a 25% na dose de 1,0g/Kg através da introdução de uma cânula orogástrica e todo o volume introduzido na cavidade gástrica, sem que houvesse perda

de líquido. Passados 15, 30, 60 e 120 minutos, a cauda dos animais foi ordenhada para obtenção de novas amostras de sangue e medições de glicose.

Os resultados glicêmicos foram analisados pelo GraphPad Prism (versão 6.05 para Windows, GraphPad Software, São Diego, Estados Unidos da América) e gerou uma área sob a curva (ASC) que pode ser utilizada para avaliação da tolerância à glicose.

3.3.3 Eutanásia

Da mesma forma que suas progenitoras, os filhotes após jejum de seis horas, todos os animais foram anestesiados na câmara de CO₂ e uma incisão mediana na região abdominal foi realizada, para exposição cardíaca. A coleta de sangue ocorreu, em temperatura ambiente de 21° C, através de punção cardíaca no átrio direito e o sangue foi armazenado em tubos de ensaio para posterior centrifugação.

Além disso, foram retirados 10 pâncreas por grupo, os órgãos de 5 animais foram destinados para o isolamento de ilhotas pancreáticas (*Western Blotting*) e outros 5 pâncreas para análises histológicas.

3.3.4 Bioquímica

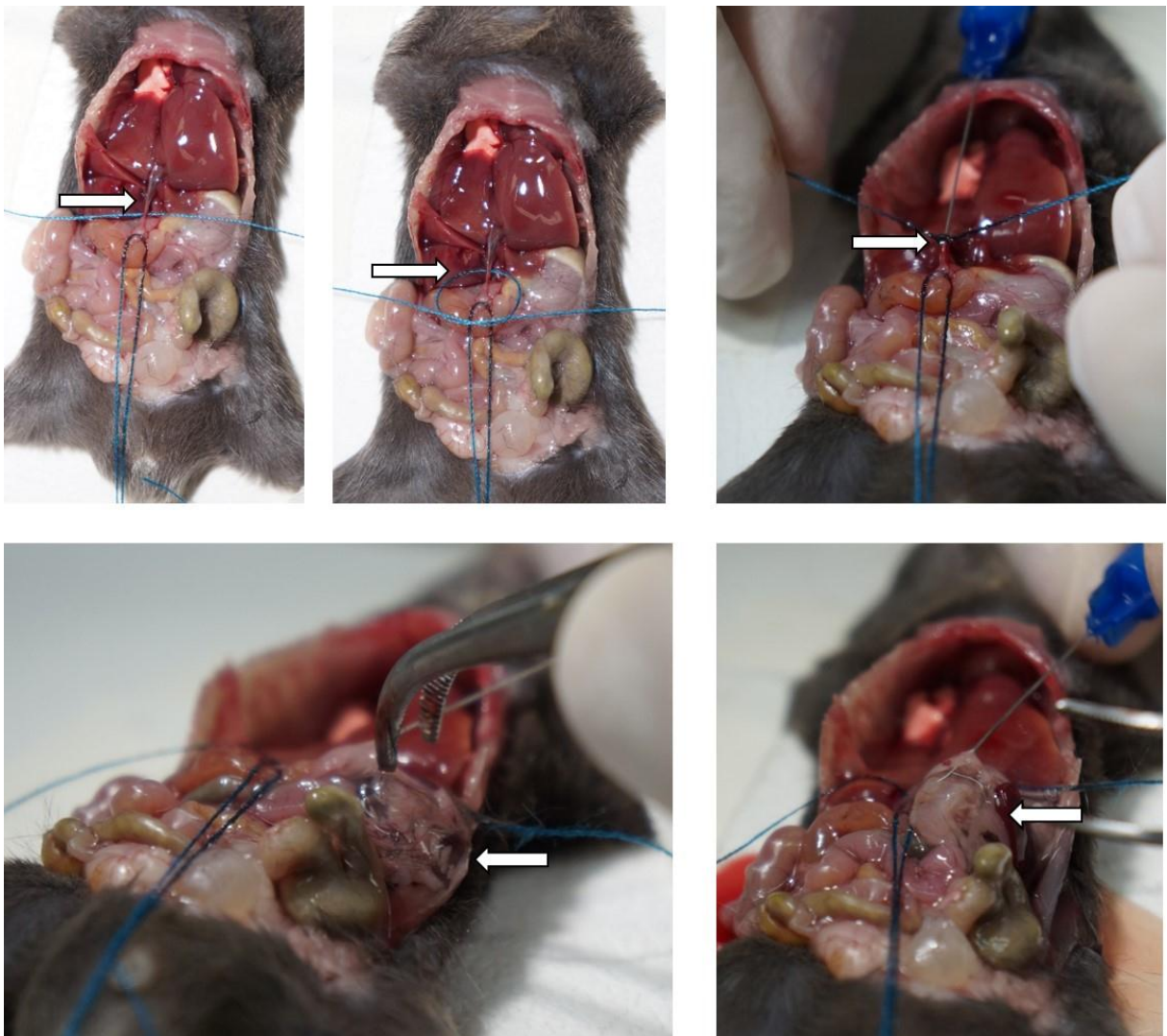
A coleta do plasma foi obtida através da centrifugação (120 g/15 minutos) do sangue coletado, em temperatura ambiente para posterior armazenamento em temperatura de -20° C. As análises realizadas foram glicose e insulina sérica. A primeira foi pelo método cinético-colorimétrico do manual de instruções da Bioclin® (Bioclin System II, Quibasa, Belo Horizonte - MG, Brasil). Além disso, analisou-se também a insulina sérica pelo método de ELISA, Rat/Mouse Insulin ELISA kit Cat. no. EZRMI-13 K, Millipore, Billerica, MA, USA.

3.3.5 Isolamento de Ilhotas Pancreáticas

As ilhotas foram isoladas pelo método da colagenase (Lacy e Kostianovsky, 1967). O ducto biliar comum foi canulado e inflado com solução de Hanks fria (suplementado com soro fetal de bovino, 1 mg/ml) contendo 0,8 mg/ml de colagenase (Figura 12). O pâncreas foi removido, colocado num tubo e incubou-se num banho de água a 37°C por 15 minutos para permitir a digestão de tecido exócrino. Em seguida, os tubos foram agitados durante 15 segundos. A digestão com colagenase foi completada pela adição de solução de Hank. O produto foi lavado três vezes por encher o recipiente com solução de Hanks. As ilhotas foram recolhidas manualmente sob um estereomicroscópio (Luxeo 4D microscópio estereoscópico, LABOMED, CA, EUA) com uma pipeta de Pasteur e imediatamente homogeneizados em tampão de extração (ureia a 7 M, EDTA 5 mM, Triton X-100 a 1%, de protease e inibidores de fosfatase).

Desta forma, foi separada apenas as ilhotas pancreáticas e armazenada em criotubos, devidamente identificados, a temperatura de -80° C.

Figura 12 - Procedimento de isolamento de ilhota pancreática



Legenda: A cavidade torácica foi exposta, o ducto biliar comum foi canulado e inflado com solução de Hanks fria, possuindo collagenase para digestão do tecido exócrino. Na linha superior, as setas demonstram o ducto biliar comum, onde é alocada a cânula para a introdução da solução de Hanks com a collagenase. Na linha inferior, as setas demonstram o pâncreas já inflado, sendo iniciada a digestão exócrina, sendo a última imagem a cânula introduzida no pâncreas, já inflado para garantir a maior área possível em contato com a solução.

Fonte: A autora, 2015.

3.3.6 Análise Microscópica do Pâncreas

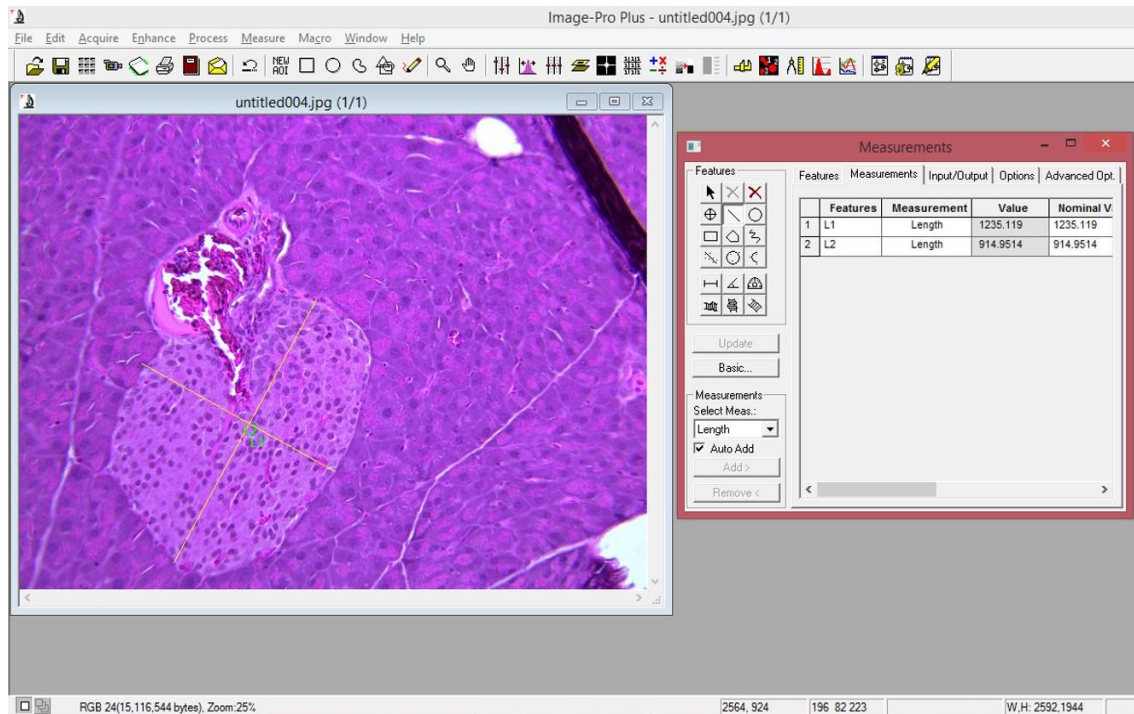
No momento da eutanásia, o pâncreas foi cuidadosamente dissecado e pesado, para determinação da sua massa (MP) (Fernandes-Santos *et al.*, 2009). O tecido foi totalmente

incluído em solução (1,27 mol/L de formaldeído em 0,1M de tampão fosfato, pH 7,2) durante 48 horas em temperatura ambiente. Após a fixação, todo o pâncreas foi processado para técnicas histológicas, incluído em Paraplast plus (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos da América), foram feitos cortes com cinco μm de espessura. Para a coloração com hematoxilina e eosina (HE), os cortes foram desparafinizados com xilol, seguido por alcoolização em concentrações decrescente de álcool e hidratação em água destilada, sendo finalmente corados em HE. Após a coloração, os cortes foram desidratados em álcool, diafanizados em xilol e a montagem das lâminas com Entellan (Merck Millipore) para fixação da lamínula. Vários cortes foram obtidos de cada fragmento do órgão e campos aleatórios pelo método de fractionator físico e foram analisados ao microscópio, configurando um estudo cego. As lâminas do pâncreas foram fotografadas e imagens digitais foram obtidas utilizando uma câmera digital Infinity1-5C no microscópio Leica® DMREB (Wetzlar, Alemanha) (Nascimento *et al.*, 2010).

3.3.7 Diâmetro da Ilhota

Para determinação do diâmetro médio da ilhota, o menor e maior diâmetro da ilhota pancreática foram medidas, no mínimo 200 ilhotas pancreáticas por grupo, pelo programa Image-Pro Plus (Image-Pro Plus, versão 7.01, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, Estados Unidos da América) (Souza-Mello *et al.*, 2011) (Figura 13).

Figura 13 - Análise do diâmetro da ilhota pancreática pelo software Image Pro-Plus®, versão 7.01 (Media Cybernetics, Silver Springer, MD, EUA)



Legenda: Uma imagem digital do pâncreas foi adquirida e duas medidas de diâmetro por ilhota foram realizadas, para o cálculo do diâmetro médio. No quadro a direita estão os valores dos diâmetros mensurados.
Fonte: A autora, 2015.

3.3.8 Área Média da Ilhota

Para determinação da área média das ilhotas pancreáticas (Figura 14), foi utilizado um sistema teste produzida com o auxílio do software STEPanizer (www.stepanizer.com), constituído de uma grade contendo 64 pontos (Tschanz et al., 2011), e linhas permitidas e proibidas para análise da densidade de volume da ilhota ($V_{v[ilhota]}$). O V_v é a razão entre número de pontos do sistema teste, que tocavam as estruturas (ilhota) (P_p) e o número total de pontos (P_T) (Mandarim-de-Lacerda, 2003), ou seja, a seguinte fórmula:

$$V_{v[ilhota]} = P_p \text{ [Ponto nas ilhotas]} / P_T \text{ [Pontos totais]} \quad (1)$$

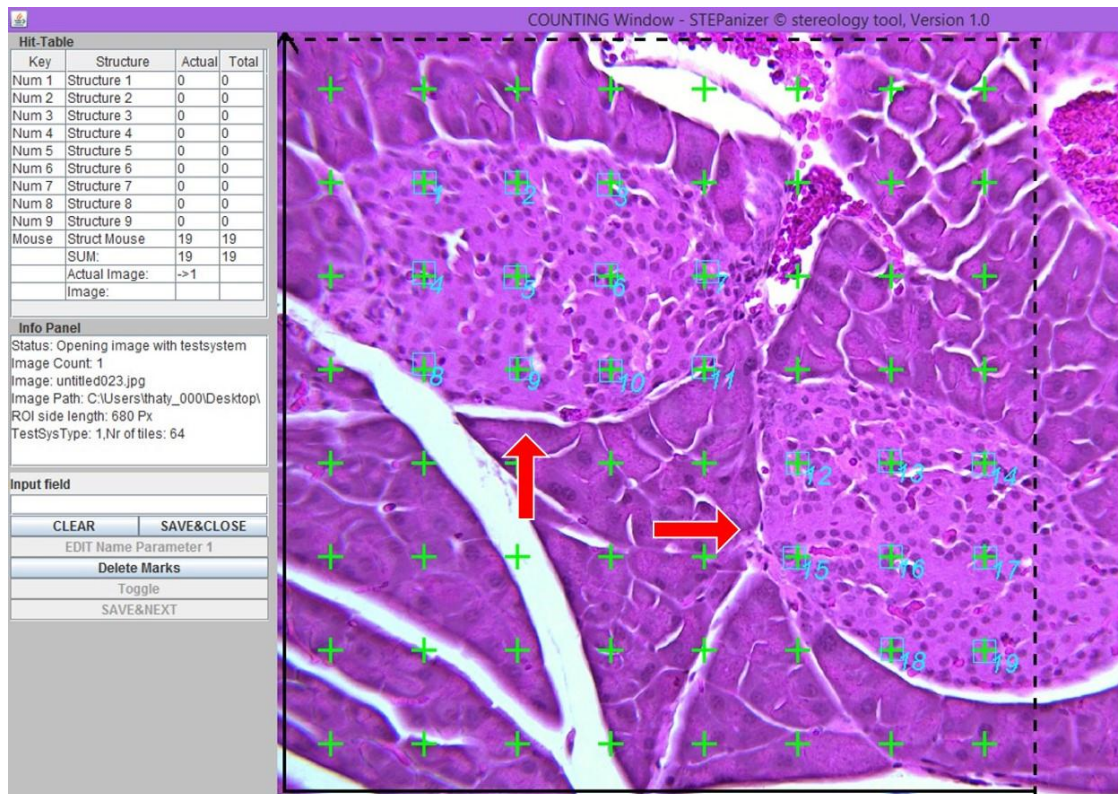
A área seccional média da ilhota ($A_{[ilhota]}$) foi estimada através da seguinte fórmula:

$$A_{[ilhota]} = V_v / 2 \cdot Q_A, \quad (2)$$

Sendo o Q_A , o número de estruturas (ilhas) por área teste dividida pela área total do sistema teste, desde que não tocasse a linha proibida e suas extensões², configurando uma relação entre número de ilhotas contidas na área do sistema teste (Nyengaard, 1999).

Juntamente a isto, foi obtida a massa da ilhota pancreática ($M_{[ilhota]}$) pelo produto do V_v pela massa do pâncreas (MP), que será utilizado em técnicas futuras.

Figura 14 - Determinação da área média da ilhota



Legenda: Determinação do V_v , razão dos pontos que tocam as estruturas, na imagem representada por 19 pontos, representado pelos quadrados azuis numerados, pelo total de pontos (64 pontos) do sistema teste e determinação do Q_A , número de estruturas no sistema teste, na imagem 2 ilhotas, demonstrados com as setas vermelhas

Fonte: A autora, 2015.

² Gundersen HJ (1977) Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary profiles: the edge effect. J Microsc 111:219-227.,

3.3.9 Imunohistoquímica

Para a quantificação de massa de células-beta foi realizada a técnica de imunoperoxidase. Utilizaram-se quatro lâminas de cada animal que foram alocadas na estufa a 60°C para desparafinização. Em seguida, elas passaram por um processamento para hidratação por imersão em xilol, álcool (em concentrações decrescentes e água destilada). Os cortes foram lavados em seguida com PBS 1X. A recuperação antigênica foi feita através do tampão citrato, pH=6,0, mantido a 60°C em banho maria por 30 minutos. Após esta etapa, foi realizado o isolamento dos cortes com caneta hidrofóbica e o posterior bloqueio da peroxidase endógena. Após uma nova lavagem em PBS, foi utilizado PBS+BSA 1% por 20 minutos para o bloqueio das ligações inespecíficas. Em seguida foi incubado o anticorpo primário Anti-Insulin (anti-guinea-pig, policlonal, AB7824, Abcam, 1:100) por 2h em temperatura ambiente e overnight na geladeira.

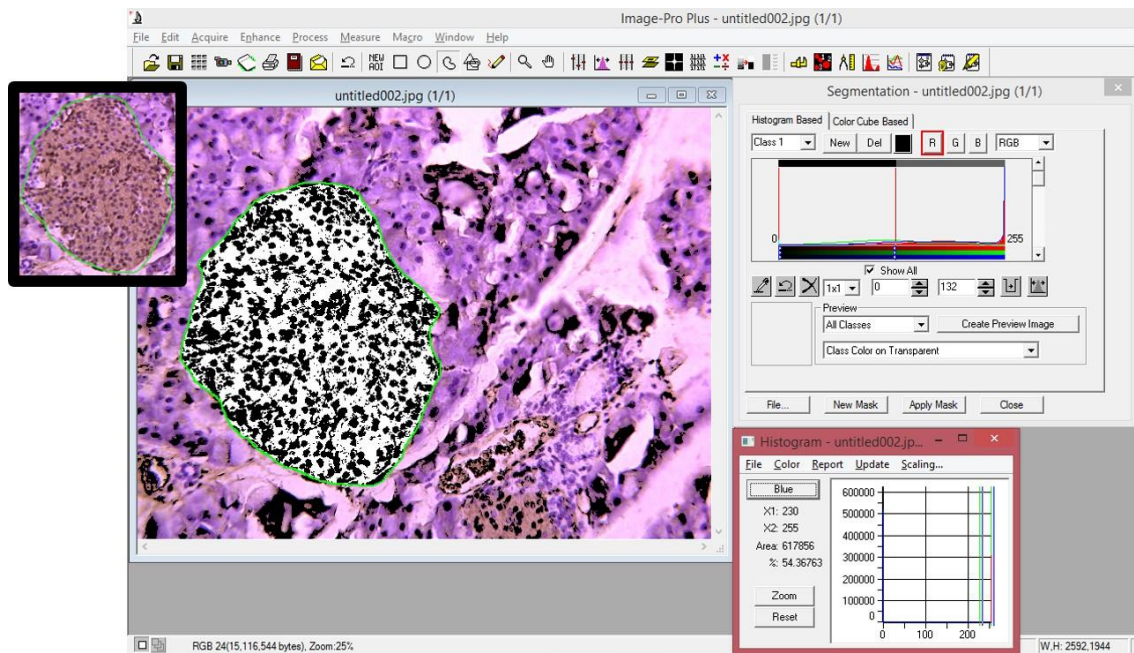
No dia seguinte, após a ambientalização do material, foi realizada uma lavagem e as reações foram amplificadas com um complexo de biotina-estreptavidina, seguido por incubação com anticorpos secundários biotinizados e conjugados ao complexo estreptavidina-peroxidase (HistostainPlus Kit, Invitrogen, CA, USA). Os cortes foram lavados em PBS e em seguida as reações foram reveladas com o cromógeno diaminobenzidina (DAB) líquido (HistostainPlus Kit, Invitrogen, CA, EUA), e contrastadas com hematoxilina. As imagens digitais dos cortes corados foram adquiridas utilizando uma câmera digital uma câmera digital Infinity1-5C no microscópio Leica® DMREB (Wetzlar, Alemanha).

3.3.10 Massa de Células-Beta

A massa de células-beta foi estimada através da análise de imagens. Para tal, foi calculada a densidade de volume de células-beta ($V_{v[\text{células-beta}]}$), utilizando uma ferramenta de seleção de densidade para as áreas imunomarcadas positivamente com insulina expressa pelas ilhotas pancreáticas, e em seguida foram segmentadas com o auxílio do software Image-Pro Plus (Image-Pro, versão 7.01, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, Estados Unidos da América) (Mandarim-de-Lacerda *et al.*, 2010) conforme a figura 15 para a obtenção do

percentual da área marcada por imunomarcação. Desta forma, a massa de células-beta ($M_{[células-beta]}$) foi estimada através do produto do $V_v [células-beta]$ pela massa da ilhota ($M_{[ilhota]}$) (Frantz *et al.*, 2011).

Figura 15 - Segmentação da ilhota pancreática para obtenção da densidade de volume da insulina



Legenda: . Após a imunomarcação para insulina, uma imagem digital do pâncreas foi obtida. Com o auxílio do software Image-Pro Plus, foi realizada a segmentação da ilhota, a partir da qual a área em branco corresponde à área com marcação positiva para insulina. No quadro à direita encontra-se o valor correspondente ao percentual de área marcada para insulina (54%).

Fonte: A autora, 2015

3.3.11 Imunofluorescência

Os tecidos emblocados para a microscopia de luz também foram utilizados para a imunofluorescência. Foram utilizados cortes com 5 μm de espessura, fixados em formalina e incluídos em Paraplast Plus (Sigma-Aldrich, ST. Louis, PAIMO, USA). A recuperação antigênica foi feita com tampão citrato pH 6,0 a 60°C e pepsina. A seguir, as amostras foram incubadas com solução bloqueadora (4% BSA e 1% Triton X-100 em PBS; Sigma, St. Louis, MO) por 1 hora em temperatura ambiente para bloqueio de ligações inespecíficas. A seguir, o material foi incubado simultaneamente com os anticorpos primários anti-insulina e anti-

glucagon, para a obtenção da dupla marcação. Ambos foram diluídos em solução bloqueadora de acordo com as instruções do fabricante por 12 horas à 4°C. Posteriormente, as lâminas com as amostras foram lavadas (3X de 5 minutos) em tampão PBS, com posterior incubação com anticorpo secundário específico conjugado à fluoresceína (Alexa Fluor). As lâminas foram montadas em meio de montagem Slowfade (Molecular Probes), com posterior observação no microscópio Confocal (Meta LSM 510-Zeiss).

3.3.12 *Western blotting*

As ilhotas pancreáticas foram armazenadas no freezer a -80°C e foram utilizados para análise da expressão de proteínas específicas, realizado pelo método do *western blotting*.

As proteínas foram extraídas por tampão adicionado de inibidores de protease. O homogenato foi centrifugado a 7380 rpm/5000 g por 20 minutos e a 4°C, para então coleta do sobrenadante. Quantidades iguais de proteínas foram suspensas em SDS, com tampão de amostra, aquecidas por cinco minutos a 100°C e separadas por SDS/PAGE. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas PVDF (Hybond-P; Amersham Biosciences), quando então as membranas foram bloqueadas por leite desnatado a 6% ou Soro Fetal Bovino (BSA) (A7906-50, Sigma-Aldrich, EUA) com solução tampão de Tris [20 mM Tris/HCl (pH 7,4) e 500 mM NaCl], contendo 0,05% de Tween 20 (T-TBS). Somente após o bloqueio, a membrana foi incubada com os seguintes anticorpos primários.

- a) Anticorpo policlonal anti-VDR produzido em coelho (AB3508; 53 kDa; Abcam) na diluição 1:500;
- b) Anticorpo policlonal anti-CYP27B1 produzido em coelho (AB95047; 57 kDa; Abcam) na diluição 1:500;
- c) Anticorpo policlonal anti-PDX-1 produzido em coelho (AB3503-I; 38 kDa; Millipore Corp.) na diluição 1:500;
- d) Anticorpo policlonal anti-GLUT-2 produzido em coelho (07-1402; 57 kDa; Millipore Corp.) na diluição 1:500;
- e) Anticorpo policlonal anti-GLK produzido em coelho (AB37796; 65 kDa; Abcam) na diluição 1:500;

- f) Anticorpo policlonal anti-Insulina produzido em porco-espinho(AB7842; 12 kDa; Abcam) na diluição 1:500;
- g) Anticorpo policlonal anti-IRS-1 produzido em coelho (AHO1222; 165 kDa; Life Technologies Corporation) na diluição 1:500;
- h) Anticorpo policlonal anti-PI3-K produzido em coelho (SC67306; 190 kDa; Santa Cruz Biotechnology) na diluição 1:500;
- i) Anticorpo policlonal anti-PDK-1 produzido em cabra (SC7140; 49 kDa; Santa Cruz Biotechnology) na diluição 1:500;
- j) Anticorpo policlonal anti-AKT produzido em coelho (44-609G; 55 kDa; Life Technologies Corporation) na diluição 1:500;
- k) Anticorpo monoclonal anti-pAKT produzido em coelho (44-621G; 65 kDa; Life Technologies Corporation) na diluição 1:500;
- l) Anticorpo policlonal anti-FoxO1 produzido em coelho (SAB4300410; 78-82 kDa; Sigma-Aldrich)) na diluição 1:500;
- m) Anticorpo policlonal anti-pFoxO1 produzido em coelho (AB47326 SAB4300112; 78-82 kDa; Sigma-Aldrich) na diluição 1:500;
- n) Anticorpo monoclonal anti-Beta-actina produzido em camundongo (SC-81178; 43 kDa; Santa Cruz Biotechnology; diluição 1:1000)

Além disso, todas as membranas foram lavadas e incubadas com anticorpo secundário, sendo eles: *anti-rabbit* (produzido em coelho), (1:5000 para VDR, CYP27B1, PDX-1, GLUT-2, GLK, IRS-1, PI3-K, AKT, pAKT, FoxO1 e pFoxO1), *anti-guinea pig* (produzido em porco-espinho), (1:5000 para Insulina), *anti-goat* (produzido em cabra), (1:5000 para PDK-1) e *anti-mouse* (produzido em camundongo), (1:500 para Beta-actina). As expressões de proteína foram detectadas de acordo com o manual de instruções com sistema de detecção por quimioluminescência (ECL; Amersham Biosciences). O gene constitutivo beta-actina foi utilizado para correção da expressão proteica.

As proteínas foram visualizadas por Bio-Rad's Molecular Imaging ChemiDoc-Systems (Bio-Rad, CA) e obtidas por análise quantitativa de imagens digitais (Image-Pro Plus versão 7.01, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, Estados Unidos da América), para determinação da absorbância, pelo software Image J (<http://imagej.nih.gov/ij/index.html>).

3.4 Análise Estatística dos Dados

Os dados foram testados para distribuição normal e homogeneidade de variância e são apresentados em média e desvio padrão da média (DP). Após, a diferença entre os grupos foi analisada pelo teste-*t* de Student, não pareado. Para todas as análises utilizou-se o software GraphPad Prism versão 6.05 (La Jolla, CA, Estados Unidos da América). Um valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4. RESULTADOS

4.1 Dados Maternos

A massa corporal (MC) antes e depois da dieta, a glicemia de jejum e a intolerância à glicose das progenitoras não foram estatisticamente diferentes entre os grupos, assim como nas ninhadas. No entanto, os níveis séricos de 25(OH)D (-81%; $P=0,019$) foram significativamente reduzidos no grupo M/VitD⁻ em comparação com o grupo M/SC, comprovando a deficiência em vitamina D (Tabela2).

Tabela 2 - Dados de ganho de peso, crescimento, glicemia e dosagem de vitamina D circulante das progenitoras

	M/SC	M/VitD ⁻
MC antes da dieta (g)	18,13±0,73	18,11±1,21
MC antes do acasalamento (g)	20,99±0,91	21,27±1,02
Glicose basal (mmol/L)	6,56 ±1,21	6,40±0,74
25(OH)D (ng/L)	15,07±4,83	2,80±1,53 [†]

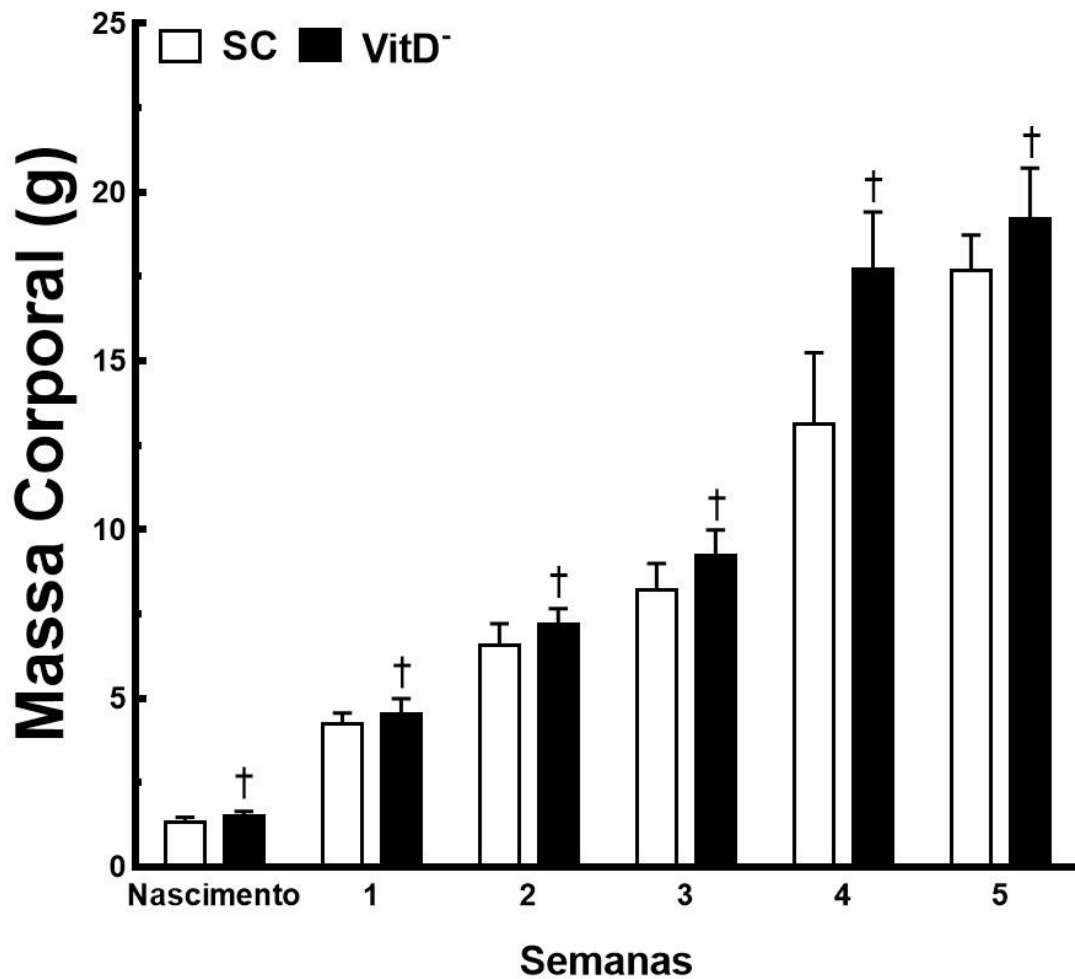
Legendas: Valores são média ± DP e diferenças foram testadas com teste-t não pareado ($P<0,05$). O símbolo † significa diferença estatística com o grupo SC. N=10, em cada grupo para MC e glicose e N=5, em cada grupo para 25(OH)D. M/SC, mães alimentadas com dieta AIN93G com vitamina D; M/VitD⁻, mães alimentadas com dieta AIN93G sem vitamina D; g, grama; MC, massa corporal; mmol, milimol; L, litro; 25(OH)D, 25-hidroxi-vitamina D; ng, nanograma.

4.2 Dados da Prole

4.2.1 Dados Biométricos: Ingestão Alimentar e da Massa Corporal das Proles

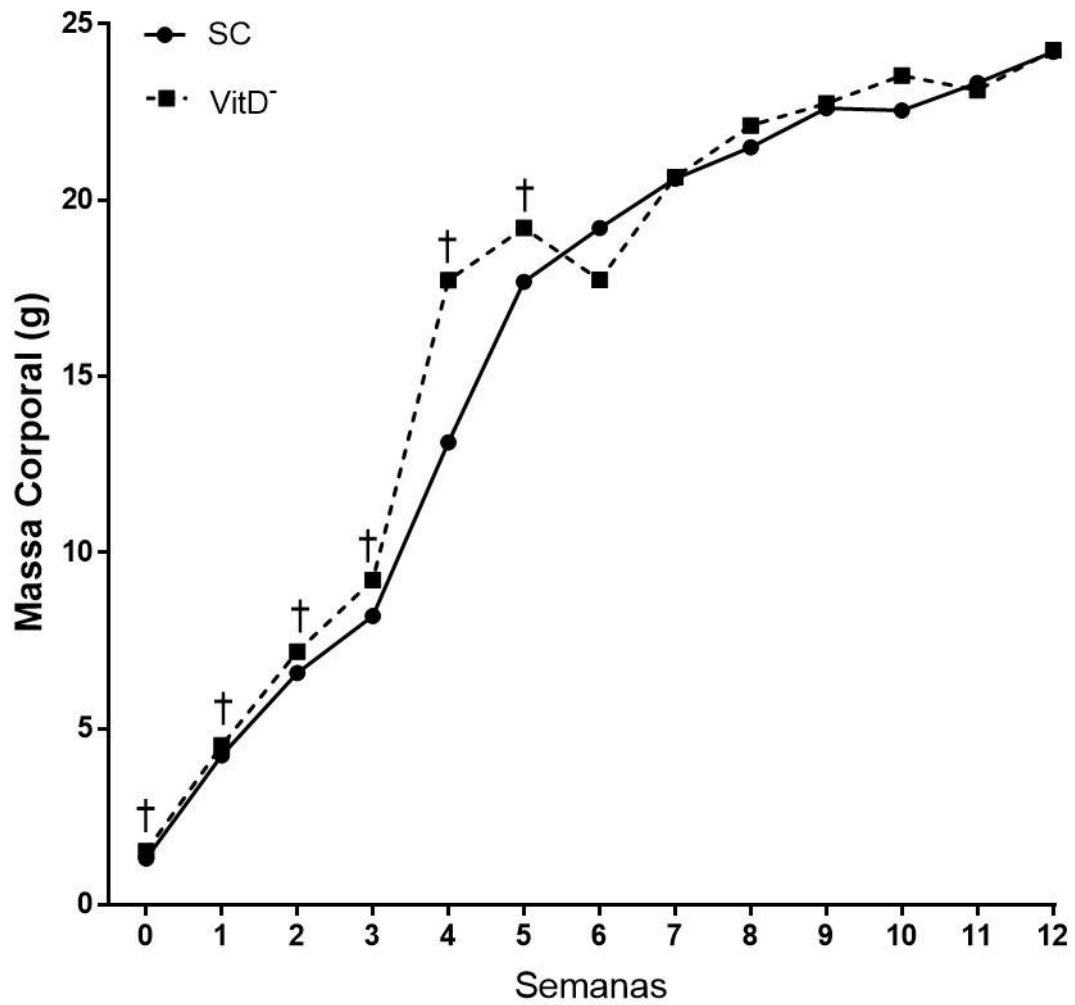
Em relação a MC da prole, o grupo VitD⁻ apresentou um incremento desde o nascimento (SC=1,38±0,16; VitD⁻=1,52±0,12; $P=0,002$) até a 5^a semana de vida (SC=17,68±1,05; VitD⁻=19,21±1,51; $P=0,0110$) quando comparado com o grupo SC ($P<0,0500$), ilustrados na Figura 16. A partir da 6^a semana de vida (SC=19,21±0,83; VitD⁻=17,74±1,11; $P=0,2046$), o grupo oriundo de mães deficientes se igualou ao grupo advindo de mães controle, permanecendo até o final do experimento sem diferença. Esses dados são ilustrados na Figura 17. Em todo o período experimental, não foram encontradas diferenças significativas quanto à ingestão alimentar (SC=2,53±0,51; VitD⁻=2,51±0,49; $P=0,9013$).

Figura 16 - Evolução de massa corporal nas fases iniciais da vida (nascimento, 1ª semana de idade, 2ª semana de idade, 3ª semana de idade, 4ª semana de idade e 5ª semana de idade)



Legenda: A coluna branca representa o grupo SC e a coluna preta representa o grupo VitD⁻. n=10 por grupo. Os dados são apresentados como a média ± DP, e as diferenças foram testadas com um teste-t não pareado ($P < 0,05$). † indica uma diferença significativa relativa ao grupo SC (controle).

Figura 17 - Evolução de massa corporal do nascimento à 12ª semana de idade

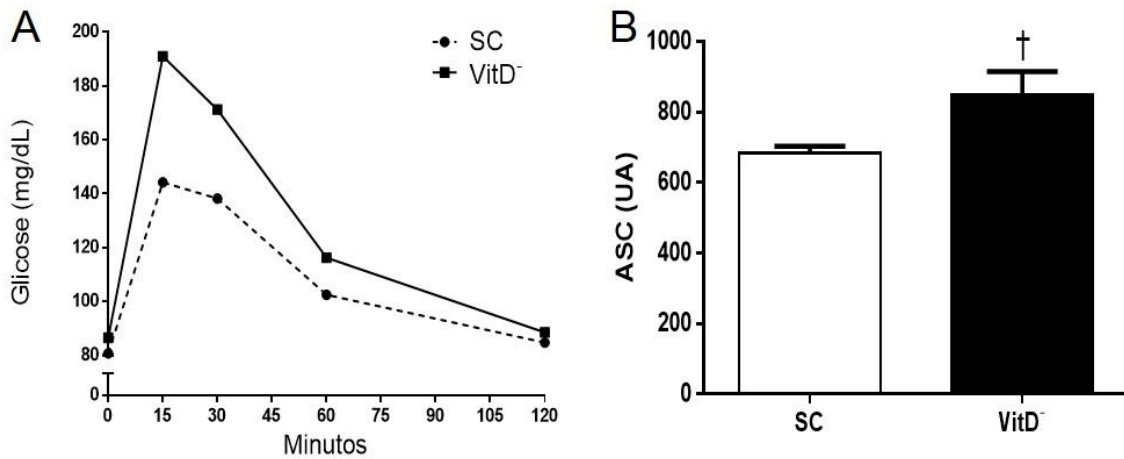


Legenda: Os dados são apresentados como a média \pm DP, e as diferenças foram testadas com um teste-t não pareado ($P < 0,05$). $n = 10$ por grupo. † indica uma diferença significativa relativa ao grupo SC (controle).

4.2.2 Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG) das Proles

A glicemia de jejum foi maior no grupo VitD⁻ em comparação com o grupo SC (+ 22%, $P=0,012$) no momento do TOTG. Em relação a "área sob a curva" (ASC) para o TOTG, a descendência VitD⁻ mostrou-se intolerante quando comparado com a descendência SC devido a dieta materna (+ 25%, $P=0,050$) (Figura 18).

Figura 18 - Teste oral de tolerância à glicose (TOTG) dos grupos aos três meses de idade



Legenda: A. Gráfico da mensuração da glicose pelos tempos 0, 15, 30, 60 e 120. B. Área sob a curva (ASC). A coluna branca representa o grupo SC (controle) e a coluna preta representa o grupo VitD⁻. n=10 por grupo. Os valores são expressos em média \pm desvio padrão (DP) e foram testados teste-t não pareado ($P<0,05$). O símbolo † ilustra diferença estatística com o grupo SC.

4.2.3 Análise Bioquímica das Proles

A deficiência materna em vitamina D foi capaz de modificar os parâmetros bioquímicos da prole, aos três meses de vida. Os dados são apresentados na Tabela 3, a qual mostra que o grupo VitD⁻ teve um aumento na glicose sérica (+31%, $P=0,012$) e uma diminuição de 37% na secreção de insulina ($P=0,024$) quando comparado ao grupo SC.

Tabela 3 - Dados de ingestão alimentar e bioquímicos da prole aos três meses de idade

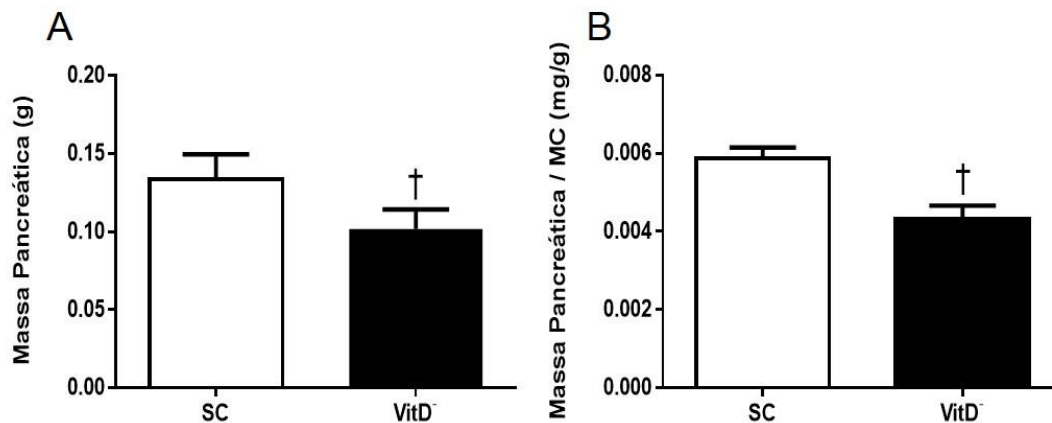
Parâmetros	SC	VitD ⁻
Glicose Sérica (mmol/L)	4,25±0,62	5,19±0,58 [†]
Insulina Sérica (pmol/L)	658,00±127,50	416,00±147,9 [†]

Legendas: Valores são média ± DP e diferenças foram testadas com teste-t não pareado ($P<0,05$). O símbolo † significa diferença estatística com o grupo SC (controle). N=10, cada grupo. DP, desvio padrão; MC, massa corporal; mmol, milimol; L, litro, pmol, picomol, SC, prole de mães alimentadas com dieta controle; VitD⁻, prole de mães alimentadas com dieta deficiente em vitamina D; g, gramas.

4.2.4 Avaliação da Massa do Pâncreas das Proles

No momento em que os animais foram sacrificados, o grupo VitD⁻ tinha uma massa pancreática significativamente menor em comparação com o grupo SC (-24%; $P=0,008$). Após ajuste para a MC, a massa pancreática ainda foi significativamente menor no grupo VitD⁻ em comparação com o grupo SC (-21%; $P=0,004$). Esses dados estão demonstrados na Figura 19.

Figura 19 - Massa Pancreática



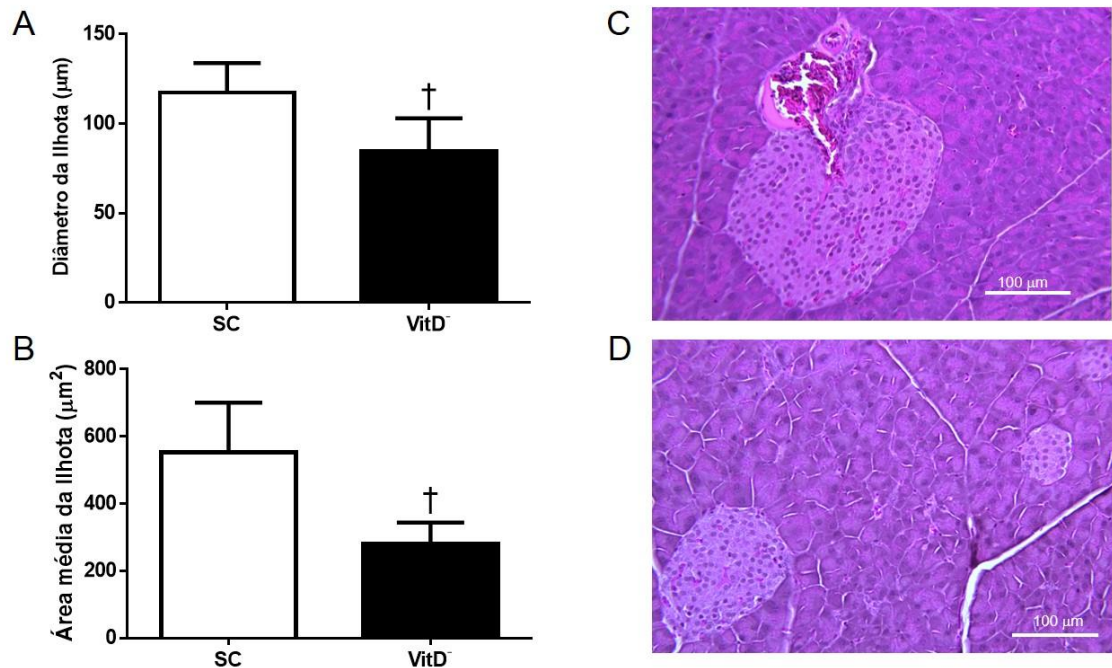
Legenda: A. Massa pancreática obtida no momento do sacrifício; B. Massa pancreática obtida no momento do sacrifício, corrigido pela massa corporal de cada animal. A coluna branca representa o grupo SC (controle) e a coluna preta representa o grupo VitD⁻. n=5 por grupo. Os dados são apresentados como a média \pm DP, e as diferenças foram testadas com um teste-t não pareado ($P<0,05$). O símbolo † ilustra diferença estatística com o grupo SC.

4.2.5 Avaliação Estereológica das Ilhotas Pancreáticas das Proles

A principal característica morfológica observada no pâncreas do grupo VitD⁻ foi a diminuição na área da ilhota pancreática quando comparados ao grupo SC.

Observou-se uma redução no diâmetro da ilhota (-25%, $P=0,018$) do grupo VitD⁻ quando comparado com o grupo SC, corroborando com os dados da área média da ilhota (-49%, $P=0,043$), conforme demonstrado nas fotomicrografias, coradas em HE da figura 20.

Figura 20 - Morfometria da ilhota

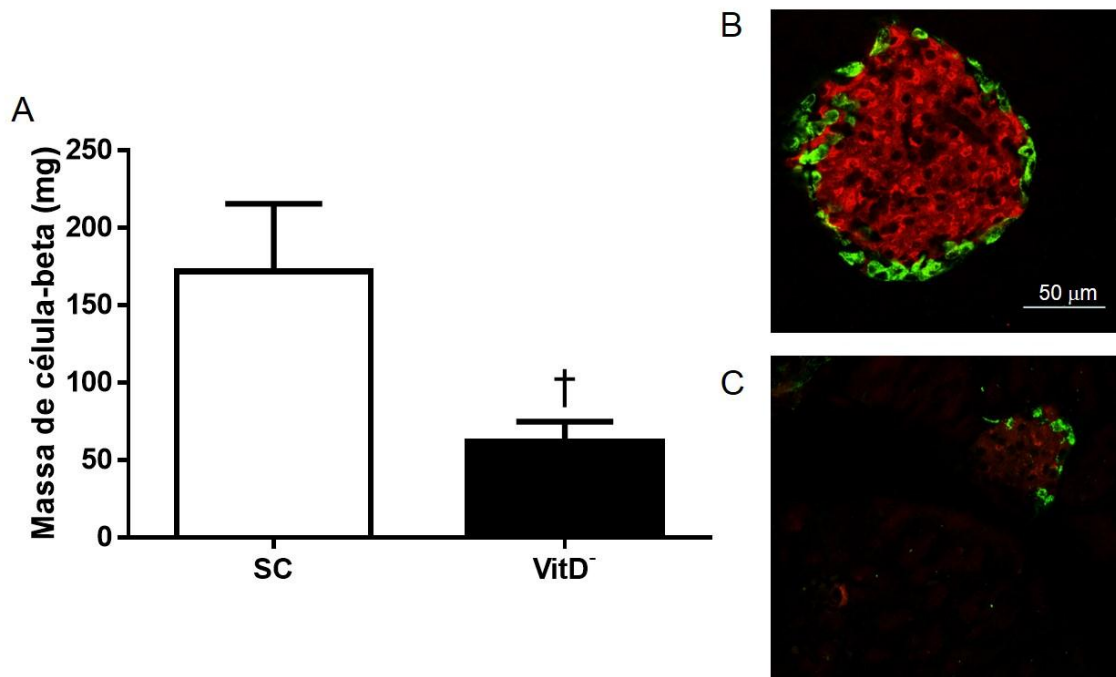


Legenda: A. Diâmetro da ilhota pancreática em µm; B. Área média da ilhota pancreática em µm²; C. Fotomicrografia de ilhota pancreática corada em HE representando o grupo SC (controle) aos três meses de idade; D. Fotomicrografia de ilhota pancreática corada em HE representando o grupo VitD⁻ aos três meses de idade; A coluna branca representa o grupo SC e a coluna preta representa o grupo VitD⁻. n=5 por grupo. Os dados são apresentados como a média ± DP, e as diferenças foram testadas com um teste-t não pareado ($P<0,05$). O símbolo † ilustra diferença estatística com o grupo SC.

A massa de células-beta foi reduzida na prole VitD⁻ em comparação com a prole SC (-63%; $P=0,014$). No entanto, a imunofluorescência com uma dupla marcação revelou que a arquitetura de células-beta (marcadas com anti-insulina) e células-alfa (marcadas com anti-

glucagon) permaneceram intactas nas ilhotas pancreáticas dos camundongos, sugerindo apenas uma hipertrofia de ilhota. Estes dados encontram-se na figura 21.

Figura 21 - Massa de células-beta na ilhota de camundongos *C57Bl/6* macho aos três meses de idade e imunofluorescência



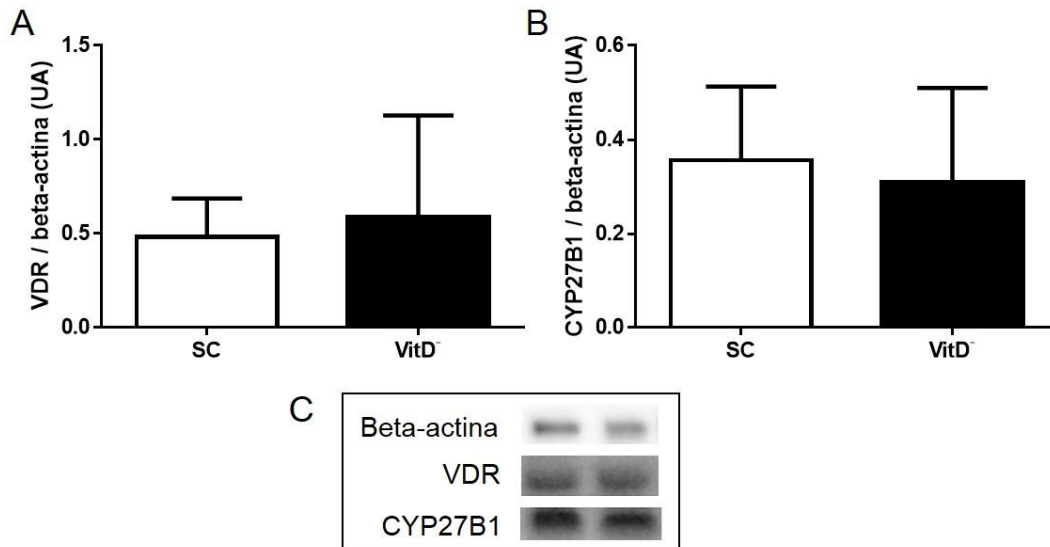
Legenda: Análise de massa de células-beta na ilhota de camundongos *C57Bl/6* macho aos três meses de idade e fotomicrografias de ilhotas pancreáticas em imunofluorescência, em que a marcação em verde com o anticorpo anti-glucagon representa as células-alfa e a marcação em vermelho com o anticorpo anti-insulina representando as células-beta: A. Massa de células-beta da ilhota pancreática; B. Fotomicrografia representativa do grupo SC (controle) aos três meses de idade; C. Fotomicrografia representativa do grupo VitD⁻ aos três meses de idade; A coluna branca representa o grupo SC e a coluna preta representa o grupo VitD⁻. n=5 por grupo. Os dados são apresentados como a média ± DP, e as diferenças foram testadas com um teste-t não pareado ($P < 0,05$). O símbolo † ilustra diferença estatística com o grupo SC.

4.2.6 Avaliação da Expressão Proteica de VDR e CYP27B1 na Ilhota Pancreática

A fim de verificar se a deficiência materna de vitamina D poderia afetar o receptor de vitamina D e a expressão da enzima 1- α -hidroxilase (CYP27B1) aos 3 meses de idade, foi realizado a técnica de *western blotting*. Nenhuma diferença foi detectada na expressão de

VDR ($P=0,695$) e CYP27B1 ($P=0,455$) no grupo VitD⁻ quando comparado ao grupo SC, conforme demonstrado na figura 22.

Figura 22 - Análise de *western blotting* representativo na expressão proteica na ilhota de camundongos C57Bl/6 macho aos três meses de idade

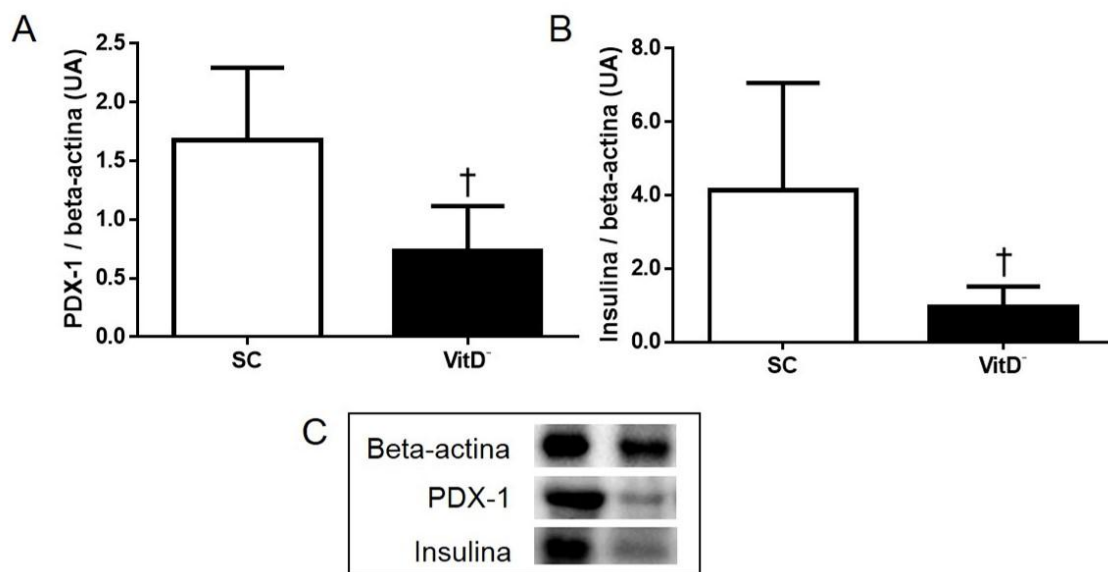


Legenda: A) VDR (receptor de vitamina D), B) CYP27B1 (1 α -hidroxilase), C) Blots representativos das proteínas. Os dados são apresentados como a média \pm DP, e as diferenças foram testadas com um teste-t não pareado ($P<0,05$) e foram normalizados com a beta-actina, uma proteína constitutiva, sem alteração entre os grupos. A coluna branca representa o grupo SC (controle) e a coluna preta representa o grupo VitD⁻. N=5 por grupo. O símbolo † ilustra diferença estatística com o grupo SC.

4.2.7 Avaliação da Expressão Proteica de PDX-1, Insulina, GLUT-2 e GLK na Ilhota Pancreática

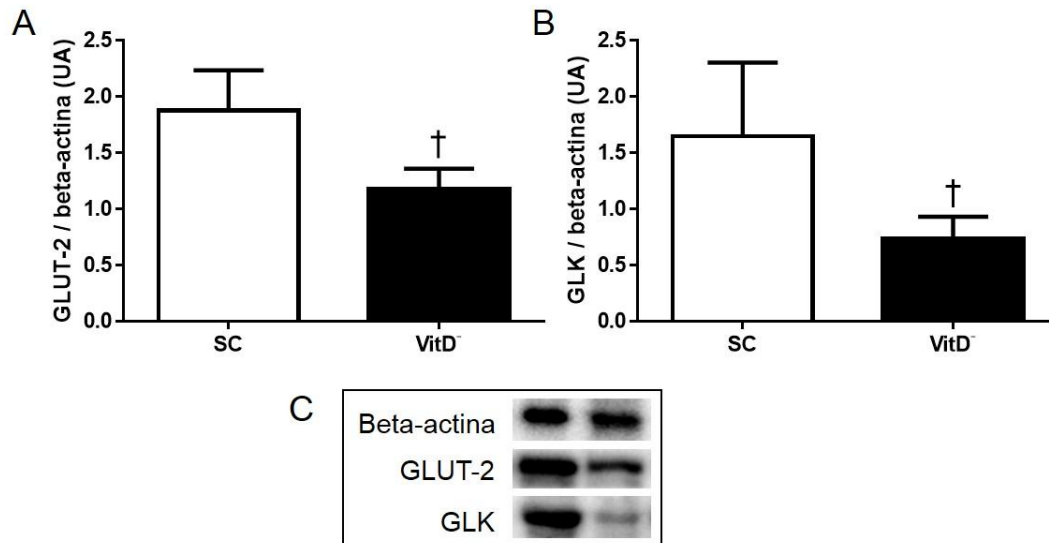
As expressões de PDX-1, insulina, GLUT-2 e GLK nas ilhotas foram reduzidas pela deficiência materna de vitamina D. Tal como ilustrado, o grupo VitD⁻ teve menor expressão de PDX-1 (-56%; $P=0,016$) e insulina (-76%, $P=0,003$). Esses dados estão demonstrados na figura 23. Juntamente a isto, houve a redução proteica de GLUT-2 (-37%; $P=0,003$) e GLK (-50%; $P=0,045$) nas ilhotas pancreáticas e em comparação com o grupo SC, conforme a figura 24.

Figura 23 - Análise de *western blotting* representativo na expressão proteica na ilhota de camundongos C57Bl/6 macho aos três meses de idade



Legenda: A) PDX-1 (Pancreatico/duodenal homebox 1), B) Insulina, C) Blots representativos das proteínas. Os dados são apresentados como a média \pm DP, e as diferenças foram testadas com um teste-t não pareado ($P<0,05$) e foram normalizados com a beta-actina, uma proteína constitutiva, sem alteração entre os grupos. A coluna branca representa o grupo SC (controle) e a coluna preta representa o grupo VitD⁻. N=5 por grupo. O símbolo † ilustra diferença estatística com o grupo SC.

Figura 24 - Análise de *western blotting* representativo na expressão proteica na ilhota de camundongos C57Bl/6 macho aos três meses de idade

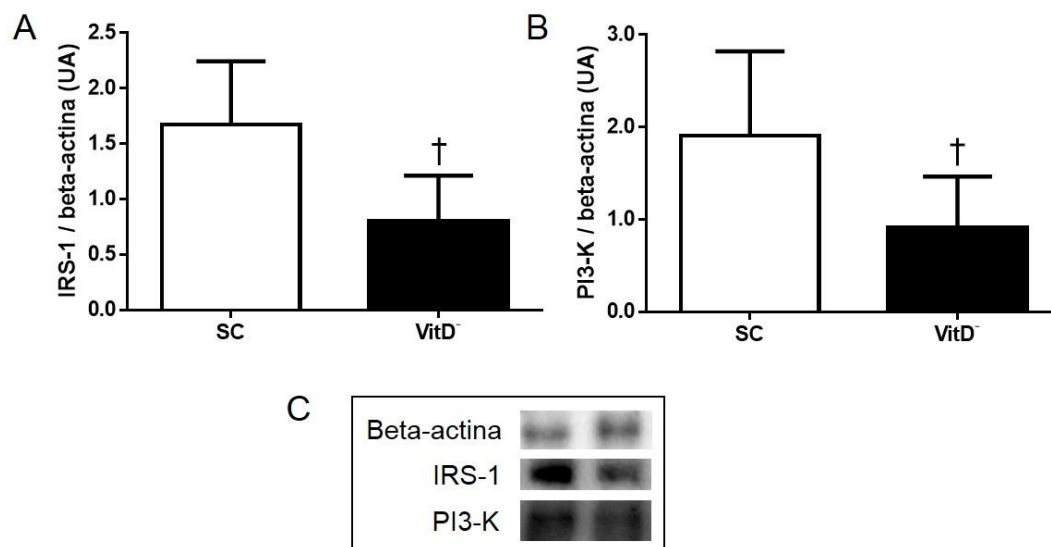


Legenda: A) GLUT-2 (transportador de glicose 2), B) GLK (glicocinase), C) Blots representativos das proteínas. Os dados são apresentados como a média \pm DP, e as diferenças foram testadas com um teste-t não pareado ($P < 0,05$) e foram normalizados com a beta-actina, uma proteína constitutiva, sem alteração entre os grupos. A coluna branca representa o grupo SC (controle) e a coluna preta representa o grupo VitD⁻. N=5 por grupo. O símbolo † ilustra diferença estatística com o grupo SC.

4.2.8 Avaliação da Expressão Proteica dos Componentes da Via de Sinalização da Insulina na Ilhota Pancreática

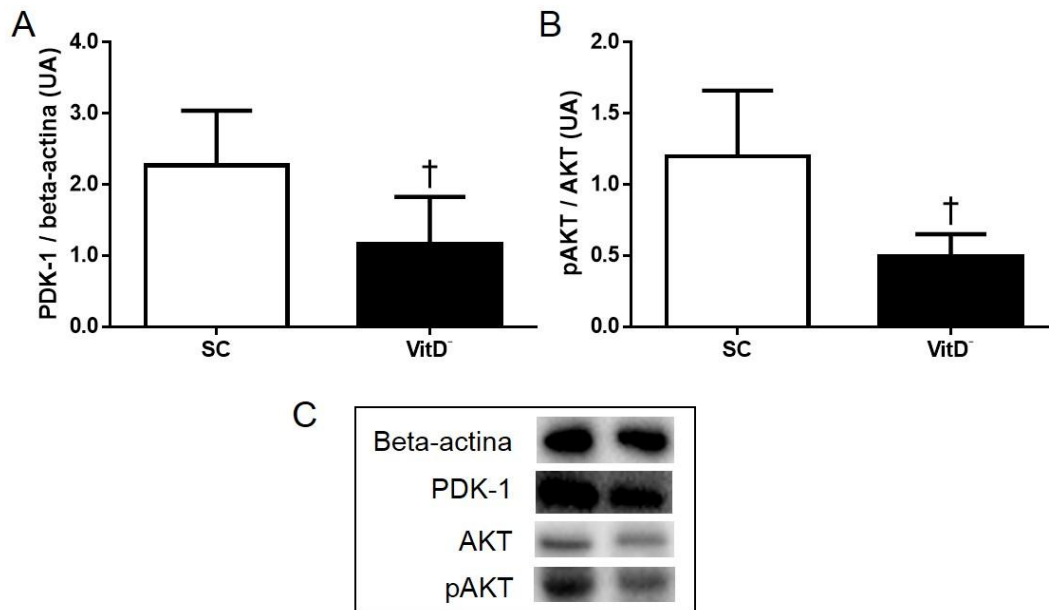
A expressão das proteínas envolvidas na via de sinalização de insulina são demonstradas nas figuras 25 a 27. A deficiência materna de vitamina D levou a uma redução significativa na expressão de IRS-1 (-52%; $P=0,025$), PI3-K (-52%; $P=0,045$) (Figura 25), e PDK-1 (-49%; $P=0,017$) (Figura 26). A relação de pAKT pela AKT total foi reduzida significativamente (-63%; $P=0,028$) quando comparado com a descendência SC (Figura 26).

Figura 25 - Análise de *western blotting* representativo na expressão proteica na ilhota de camundongos C57Bl/6 macho aos três meses de idade



Legenda: A) IRS-1 (substrato do receptor de insulina 1), B) PI3-K (fosfatidilinositol-3-cinase), C) Blots representativos das proteínas. Os dados são apresentados como a média \pm DP, e as diferenças foram testadas com um teste-t não pareado ($P < 0,05$) e foram normalizados com a beta-actina, uma proteína constitutiva, sem alteração entre os grupos. A coluna branca representa o grupo SC (controle) e a coluna preta representa o grupo VitD⁻. N=5 por grupo. O símbolo † ilustra diferença estatística com o grupo SC.

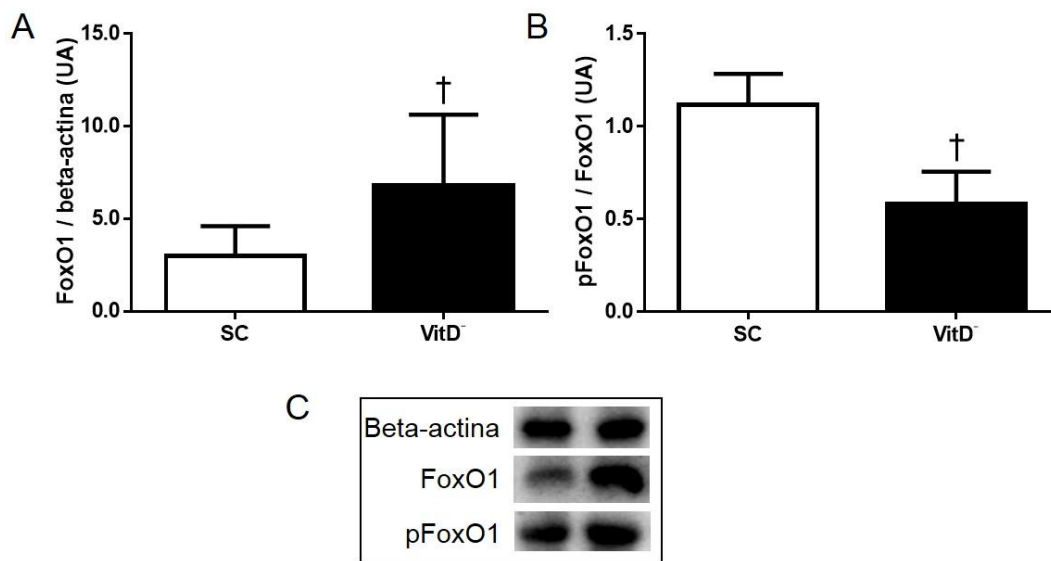
Figura 26 - Análise de *western blotting* representativo na expressão proteica na ilhota de camundongos C57Bl/6 macho aos três meses de idade



Legenda: A) PDK-1 (3-fosfoinositídeo proteína cinase dependente 1), B) Razão entre a pAKT (proteína cinase B fosforilada) e a AKT (proteína cinase B), C) Blots representativos das proteínas. Os dados são apresentados como a média \pm DP, e as diferenças foram testadas com um teste-t não pareado ($P < 0,05$) e foram normalizados com a beta-actina, uma proteína constitutiva, sem alteração entre os grupos. A coluna branca representa o grupo SC (controle) e a coluna preta representa o grupo VitD⁻. N=5 por grupo. O símbolo † ilustra diferença estatística com o grupo SC.

Os níveis de proteína FoxO1 aumentou significativamente (+129%, $P=0,045$) no grupo VitD⁻, enquanto a relação de pFoxO1 pela expressão de proteína FoxO1 total apresentou uma diminuição de 42% no VitD⁻ grupo em comparação com o grupo SC ($P=0,003$) (Figura 27).

Figura 27 - Análise de *western blotting* representativo na expressão proteica na ilhota de camundongos C57Bl/6 macho aos três meses de idade



Legenda: A) FoxO1 (fator de transcrição *forkhead 1*), B) Razão entre a pFoxO (fator de transcrição *forkhead 1* fosforilado) e a FoxO1, C) Blots representativos das proteínas. Os dados são apresentados como a média \pm DP, e as diferenças foram testadas com um teste-t não pareado ($P<0,05$) e foram normalizados com a beta-actina, uma proteína constitutiva, sem alteração entre os grupos. A coluna branca representa o grupo SC (controle) e a coluna preta representa o grupo VitD⁻. N=5 por grupo. O símbolo † ilustra diferença estatística com o grupo SC.

Além disso, todos os dados foram normalizados para a expressão da proteína beta-actina, tendo as suas expressões apresentadas superiormente às expressões das proteínas de estudo. Vale ressaltar que os valores de beta-actina não diferiram entre os grupos (dado não apresentado).

5 DISCUSSÃO

A literatura não é consensual no que tange a programação fetal pela deficiência materna de vitamina D. Os mecanismos exatos pelos quais a deficiência pode prejudicar o desenvolvimento fetal permanecem desconhecidos.

No presente estudo, demonstramos que a deficiência materna em vitamina D afeta a estrutura das ilhotas e leva a uma conseqüente redução na secreção de insulina, acompanhada de diminuição dos níveis da proteína PDX-1 nas células-beta na prole durante a vida adulta. Além disso, uma modificação significativa na expressão de proteínas da via de sinalização de insulina foi observada em ilhotas pancreáticas da prole VitD⁻, e estes resultados são originais e relevantes.

A fim de evitar o efeito da vitamina D sintetizados na pele submetida a exposição à radiação ultravioleta do tipo B, os camundongos foram acondicionados sob luz incandescente, sem radiação ultravioleta, enquanto foram alimentados com uma dieta isenta de vitamina D durante todo o experimento (Grupo M/VitD⁻). Além disso, a vitamina D é normalmente armazenada no fígado e no tecido adiposo, mas após seis semanas de restrição de vitamina D, os níveis de vitamina D são muito reduzidos, sem alterações no metabolismo de cálcio ou fósforo em roedores (Eyles *et al.*, 2003). No nosso estudo, a restrição durante sete semanas antes do acasalamento levou a uma deficiência de vitamina D, como esperada nas mães do grupo M/VitD⁻. O nível sérico de 25(OH)D foi o parâmetro afetado pela deficiência de vitamina D, que fora analisado, o que levou as alterações observadas na prole. Já foi relatado na literatura que ocorre uma redução significativa nas concentrações dos níveis séricos de 25(OH)D e 1,25(OH)₂D₃ ao nascimento na prole advindas de mães deficientes, e os níveis normais são restaurados nestes filhotes a partir da 3^a semana de idade (Zhang *et al.*, 2014).

Os dados são controversos em relação ao peso no nascimento e a deficiência materna de vitamina D. Embora seja comum o relato sobre a diminuição da massa corporal ao nascimento, também são relatados estudos apresentando aumento da MC, assim como nenhuma alteração ao nascimento (Weiler *et al.*, 2005; Reichetzeder *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014). Nossos resultados mostraram diferenças na MC ao nascimento e durante a lactação, e essa discrepância deve-se provavelmente ao modelo utilizado (C57Bl/6), tempo de administração da dieta materna e idade da prole no período estudado (3 meses).

Recentes estudos, em diferentes modelos, tem indicado que a Materna/VitD⁻ resulta em intolerância à glicose nos descendentes (Nascimento *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2014). Além disso, os níveis glicêmicos elevados podem ser um regulador negativo para a função das células-beta e promovem a apoptose destas, presumivelmente pela secreção de moléculas pró-apoptóticas (Leahy *et al.*, 1992; Maedler *et al.*, 2002). No nosso estudo, a prole VitD⁻ mostrou um aumento da ASC no TOTG, bem como um aumento do nível de glicose basal em comparação com o grupo controle. Além disso, a Materna/VitD⁻ levou à diminuição da insulina sérica e a hipotrofia das ilhotas. Nós sugerimos que a Materna/VitD⁻ pode levar à intolerância à glicose, hiperglicemia e hipoinsulinemia devido à baixa taxa de produção de novas células-beta na prole adulta, visto que sugerimos que proliferação celular provavelmente foi afetada durante a organogênese devido a programação fetal destes animais.

Além disso, as alterações nos níveis intracelulares de cálcio podem ter efeitos sobre a secreção de insulina, pois a 1,25(OH)₂D₃ é capaz de regular o fluxo de cálcio nas células-beta *in vitro* e em modelos de camundongos (Shi *et al.*, 2002). Assim, menor liberação de insulina devido a Materna/VitD⁻ pode ser crítico porque prejudica o metabolismo da glicose e do influxo de cálcio, que induz alterações na fosforilação de GLUT-2 por meio da GLK, sendo capaz de alterar a oxidação da glicose (Souza Dde *et al.*, 2012).

A falta de uma nutrição adequada, quantitativa, bem como alterações qualitativas, leva ao retardo no crescimento intrauterino (IURG) associado a redução de massa de células-beta (Valtat *et al.*, 2011). A deficiência materna de vitamina D leva a um remodelamento do pâncreas na prole adulta. No nosso estudo, a menor massa pancreática/MC acompanhada de hipotrofia da ilhota observada na prole VitD⁻ provavelmente representa uma resposta adaptativa, alterando a massa de células-beta, observadas nesses animais e resultando em uma secreção reduzida de insulina e o quadro de hiperglicemia. Os resultados sugerem uma falha na proliferação de células-beta, possivelmente devido a mudanças na expressão de PDX-1 e FoxO1.

A literatura não é conclusiva sobre os efeitos da programação fetal pela deficiência materna de vitamina D. Nossa hipótese é que essa deficiência pode agir diretamente sobre a organogênese do pâncreas através de modificações epigenéticas. O estado nutricional materno durante a gravidez tem sido considerado fundamental para o funcionamento adequado do metabolismo da prole (Lillycrop *et al.*, 2007). Genes essenciais envolvidos na sinalização e metabolismo da vitamina D, tais como o receptor da vitamina D e as enzimas 25-hidroxilase, 1 α -hidroxilase, e 24-hidroxilase podem ser regulada por metilação do DNA (Fetahu *et al.*, 2014), e/ou modificações das histonas (Karlic e Varga, 2011). Em nosso estudo, não

observamos diferenças significativas na expressão de VDR e CYP27B1 entre os grupos na idade adulta. Dessa forma, sugerimos que as alterações encontradas ocorreram a partir de outros fatores aos 3 meses de idade.

Como já dito anteriormente, a Materna/VitD⁻ pode afetar a expressão PDX-1 na prole, provavelmente por modificações epigenéticas. No presente estudo, a deficiência de 25(OH)D levou a uma diminuição significativa da expressão de PDX-1 na prole durante a vida adulta. Um estudo prévio demonstrou que um ambiente metabólico alterado diminui a transcrição de PDX-1 mediando uma cascata de modificações epigenéticas (via mudanças na metilação do DNA, modificações de histonas, ou proteína de ligação da cromatina), culminando no silenciamento de PDX-1 (Park *et al.*, 2008). Isto pode sugerir que a Materna/VitD⁻ pode programar embrião/feto por exibir uma redução na expressão de proteínas de PDX-1 na idade adulta, a partir da alteração do gene de PDX-1.

Nas ilhotas pancreáticas, o PDX-1 regula a expressão de GLUT-2, GLK e insulina (Hui e Perfetti, 2002). A expressão diminuída de GLUT-2 pode comprometer a sensibilidade da glicose resultando em hiperglicemia (Cheng *et al.*, 2013). A GLK é essencial para manter a glicemia pós-prandial normal, através da ativação de PI3-K mediada pela insulina. A alteração do gene da GLK no pâncreas leva a hipoinsulinemia e um retardo do crescimento no nascimento em camundongos (Terauchi *et al.*, 1999). Nossos resultados das expressões de GLUT-2, GLK e insulina mostraram uma diminuição nas ilhotas da prole VitD⁻. Sugerimos que esta redução pode ser devida a uma falha na regulação da PDX-1.

A literatura carece de informações sobre o impacto da deficiência materna de vitamina D sobre a secreção de insulina e a morfologia pancreática da prole adulta. Portanto, sugerimos que as alterações moleculares da cascata de sinalização da insulina possam ser responsáveis por tais alterações. E a redução da ativação dos componentes da cascata foi observada nas células-beta da prole adulta de mães que têm uma deficiência de vitamina D durante os períodos pré-gestacional, gestacional e lactacional.

A via de sinalização da insulina nas células-beta é mediada principalmente por IRS-1, PI3-K, PDK-1, e AKT (Zhang *et al.*, 2011). A literatura indica que os componentes da cascata desempenham um papel significativo na regulação do crescimento e função das células beta (Araki *et al.*, 1994; Tuttle *et al.*, 2001; Engelman *et al.*, 2006; Hashimoto *et al.*, 2006). Camundongos *knockout* para IRS-1 possuem um atraso de crescimento e uma tolerância à glicose diminuída, mas não têm hiperglicemia (Araki *et al.*, 1994). PI3-K é um componente chave sinalização da insulina e as respostas deste fator regulam o metabolismo e o crescimento de células (Engelman *et al.*, 2006). Camundongos *knockout* para PDK-1,

especificamente nas células-beta pancreáticas, desenvolvem hiperglicemia progressiva seguido de uma perda de massa das ilhotas (Hashimoto *et al.*, 2006). Os camundongos transgênicos que super-expressam a forma ativa de AKT1 sob o promotor de insulina possuem um aumento do número de células-beta e os níveis de insulina no plasma elevados, melhora a tolerância à glicose e resistência ao diabetes (Tuttle *et al.*, 2001). Em nosso estudo, a Materna/VitD⁻ leva a um prejuízo na cascata de sinalização da insulina com baixa expressão de moléculas fundamentais, como a expressão da proteína de IRS-1, PI3K, PDK-1, e AKT. Nós sugerimos que devido a uma redução na biodisponibilidade de insulina, sérica e/ ou proteica, possa ocorrer um prejuízo dos componentes da via de sinalização avaliados nesse estudo. O RI é capaz de fosforilar o IRS-1, ativando assim a PI3-K que recruta os fosfatidilinositol da membrana plasmática, culminando na ativação de PDK-1, que regula a fosforilação de AKT e subsequentemente FoxO1. Podemos supor que esteja ocorrendo uma falha na ligação da molécula de insulina ao seu receptor, com isto uma redução subsequente dos outros componentes.

Apesar da diferença entre os modelos já descritos (Li *et al.*, 2015a), o presente estudo também demonstrou que a Maternal/VitD⁻ afeta as expressões de FoxO1 e PDX-1, que suportam a hipótese de que FoxO1 é um regulador negativo da proliferação de células beta e neogênese. (Kitamura *et al.*, 2002). Estudo *in vivo* fornecem evidências de que a desregulação de FoxO1 no pâncreas, leva a diminuição da massa de células-beta e da secreção de insulina, conduzindo ao desenvolvimento do diabetes (Kitamura *et al.*, 2009). Os nossos achados demonstram que a expressão diminuída de PDX-1 nas células-beta da prole é consistente com a hipótese anterior que FoxO1 inibe a transcrição de PDX-1 (Kitamura *et al.*, 2002) e a sua expressão é importante para a manutenção da normoglicemia (Talchai *et al.*, 2012).

Os componentes da via de sinalização de insulina regulam negativamente a atividade de FoxO (Kitamura, 2007). A proteína FoxO1 pode ser fosforilada por meio da ativação de proteínas cinases, PI3-K e AKT. Quando fosforilado, FoxO1 torna-se inativo e transloca-se a partir do núcleo para o citoplasma (Kitamura e Ido Kitamura, 2007). Por outro lado, uma diminuição da fosforilação de FoxO1 permite que ele permaneça no núcleo (Biggs *et al.*, 1999), reprimindo assim a expressão PDX-1 (Johnson *et al.*, 2003) e prevenindo a hiperplasia (Okamoto *et al.*, 2004). Portanto, sugerimos que a alta expressão da forma ativa (não-fosforilada) da proteína FoxO1 pode reprimir a expressão PDX-1, por regulação negativa (*down-regulation*). Além disso, a diminuição da fosforilação de proteína FoxO1 em ilhotas pancreáticas na prole VitD⁻ pode exercer um efeito adverso sobre a proliferação de células-beta, de acordo com a hipotrofia da ilhota observada nestes animais. Com base nestes

resultados, sugerimos que o FoxO1 e FoxO1 fosforilado são mediados por uma redução da expressão de AKT e PDX-1.

Uma hipótese para justificar a alteração na via de sinalização de insulina causada pela deficiência materna de vitamina D pode ser pela alteração da expressão gênica e proteica de PDX-1 e FoxO1 durante a organogênese. Além disso, a expressão reduzida de insulina levou uma diminuição de sua cascata de sinalização.

CONCLUSÃO

Portanto, os resultados deste estudo fornecem fortes evidências de que a deficiência materna de vitamina D modifica o desenvolvimento regular do pâncreas da prole na vida adulta levando a um remodelamento estrutural da ilhota e a consequente alteração na via de sinalização de insulina. A diminuição da expressão proteica PDX-1 e o aumento da FoxO1, causada possivelmente pela programação fetal durante a organogênese é um ponto central em possíveis alterações na massa de células-beta e secreção de insulina na idade adulta.

REFERÊNCIAS

Accili D, Arden KC. FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. *Cell* 2004; 117: 421-426 .

Ahlgren U, Jonsson J, Edlund H. The morphogenesis of the pancreatic mesenchyme is uncoupled from that of the pancreatic epithelium in IPF1/PDX1-deficient mice. *Development* 1996; 122: 1409-1416.

Ahlgren U, Jonsson J, Jonsson L, Simu K, Edlund H. beta-cell-specific inactivation of the mouse *Ipfl/Pdx1* gene results in loss of the beta-cell phenotype and maturity onset diabetes. *Genes Dev* 1998; 12: 1763-1768 .

Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, van Etten E, Verstuyf A, Luderer HF et al. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocr Rev* 2008; 29: 726-776 (doi: 10.1210/er.2008-0004).

Burnol AF, Morzyglod L, Popineau L. [Cross-talk between insulin signaling and cell proliferation pathways]. *Ann Endocrinol (Paris)* 2013; 74: 74-78 (doi: 10.1016/j.ando.2013.02.003).

Crozier SR, Harvey NC, Inskip HM, Godfrey KM, Cooper C, Robinson SM et al. Maternal vitamin D status in pregnancy is associated with adiposity in the offspring: findings from the Southampton Women's Survey. *Am J Clin Nutr* 2012; 96: 57-63 (doi: 10.3945/ajcn.112.037473).

DeLuca HF. The vitamin D story: a collaborative effort of basic science and clinical medicine. *FASEB J* 1988; 2: 224-236 .

DeLuca HF, Zierold C. Mechanisms and functions of vitamin D. *Nutr Rev* 1998; 56: S4-10; discussion S 54-75 .

Fernandez-Twinn DS, Wayman A, Ekizoglou S, Martin MS, Hales CN, Ozanne SE. Maternal protein restriction leads to hyperinsulinemia and reduced insulin-signaling protein expression in 21-mo-old female rat offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 288: R368-373 (doi: 10.1152/ajpregu.00206.2004).

Fowden AL, Hill DJ. Intra-uterine programming of the endocrine pancreas. *Br Med Bull* 2001; 60: 123-142 .

Green AS, Rozance PJ, Limesand SW. Consequences of a compromised intrauterine environment on islet function. *J Endocrinol* 2010; 205: 211-224 (doi: 10.1677/JOE-09-0399).

Guz Y, Montminy MR, Stein R, Leonard J, Gamer LW, Wright CV et al. Expression of murine STF-1, a putative insulin gene transcription factor, in beta cells of pancreas, duodenal epithelium and pancreatic exocrine and endocrine progenitors during ontogeny. *Development* 1995; 121: 11-18 .

Hancer NJ, Qiu W, Cherella C, Li Y, Copps KD, White MF. Insulin and metabolic stress stimulate multisite serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 and inhibit tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 2014; 289: 12467-12484 (doi: 10.1074/jbc.M114.554162).

Hashimoto N, Kido Y, Uchida T, Asahara S, Shigeyama Y, Matsuda T et al. Ablation of PDK1 in pancreatic beta cells induces diabetes as a result of loss of beta cell mass. *Nat Genet* 2006; 38: 589-593 (doi: 10.1038/ng1774).

Haussler MR, Whitfield GK, Haussler CA, Hsieh JC, Thompson PD, Selznick SH et al. The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. *J Bone Miner Res* 1998; 13: 325-349 (doi: 10.1359/jbmr.1998.13.3.325).

Heaney RP. Functional indices of vitamin D status and ramifications of vitamin D deficiency. *Am J Clin Nutr* 2004; 80: 1706S-1709S .

Holick MF. McCollum Award Lecture, 1994: vitamin D--new horizons for the 21st century. *Am J Clin Nutr* 1994; 60: 619-630 .

Holick MF. High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health. *Mayo Clin Proc* 2006; 81: 353-373 (doi: 10.4065/81.3.353).

Johnson JA, Grande JP, Roche PC, Kumar R. Immunohistochemical localization of the 1,25(OH)2D3 receptor and calbindin D28k in human and rat pancreas. *Am J Physiol* 1994; 267: E356-360 .

Jonsson J, Carlsson L, Edlund T, Edlund H. Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* 1994; 371: 606-609 (doi: 10.1038/371606a0).

Kitamura T, Ido Kitamura Y. Role of FoxO Proteins in Pancreatic beta Cells. *Endocr J* 2007; 54: 507-515 .

Kitamura T, Nakae J, Kitamura Y, Kido Y, Biggs WH, 3rd, Wright CV et al. The forkhead transcription factor Foxo1 links insulin signaling to Pdx1 regulation of pancreatic beta cell growth. *J Clin Invest* 2002; 110: 1839-1847 (doi: 10.1172/JCI16857).

Kulkarni RN, Bruning JC, Winnay JN, Postic C, Magnuson MA, Kahn CR. Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic beta cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes. *Cell* 1999; 96: 329-339.

Martini LA, Wood RJ. Vitamin D status and the metabolic syndrome. *Nutr Rev* 2006; 64: 479-486 .

Nascimento FA, Ceciliano TC, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Maternal vitamin D deficiency delays glomerular maturity in F1 and F2 offspring. *PLoS One* 2012; 7: e41740 (doi: 10.1371/journal.pone.0041740).

Nascimento FA, Ceciliano TC, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Transgenerational effects on the liver and pancreas resulting from maternal vitamin D restriction in mice. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2013; 59: 367-374 .

Peng ZF, Chen MJ, Manikandan J, Melendez AJ, Shui G, Russo-Marie F et al. Multifaceted role of nitric oxide in an in vitro mouse neuronal injury model: transcriptomic profiling defines the temporal recruitment of death signalling cascades. *J Cell Mol Med* 2012; 16: 41-58 (doi: 10.1111/j.1582-4934.2011.01288.x).

Pilz S, Tomaschitz A, Marz W, Drechsler C, Ritz E, Zittermann A et al. Vitamin D, cardiovascular disease and mortality. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2011; 75: 575-584 (doi: 10.1111/j.1365-2265.2011.04147.x).

Pittas AG, Lau J, Hu FB, Dawson-Hughes B. The role of vitamin D and calcium in type 2 diabetes. A systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 2017-2029 (doi: 10.1210/jc.2007-0298).

Reichel H, Koeffler HP, Norman AW. The role of the vitamin D endocrine system in health and disease. *N Engl J Med* 1989; 320: 980-991 (doi: 10.1056/NEJM198904133201506)

Ueki K, Okada T, Hu J, Liew CW, Assmann A, Dahlgren GM et al. Total insulin and IGF-I resistance in pancreatic beta cells causes overt diabetes. *Nat Genet* 2006; 38: 583-588 (doi: 10.1038/ng1787)

Vaidya A, Forman JP. Vitamin D and hypertension: current evidence and future directions. *Hypertension* 2010; 56: 774-779 (doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.140160)

Waeber G, Thompson N, Nicod P, Bonny C. Transcriptional activation of the GLUT2 gene by the IPF-1/STF-1/IDX-1 homeobox factor. *Mol Endocrinol* 1996; 10: 1327-1334 (doi: 10.1210/mend.10.11.8923459)

Wagner CL, Taylor SN, Hollis BW. Does vitamin D make the world go 'round'? *Breastfeed Med* 2008; 3: 239-250 (doi: 10.1089/bfm.2008.9984)

Watada H, Kajimoto Y, Kaneto H, Matsuoka T, Fujitani Y, Miyazaki J et al. Involvement of the homeodomain-containing transcription factor PDX-1 in islet amyloid polypeptide gene transcription. *Biochem Biophys Res Commun* 1996a; 229: 746-751.

Watada H, Kajimoto Y, Umayahara Y, Matsuoka T, Kaneto H, Fujitani Y et al. The human glucokinase gene beta-cell-type promoter: an essential role of insulin promoter factor 1/PDX-1 in its activation in HIT-T15 cells. *Diabetes* 1996b; 45: 1478-1488 .

Zeit U, Weber K, Soegiarto DW, Wolf E, Balling R, Erben RG. Impaired insulin secretory capacity in mice lacking a functional vitamin D receptor. *FASEB J* 2003; 17: 509-511 (doi: 10.1096/fj.02-0424fje)

ANEXO A – Comitê de Ética



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCANTARA GOMES



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº CEUA/023/2013 sobre "**Efeitos da restrição materna de vitamina D, durante a organogênese sobre tecido adiposo, pâncreas, fígado e rim de camundongos C57BL/6 adultos**", sob a responsabilidade de **Carlos Alberto Mandarin-de-Lacerda**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório/Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (SBCAL/COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEA), em **12/06/2013**. Este certificado expira em **12/06/2017**.

Rio de Janeiro, 12 de Junho de 2013.

Patricia C. Lisboa

Israel Felzenszwalb

Prof. Dra. Patricia C. Lisboa
CEUA/IBRAG/UERJ

Prof. Dr. Israel Felzenszwalb
CEUA/IBRAG/UERJ

Prof.ª Dra. Patricia Cristina Lisboa da Silva
Prof.ª Adj. do Depto. Ciências Fisiológicas / IBRAG / UERJ

Matricula 34765-8 (21) 2587-6488 / 2587-6109 - Fax (21) 2284-9748
biologia@uerj.br



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Departamento de Anatomia
Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental

Certificado de Premiação

Certifico que o trabalho intitulado EFEITOS DA RESTRIÇÃO MATERNA DE VITAMINA D SOBRE AS ALTERAÇÕES METABÓLICAS E PANCREÁTICAS DE CAMUNDONGOS ADULTOS. de autoria CECILIANO, T.; BARBOSA-DA-SILVA, S.; MANDARIM-DE-LACERDA, CA. FARIA, T., conquistou o primeiro lugar na categoria de tema oral livre no II Encontro Discente do Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, realizado no Auditório do Pavilhão Mario Franco - UERJ, nos dias 17 e 18 de setembro de 2014.

Tamara Lima Sachet

Representante discente
Mestrado

Altauri

Coordenador do BHEx

Simanda Ovellas

Representante discente
Doutorado





Maternal vitamin D-restricted diet has consequences in the formation of pancreatic islet/insulin-signaling in the adult offspring of mice

Thais C. Maia-Ceciliano¹ · Andre R. C. Barreto-Vianna¹ · Sandra Barbosa-da-Silva¹ · Marcia B. Aguilã¹ · Tatiane S. Faria¹ · Carlos A. Mandarim-de-Lacerda¹

Received: 26 January 2016 / Accepted: 25 April 2016 / Published online: 3 May 2016
© Springer Science+Business Media New York 2016

Abstract The maternal deficiency of vitamin D can act on organogenesis in mice offspring, being a risk factor for chronic diseases in adulthood. This study investigates the effects of maternal deficiency of vitamin D on structural islet remodeling and insulin-signaling pathway in the offspring. We studied male C57Bl/6 offspring at 3-month old ($n = 10/\text{group}$) from mother fed one of the two diets: control diet (C) or vitamin D-restricted diet (VitD⁻). After weaning, offspring only fed the control diet ad libitum. In the offspring, we studied insulin production, islet remodeling, and islet protein expression of the insulin-signaling pathway (Western blotting, isolated islet, $n = 5/\text{group}$). VitD⁻ offspring showed greater glycemia ($P = 0.012$), smaller beta-cell mass ($P = 0.014$), and hypoinsulinemia ($P = 0.024$) than C offspring. Comparing VitD⁻ offspring with C offspring, we observed lower protein levels in islet of insulin ($P = 0.003$), insulin receptor substrate-1 ($P = 0.025$), phosphatidylinositol-3-kinases ($P = 0.045$), 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 ($P = 0.017$), protein kinase B ($P = 0.028$), with reduced expression of pancreas/duodenum homeobox-1 (PDX-1) ($P = 0.016$), glucose transporter-2 ($P = 0.003$), and glucokinase ($P = 0.045$). The maternal vitamin D-restricted diet modifies the development of the pancreas of the

offspring, leading to islet remodeling and altered insulin-signaling pathway. The decrease of PDX-1 is probably significant to the changes in the beta-cell mass and insulin secretion in adulthood.

Keywords FoxO1 · Insulin pathway · Pancreas · PDX-1 · Fetal programming

Abbreviations

1,25(OH) ₂ D ₃	1,25-Dihydroxyvitamin D ₃
25(OH)D	25-Hydroxyvitamin D
A[islet]	Mean cross-sectional area of the islet
AKT	Protein kinase B
AU	Arbitrary units
AUC	Area under the curve
BM	Body mass
C	Control diet
CYP27B1	1- α -Hydroxylase, cytochrome p450 27B1
FoxO1	Forkhead transcription factor 1
GLK	Glucokinase
GLUT	Glucose transporter
IRS-1	Insulin receptor substrate-1
M[islet]	Islet mass
OGTT	Oral glucose tolerance test
pAKT	Phosphorylated protein kinase B
PDK-1	3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1
pFoxO1	Phosphorylated forkhead transcription factor 1
PDX-1	Pancreas/duodenum homeobox-1
PI3-K	Phosphatidylinositol-3-kinases
Q _A [islet]	Numerical density per area of the islet
VDR	Vitamin D receptor
VitD ⁻	Vitamin D-restricted diet
Vv	Volume density

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s12020-016-0973-y) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Carlos A. Mandarim-de-Lacerda
mandarim@uerj.br;
http://www.lmmc.uerj.br

¹ Laboratório de Morfometria, Metabolismo e Doença Cardiovascular, Centro Biomedico, Instituto de Biologia, Universidade do Estado de Rio de Janeiro - UERJ, Av. 28 de Setembro, 87 fds, Rio de Janeiro, RJ 20551-030, Brazil

Introduction

Studies have proved that deficiency of vitamin D (measured as circulating 25-hydroxyvitamin D (25(OH)D) [1]) is a risk factor for chronic diseases such as hypertension [2] and metabolic syndrome [3]. The deficiency of vitamin D influences on glucose homeostasis and promotes a failure in the synthesis and secretion of insulin, in both animal models and humans [4, 5]. Furthermore, in vitro and rodent studies suggest an important role of vitamin D in beta-cell function and insulin resistance [6].

Literature is not conclusive concerning the pathways underlying fetal programming by a maternal deficiency of vitamin D. Although the mechanism has not yet been defined, deficiency or restriction in vitamin D can act directly on organogenesis of several organs in the offspring [7, 8]. Also, recent studies have shown that maternal deficiency of vitamin D can cause metabolic changes [7], chronic diseases in adulthood, such as hypertension [8] and increased adiposity [9]. In humans, supplementation of vitamin D decreased the incidence of gestational diabetes and its expected consequences [10]. Therefore, adequate nutrition during periods of prenatal and early postnatal is fundamental to the development of the endocrine pancreas.

The most important transcription factor for beta-cell growth and function is pancreas/duodenum homeobox-1 (PDX-1) [11]. In addition to being the major regulator of the insulin gene, PDX-1 also regulates the expression of glucose transporter-2 (GLUT-2) and glucokinase (GLK) [12]. Another factor, forkhead transcription factor-1 (FoxO1) plays a critical role in the process of apoptosis, cellular proliferation, differentiation, and glucose metabolism in regulating the transcription of various target genes [13]. Insulin-signaling pathway components negatively regulate the activity of FoxO1 [14].

Insulin receptor substrate family (IRS) is the main proteins involved in intracellular signaling pathways [15]. The 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK-1) is a serine–threonine kinase that mediates signaling downstream of phosphatidylinositol-3-kinases (PI3-K). The role of PDK-1 in the regulation of islet growth was demonstrated by specific deletion of PDK-1 in beta-cells in mice [16]. Moreover, the protein kinase B (AKT) is a major mediator of the insulin effect on glucose metabolism being stimulated by a variety of growth factors, including insulin itself [17].

The effect of deficiency of vitamin D during organogenesis and the possible metabolic programming on the mentioned proteins has not yet been studied. We hypothesized that low concentration of vitamin D during fetal development has the potential to perturb the metabolism and the structure of the pancreas, leading to a reduction in

protein expression of insulin-signaling pathway components that are essential to normal pancreatic development. The study aimed to investigate the effects of maternal vitamin D-restricted diet on pancreatic remodeling and insulin-signaling pathway of adult offspring, considering how important these questions and their impact on development and metabolism.

Materials and methods

Animals, housing conditions, ethical care, and diet

All animal studies were performed according to the guidelines of the animal ethics committee of the State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil. All procedures were carried out by conventional guidelines for experimentation with animals (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Institute for Laboratory Animal Research Division on Earth and Life Studies, The National Academies Press, Washington DC, 2010). The local committee approved experimental procedures (protocol number CEUA/23/2013).

Dams

Thirty female C57BL/6 mice were maintained under controlled conditions in ventilated cages (Nexgen system, Allentown Inc., PA, USA, 21 ± 2 °C, humidity 60 ± 10 %, 12:12-h dark–light cycle) with free access to food and water until they were 7-week old. To avoid the effect of vitamin D synthesized in the skin submitted to ultraviolet radiation exposure, we housed the dams under incandescent light, without ultraviolet radiation, while feeding them a vitamin D-free diet throughout the experiment.

The animals were randomly allocated to one of the two groups following their diets (diets are detailed in Table 1) ($n = 15$ /group):

- (a) The mother fed a control diet, based on the American Institute of Nutrition (AIN) recommendations for rodents (AIN93G) [18], including 1000 IU/kg of vitamin D3.
- (b) The mother fed a vitamin D-restricted diet, based on the AIN93G, without vitamin D.

Diets were produced by Prag Solucoes (Jau, Sao Paulo, Brazil) and administered ad libitum for 7 weeks. After that, some of the females ($n = 5$ /group) were sacrificed for blood collection, and subsequent confirmation of the low level of vitamin D, while the other females ($n = 10$ /group) were mated overnight with males of the same age that only

Table 1 Composition of the diets

Nutrient (g/kg)	Diets	
	C	VitD ⁻
Corn starch	397.50	397.50
Casein	200.00	200.00
Starch dextrinated	132.00	132.00
Sucrose	100.00	100.00
Soya bean oil	70.00	70.00
Fiber	50.00	50.00
L-cystine	3.00	3.00
Choline	2.50	2.50
Mineral mix	35.00	35.00
Calcium carbonate	357.00	357.00
Vitamin mix	10.00	10.00
Vitamin D3	0.25	0.00

All the nutrients corresponded to the recommendations of AIN93G for rodents

C mother fed a control diet, VitD⁻ mother fed a vitamin D-restricted diet

fed control diet for the formation of the experimental groups. Figure 1 shows the formation of the groups. The administration of both diets continued until the end of suckling.

Offspring

At birth, offspring sex was assessed based on the anogenital distance, and the litter size was adjusted to six animals per dam at day 0 (three males and three females, when possible). At 21 days of age, one male pup from each litter was randomly chosen to compose the groups. The offspring were labeled according to the diet fed to their mothers, forming two groups. After weaning (21 days of age), the animals were exclusively fed the control diet (based on the AIN93G recommendations, including 1000 IU/kg of vitamin D3), and separated according to their maternal origin ($n = 10$ /group):

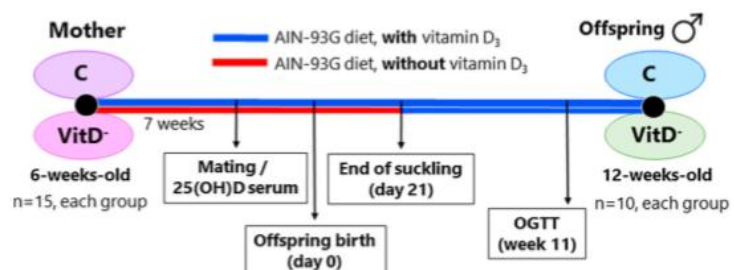
- C (male offspring fed a control diet, from mother fed a control diet);
- VitD⁻ (male offspring fed a control diet, from mother fed a vitamin D-restricted diet).

Oral glucose tolerance test An oral glucose tolerance test (OGTT) was performed in offspring 1 week before euthanasia. Animals fasted for 6 h received a 25 % glucose solution (1 g/kg) by orogastric gavage. Samples of blood were collected through an incision at the tail tip before glucose administration and 15, 30, 60, and 120 min after glucose administration (Accu-Check Performa, Roche Applied Science, Sao Paulo, Brazil). The differences in the OGTT curves of the groups were analyzed by calculation of the total “area under the curve” (AUC) of glucose (GraphPad Prism 6.05, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

Euthanasia The animals (fasted for 6 h) were deeply anesthetized (sodium pentobarbital 150 mg/kg). The serum was collected by centrifugation of blood ($120 \times g$ for 15 min) at room temperature and stored at -80°C . Afterward, the offspring were separated into two groups. In the first group, we performed islet isolation ($n = 5$ /group) and Western blotting. In the second group, the pancreas was removed ($n = 5$ /group), weighed, fixed (freshly prepared fixative for 48 h at room temperature), and embedded in Paraplast Plus (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA). The subcutaneous and intra-abdominal fat pads were carefully dissected and weighed, and the adiposity index was determined as the ratio between the sum of the intra-abdominal and subcutaneous fat pads divided by the total body mass [19].

The serum of the mothers was obtained to determine 25(OH)D, while the serum of the offspring was used to determine fasting insulin. Tests were made in duplicate using commercial ELISA kits (25-Hydroxyvitamin D EIA, AC-57F1, Immunodiagnostic Systems Limited, UK, and Rat/Mouse Insulin ELISA kit no. EZRMI-13 K, Millipore, Billerica, MA, USA).

Fig. 1 Formation of the groups. The mothers (M) were fed the control diet (control diet, C containing vitamin D) or a vitamin D-restricted diet (VitD⁻ without vitamin D). The offspring were fed the control diet but were separated according to their mother's nutrition



Pancreatic islets Islets were isolated (collagenase method, $n = 5/\text{group}$), as described elsewhere [20]. Briefly, the pancreas was cannulated and inflated with cold Hanks' solution (supplemented with fetal bovine serum 1 mg/mL) containing 0.8 mg/mL collagenase (C9263, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Then, the pancreas was removed and incubated in a 37 °C water bath for 15 min to allow the digestion of the exocrine tissue. Subsequently, the tubes were vigorously shaken for approximately 15 s. The collagenase digestion was terminated by the addition of cold Hanks' solution. The islets were manually collected under a stereomicroscope with a Pasteur pipette (Luxco 4D Stereozoom Microscope, Labomed, CA, USA) and immediately homogenized in extraction buffer (urea, 7 M; EDTA, 5 mM; Triton X-100, 1 %; protease and phosphatase inhibitors).

Islets immunohistochemistry and immunofluorescence In the other five animals of the group, the pancreas was serially sectioned at a nominal thickness of five micrometers. Most of the sections were stained with hematoxylin and eosin and served to stereology. One each ten sections were kept to perform immunohistochemistry or immunofluorescence. Sections were incubated with the anti-insulin antibody (1:100, A0564; Dakocytomation) and amplified with a biotin-streptavidin system (K0679; Universal Dakocytomation LSAB+ peroxidase kit). The reaction was visualized by incubating the section with 3,3'-diaminobenzidine-tetrachloride (K3466, DAB, Dakocytomation), and the sections were counterstained with Mayer hematoxylin. Digital images were obtained (Leica DMRBE microscope, Wetzlar, Germany, and Lumenera Infinity digital camera, Ottawa, ON, Canada).

For immunofluorescence, the antigen retrieval was performed with citrate buffer (pH 6.0), and Triton X-100 0.5 % was used to facilitate the localization of intracellular proteins. Blocking with glycine 2 % was then performed. Non-specific binding of the polyclonal antibodies was blocked by incubating with 5 % bovine serum albumin in phosphate-buffered saline. Posteriorly, primary antibodies were diluted 1:50 in blocking buffer (PBS/bovine serum assay [BSA] 1 %) and incubated overnight at 4 °C. Sections were incubated with anti-insulin (A0564; Dakocytomation) and anti-glucagon (A0565; Dakocytomation). The samples were incubated for 1 h at room temperature with fluorochrome-conjugated secondary antibodies: Donkey anti-rabbit immunoglobulin (Ig)G-Alexa 488 for glucagon and goat anti-guinea pig IgG-Alexa 546 for insulin (Invitrogen, Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA), both diluted at 1:50 in PBS/BSA 1 %. Slides were mounted with Slow Fade (Invitrogen, Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA) to maintain fluorescence. Double indirect immunofluorescence images were analyzed using a laser

scanning confocal microscope (C2, Nikon Inc., Tokyo, Japan).

Stereology of the islets We estimated the volume density of the islet in the pancreas ($V_v[\text{islet, pancreas}]$) by point-counting as the ratio between the number of points that hit the islets (P_p) and the total number of points of the test system (P_T) made with the Stepanizer software [21]. The "volume density of the islet" ($V_v[\text{islet, pancreas}]$) is a key and unbiased estimation that represents how much of a specific structure (islet) occupies the whole structure (pancreas). The average sectional area of the islets ($A[\text{islet}]$) was estimated as a ratio between $V_v[\text{islet, pancreas}]$ and twice the numerical density of the islets per area of the pancreas ($Q_A[\text{islet, pancreas}]$), i.e., $A[\text{islet}] = V_v[\text{islet, pancreas}]/2 \cdot Q_A[\text{islet, pancreas}]$ [22].

We estimated the islet mass ($M[\text{islet}]$) as the product of $V_v[\text{islet, pancreas}]$ and pancreas mass (measured previously). Also, we estimated the volume densities of both alpha-cell ($V_v[\text{alpha-cell, islet}]$) and beta-cell ($V_v[\text{beta-cell, islet}]$) with image analysis (Image Pro Plus software v. 7.01 for Windows, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) as indicated elsewhere [23]. Briefly, the density threshold selection tool was applied to islets with glucagon-positive areas and insulin-positive areas, after immunohistochemistry. $V_v[\text{alpha-cell, islet}]$ and $V_v[\text{beta-cell, islet}]$ were expressed as a percentage of the islet. Alpha-cell mass ($M[\text{alpha-cell}]$) and beta-cell mass ($M[\text{beta-cell}]$) were then estimated as the product of $[V_v[\text{alpha-cell, islet}]$ or $V_v[\text{beta-cell, islet}]$, respectively, and $M[\text{islet}]$ [24].

Western blotting After islet isolation, we extracted proteins in homogenizing buffer with protease inhibitors. The homogenates were centrifuged at 11,000 RPM for 10 min at 4 °C, and the supernatants were collected. The lysate protein concentration was determined using a BCA protein assay kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA); 30 μg of total protein was resuspended in sample buffer containing SDS, heated for 5 min at 100 °C, and separated by SDS/PAGE. After electrophoresis, the proteins were electroblotted onto PVDF transfer membranes (Hybond-P; Amersham Biosciences). Each membrane was blocked by incubation with bovine serum albumin together specific antibodies (Table S1): VDR, CYP27B1, PDX-1, GLUT-2, GLK, Insulin, IRS-1, PI3-K, PDK-1, AKT, pAKT, FoxO1, pFoxO1. The membranes were washed and incubated with anti-guinea pig (1:5000), anti-goat (1:5000), and anti-rabbit (1:5000) secondary antibodies. Protein expression was detected using an ECL detection system (Amersham Bioscience), and the images of the blot were obtained with Bio-Rad's Molecular Imaging ChemiDoc XRS Systems (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The intensity of the

chemiluminescent bands was quantified using ImageJ software, version 1.44 (NIH, image. NIH.Gov/ij, USA). The blots were stripped and reprobed for beta-actin (anti-mouse, sc-81178; Santa Cruz, Biotechnology; 1:1000) as a loading control to normalize the blot data.

Statistical analysis

We tested data for normal distribution and presented the results as the mean and standard deviation. Thus, we analyzed the differences between the groups with the unpaired *t* test, considering the *P* value <0.05 statistically significant (GraphPad Prism 6.05, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

Table 2 Maternal and offspring data

Mothers	C	VitD ⁻
BM before diet (g)	18.13 ± 0.73	18.11 ± 1.21
BM before mating (g)	20.99 ± 0.91	21.27 ± 1.02
Basal glucose (mmol/L)	6.56 ± 1.21	6.40 ± 0.74
25 (OH) D (ng/L)	15.07 ± 4.83	2.80 ± 1.53 [†]
Offspring		
Food intake (g/day)	2.53 ± 0.51	2.51 ± 0.49
Birth BM (g)	1.38 ± 0.16	1.52 ± 0.13 [†]
Final BM (g)	24.21 ± 1.34	24.26 ± 1.07
Adiposity index (%)	2.52 ± 0.56	2.19 ± 0.99
Basal glucose (mmol/L)	4.25 ± 0.62	5.19 ± 0.58 [†]
Serum insulin (pmol/L)	658.00 ± 127.5	416.00 ± 147.9 [†]

Values are mean ± S.D., *n* = 5/group. Symbol represents a significant difference (*P* < 0.05) compared to the control group, as determined by a Student *t* test

BM body mass, C mother fed a control diet, VitD⁻ mother fed a Vitamin D-restricted diet, 25 (OH) D 25-hydroxyvitamin D

Results

Dams

Body mass (BM) before and after the diet and fasting glucose of the progenitors was not statistically different between groups. However, the serum level of 25(OH)D was significantly reduced in the mothers fed a vitamin D-restricted diet than in the mothers fed a control diet (-81 %; *P* = 0.019) (Table 2).

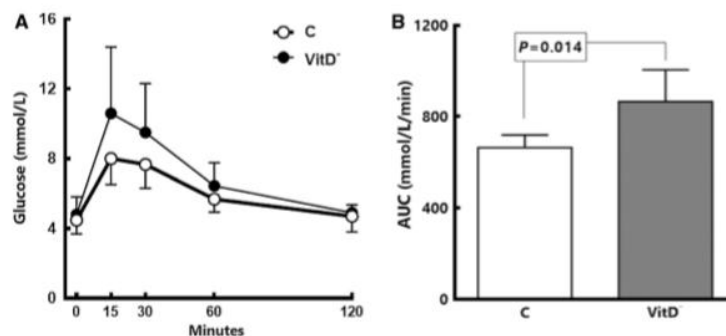
Offspring

Although the BM has been slightly greater in the VitD⁻ offspring at birth than in the C offspring, both groups ended the three months of life with no difference in their BM, without an increase in food intake. The adiposity index showed no difference in the C (2.52 ± 0.56) and VitD⁻ (2.19 ± 0.99) groups of 3 months of age (Table 2).

At 3 months of age, the VitD⁻ offspring showed significant high-fasting glucose and low-fasting serum insulin than the C offspring (Table 2). Also, the OGTT had a greater area in the VitD⁻ offspring than the C offspring (Fig. 2).

The VitD⁻ offspring had a smaller pancreas (101.80 ± 12.60 mg) than the C offspring (133.60 ± 16.10 mg) (-24 %; *P* = 0.008), even after adjusting for BM, (-21 %; *P* = 0.004). In addition, the VitD⁻ offspring showed a smaller mean cross-sectional area of the islet (280.10 ± 63.40 μm²) than the C offspring (553.20 ± 148.10 μm²) (-49 %; *P* = 0.043), although the islet architecture of glucagon (alpha-cells) and insulin (beta-cells), i.e., cell topography, remained preserved in both offspring (Fig. 3). Along with this, the VitD⁻ offspring had diminished beta-cell mass (6.23 ± 1.26 mg) in comparison

Fig. 2 Oral glucose tolerance test (3-month-old offspring, the groups are control, C, and vitamin D-restricted diet, VitD⁻). **a** The curves of blood glucose after an oral glucose overload; **b** The area under the curve (AUC) comparing the groups of offspring. Data are mean ± SD, *n* = 5/group. Differences were tested with unpaired *t* test



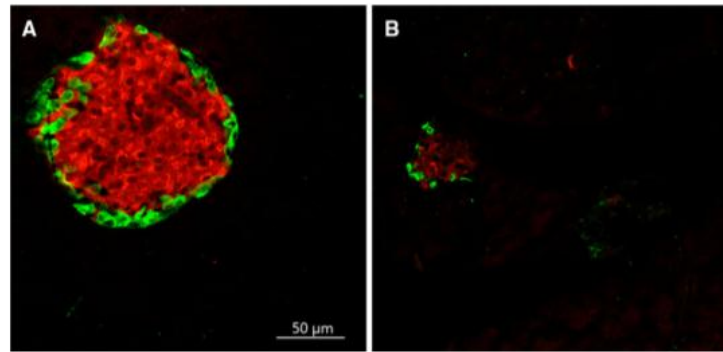


Fig. 3 Islets in 3-month-old offspring observed by confocal laser scanning microscopy (3-month-old offspring, the groups are control, C, and vitamin D-restricted diet, VitD^- , $n = 5/\text{group}$): **a** C group; **b** VitD^- group showing a small islet. Double-staining

immunofluorescence for glucagon, *green*, and insulin, *red*. Alpha-cells express glucagon primarily in the islet periphery, while beta-cells express insulin in the central zone of the islet

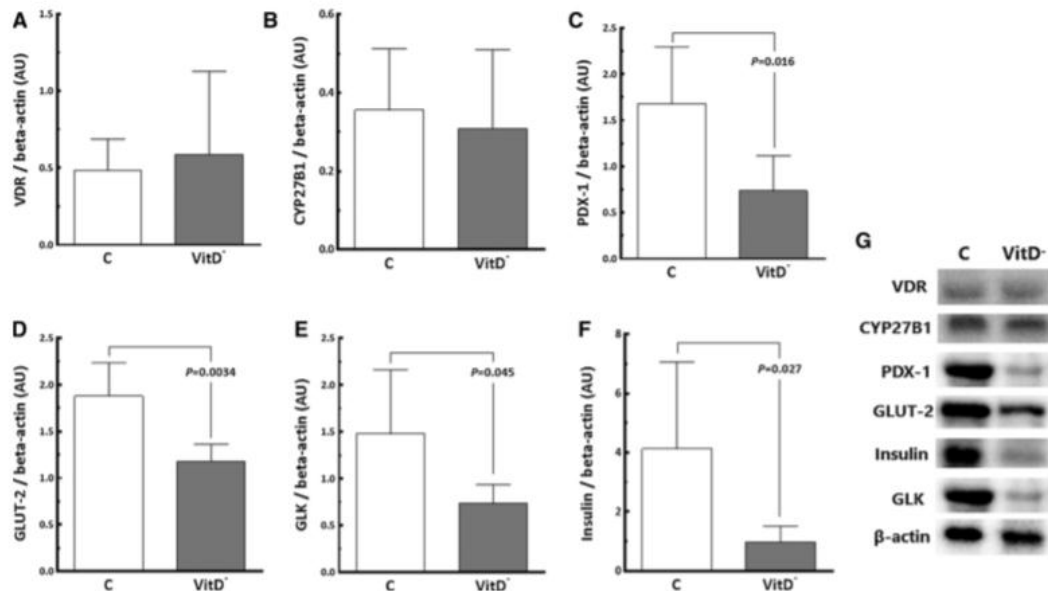


Fig. 4 Islet protein expressions (3-month-old offspring, Western blots, the groups are control, C, and vitamin D-restricted diet, VitD^-): **a** VDR (vitamin D receptor); **b** CYP27B1 (1- α -hydroxylase); **c** PDX-1 (pancreas/duodenum homeobox 1); **d** GLUT-2 (glucose transporter 2); **e** GLK (glucokinase); **f** insulin; **g** representative blot of proteins.

Average values were measured (expressed as arbitrary units, AU), and equal protein loading was confirmed by probing blots with the beta-actin antibody. Data are mean \pm SD, $n = 5/\text{group}$. Differences were tested with unpaired *t* test

to the C offspring ($17.17 \pm 4.39 \text{ mg}$) (-64% ; $P = 0.014$).

The maternal vitamin D-restricted diet modifies the expressions of PDX-1, GLUT-2, GLK and insulin in the offspring islets (Fig. 4). As illustrated, the VitD^- offspring

showed lower expression of PDX-1 (-56% ; $P = 0.016$), GLUT-2 (-37% ; $P = 0.003$), GLK (-50% ; $P = 0.045$), and insulin (-76% ; $P = 0.003$) than the C offspring. We did not detect a significant difference in the expressions of VDR (C = $0.48 \pm 0.20 \text{ AU}$; VitD^- = $0.59 \pm 0.54 \text{ AU}$;

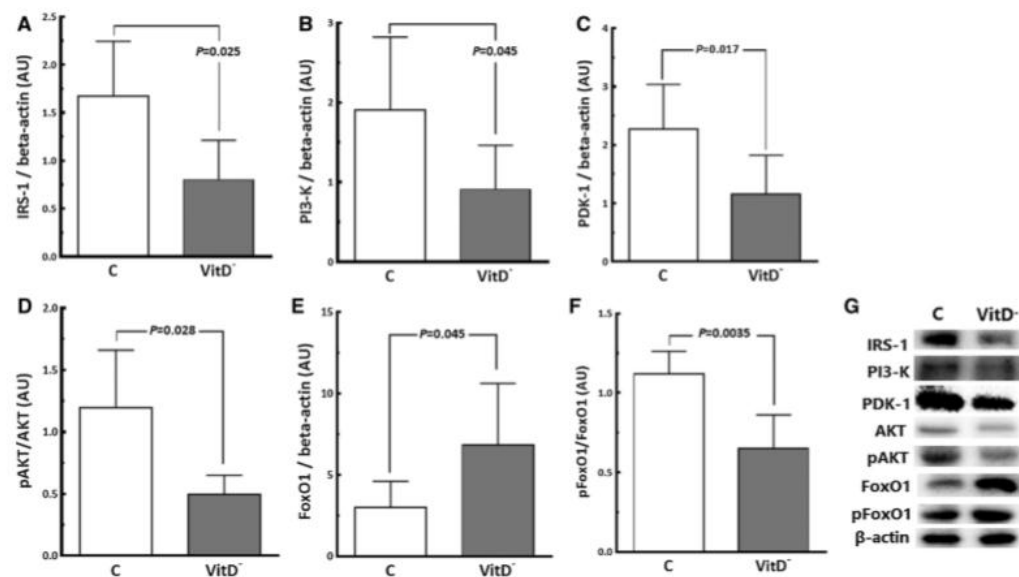


Fig. 5 Protein expressions in the pancreatic islet (3-month-old offspring, Western blotting, groups are control, C, and vitamin D-restricted diet, VitD⁻): **a** IRS-1 (Insulin receptor substrate 1); **b** PI3-K (phosphatidylinositol-3-kinases); **c** PDK-1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase); **d** pAKT (phosphorylated serine protein kinase) ratio corrected by its total AKT, with equal protein loading; **e** FoxO1 (forkhead transcription factor 1); **f** pFoxO1

(phosphorylated forkhead-O1) ratio corrected by its total FoxO1, with equal protein loading; **g** representative blot of proteins. Average values were measured (expressed as arbitrary units, AU), and equal protein loading was confirmed by probing blots with the beta-actin antibody. Data are mean \pm SD, $n = 5$ /group. Differences were tested with unpaired *t* test

$P = 0.695$) and CYP27B1 (the enzyme 1- α -hydroxylase) (C = 0.36 ± 0.16 AU; VitD⁻ = 0.60 ± 0.66 AU; $P = 0.455$) (Fig. 4).

We analyzed the protein expressions in the insulin-signaling pathway (Fig. 5). Comparing the VitD⁻ offspring with the C offspring, we observed a significant reduction in the relative quantity of IRS-1 (-52% ; $P = 0.025$), PI3-K (-52% ; $P = 0.045$), PDK-1 (-49% ; $P = 0.017$), and the ratio of the phosphorylated serine protein kinase (pAKT) and total AKT (-63% ; $P = 0.028$). In the VitD⁻ offspring compared to the C offspring, the FoxO1 protein level increased significantly ($+129\%$; $P = 0.045$), while the ratio of phosphorylated forkhead-O1 (pFoxO1)/FoxO1, and total FoxO1 protein expression diminished (-42% ; $P = 0.003$).

Discussion

We demonstrated that the maternal vitamin D-restricted diet impaired the islet structure and reduced insulin secretion in adult offspring, accompanied by decreasing levels of PDX-1 protein expression in beta-cell. Also, we observed a

significant modification of the protein expression of the insulin-signaling pathway in the islets of the VitD⁻ offspring, and these findings are original and relevant.

Vitamin D is usually stored in the liver and adipose tissue, but after 6 weeks of vitamin D restriction, the levels are greatly reduced without calcium or phosphorus changes in rodents [25]. In our study, 7 weeks of vitamin D restriction before mating led to an expected deficiency in vitamin D in the mothers and their 25(OH)D level was affected by the vitamin D-restricted diet. As a consequence, we believed that the observed effects in the offspring should be due to the vitamin D-restricted diet in the mothers.

Data are controversial regarding the birth weight and maternal vitamin D. There are reports of increase, decrease, or even non-interference in the BM of the offspring of mothers fed a vitamin D-restricted diet [26, 27]. However, data suggest that maternal vitamin D-restricted diet affects offspring adiposity [28, 29]. In the current study, the maternal vitamin D-restricted diet did not affect the adiposity index of the offspring, probably since the restoration of the 25(OH)D concentration after three months feeding on the control diet.

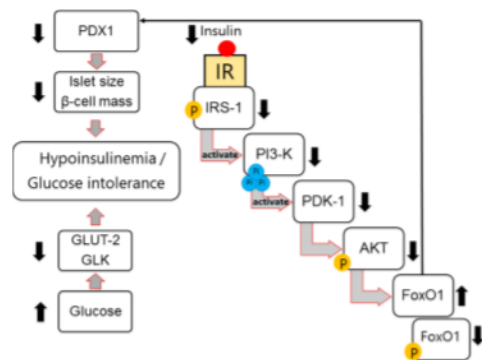


Fig. 6 A graphic abstract summarizes the molecular mechanisms involved in the insulin-signaling pathway in the pancreatic islet of the offspring. The change in the PDX-1 is associated with the alteration in the insulin-signaling pathway and may explain the occurrence of the diminished beta-cell mass/hypoinsulinemia/glucose intolerance observed in the offspring. *FoxO1* forkhead transcription factor 1, *GLK* glucokinase, *GLUT-2* glucose transporter 2, *IR* insulin receptor, *IRS-1* insulin receptor substrate 1, *pAKT* phosphorylated serine protein kinase, *PDK-1* 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1, *PDX-1* pancreas/duodenum homeobox 1, *pFoxO1* phosphorylated forkhead-O1, *PI3-K* phosphatidylinositol-3-kinases

Our findings demonstrated that maternal vitamin D-restricted diet may lead to impaired glucose tolerance, hyperglycemia, and hypoinsulinemia in the adult offspring. The basal glucose level was higher in the VitD^- offspring than in the control offspring. Besides, the VitD^- offspring showed decreasing serum insulin associated with islet hypotrophy. Previous studies have reported that maternal vitamin D-restricted diet resulted in impaired glucose tolerance in the offspring [7, 26]. The localization of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in the beta-cell nuclei, which allows the speculation that vitamin D might be involved in the glucose regulation of insulin secretion [30, 31]. Also, chronically high levels of blood glucose may be negative to beta-cell function and promote beta-cell apoptosis [32, 33].

In vitro [34] and rodent [35] studies indicate a role of vitamin D in beta-cell function and insulin resistance. Thus, a minor release of insulin in the offspring of mothers fed a vitamin D-restricted diet may be critical impairing the glucose metabolism and calcium influx, inducing changes in phosphorylation of GLUT-2 through GLK, which is capable of altering the glucose oxidation [36]. Our results suggest a link between the small pancreas with islet hypotrophy observed in the VitD^- offspring and an adaptive response altering the beta-cell mass, resulting in a diminished insulin secretion and hyperglycemia, and a failure in beta-cell proliferation, possibly due to changes in PDX-1 and FoxO1 expressions.

Literature is not conclusive regarding the pathways underlying fetal programming by a maternal vitamin D-restricted diet. Although we did not evaluate early periods of development, a recent survey showed a significant reduction in serum $25(\text{OH})\text{D}$ concentration in 0-day-old offspring, restored to normal levels by 3 weeks of age [26]. This finding agrees with our previous findings at 3-month-old. We did not observe significant differences in the expression of VDR and CYP27B1 between the groups, probably for the normalization of serum vitamin D in VitD^- animals.

An altered metabolic milieu decreases PDX-1 transcription by mediating a cascade of epigenetic modifications, culminating in silencing of PDX-1 [37] and we determined the maternal vitamin D-restricted diet decrease PDX-1 expression in the adult offspring. In the islets, PDX-1 regulates the expression of GLUT-2, GLK, and insulin [38], and a diminished expression of GLUT-2 may impair glucose sensitivity resulting in hyperglycemia [39]. The GLK is essential to maintain normal postprandial glucose that is mediated by insulin through the activation of PI3-K. Disruption of the pancreatic GLK gene leads to hypoinsulinemia and a growth retardation at birth in mice [40]. We observed a decrease of GLUT-2, GLK, and insulin expressions in the islets of the VitD^- offspring.

Our study indicated that the maternal vitamin D-restricted diet impairs the insulin-signaling cascade diminishing the expression of key molecules, as protein expression of IRS-1, PI3-K, PDK-1, and AKT. IRS-1, PI3-K, PDK-1, and AKT are essential mediators of the insulin-signaling pathway in beta-cells [41]. Literature reinforces that the cascade components play a role in the regulation of the beta-cell growth and function [16, 42, 43]. The insulin-signaling pathway components negatively regulate the activity of FoxO1. FoxO1 protein can be phosphorylated through the activation of protein kinases, PI3-K, and AKT. When phosphorylated, FoxO1 becomes inactive and translocate from the nucleus to the cytoplasm [14]. Conversely, a decrease in phosphorylation of FoxO1 allows it to remain in the core [44], thereby repressing the PDX-1 expression [45] and preventing beta-cell hyperplasia [46]. The study in vivo showed that the dysregulation of FoxO1 in pancreas led to a decreased beta-cell mass and reduced insulin secretion, and then the development of diabetes [47].

We schematize in Fig. 6 the molecular mechanisms involved in the insulin-signaling pathway in the islet of the adult VitD^- offspring. The maternal vitamin D-restricted diet led to hypoinsulinemia and glucose intolerance in the offspring that may be attributed to two reasons: (a) a reduction in the PDX-1, resulting in smaller islets and reduced beta-cell mass, and (b) hyperglycemia concomitant

with the reduction of features of glucose metabolism, GLUT-2, and GLK.

In conclusion, the current findings provide evidence that a maternal vitamin D-restricted diet has an influence on pancreas development in the offspring, leading to a structural remodeling of the islet and a consequent alteration in the insulin-signaling pathway. The central point of the alteration in the islet is the decrease of PDX-1 caused by the maternal vitamin D-restricted diet leading to a beta-cell mass reduction associated to a hypoinsulinemia in the adult offspring. The confirmation of these data in future studies is imperative. A recommendation should be particular attention to prenatal care, including the study of vitamin D in mothers.

Acknowledgments We thank Thatiany Marinho, Aline Penna, Gezielia Lau, and Michele Soares for the technical assistance.

Funding This work was supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico of Brazil) and FAPERJ (Fundacao de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro of Brazil).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest None of the authors report any conflict of interest.

References

1. S. Mohammadian, N. Fatahi, H. Zaeri et al., Effect of vitamin D3 supplement in glycemic control of pediatrics with type 1 diabetes mellitus and vitamin D deficiency. *J. Clin. Diagn. Res.* **9**, SC05–SC07 (2015)
2. F. Sundersingh, L.A. Plum, H.F. DeLuca, Vitamin D deficiency independent of hypocalcemia elevates blood pressure in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **461**, 589–591 (2015)
3. J.W. Bea, P.W. Jurutka, E.A. Hibler et al., Concentrations of the vitamin D metabolite 1,25(OH)2D and odds of metabolic syndrome and its components. *Metabolism* **64**, 447–459 (2015)
4. A.W. Norman, J.B. Frankel, A.M. Heldt et al., Vitamin D deficiency inhibits pancreatic secretion of insulin. *Science* **209**, 823–825 (1980)
5. P. Autier, Vitamin D status as a synthetic biomarker of health status. *Endocrine* **51**, 201–202 (2016)
6. A.G. Pittas, S.S. Harris, P.C. Stark et al., The effects of calcium and vitamin D supplementation on blood glucose and markers of inflammation in nondiabetic adults. *Diabetes Care* **30**, 980–986 (2007)
7. F.A. Nascimento, T.C. Ceciliano, M.B. Aguilá et al., Transgenerational effects on the liver and pancreas resulting from maternal vitamin D restriction in mice. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* **59**, 367–374 (2013)
8. F.A. Nascimento, T.C. Ceciliano, M.B. Aguilá et al., Maternal vitamin D deficiency delays glomerular maturity in F1 and F2 offspring. *PLoS One* **7**, e41740 (2012)
9. S.R. Crozier, N.C. Harvey, H.M. Inskip et al., Maternal vitamin D status in pregnancy is associated with adiposity in the offspring: findings from the Southampton Women's Survey. *Am. J. Clin. Nutr.* **96**, 57–63 (2012)
10. M. Mojibian, S. Soheilykhah, M.A. Fallah Zadeh et al., The effects of vitamin D supplementation on maternal and neonatal outcome: a randomized clinical trial. *Iran. J. Reprod. Med.* **13**, 687–696 (2015)
11. J. Jonsson, L. Carlsson, T. Edlund et al., Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* **371**, 606–609 (1994)
12. A.M. Abuzgaia, D.B. Hardy, E. Arany, Regulation of postnatal pancreatic Pdx1 and downstream target genes after gestational exposure to protein restriction in rats. *Reproduction* **149**, 293–303 (2015)
13. D. Accili, K.C. Arden, FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. *Cell* **117**, 421–426 (2004)
14. T. Kitamura, Y. Ido Kitamura, Role of FoxO proteins in pancreatic beta Cells. *Endocr. J.* **54**, 507–515 (2007)
15. A.F. Burnol, L. Morzyglod, L. Popineau, Cross-talk between insulin signaling and cell proliferation pathways. *Ann. Endocrinol. (Paris)* **74**, 74–78 (2013)
16. N. Hashimoto, Y. Kido, T. Uchida et al., Ablation of PDK1 in pancreatic beta cells induces diabetes as a result of loss of beta cell mass. *Nat. Genet.* **38**, 589–593 (2006)
17. J. Avruch, Insulin signal transduction through protein kinase cascades. *Mol. Cell. Biochem.* **182**, 31–48 (1998)
18. P.G. Reeves, F.H. Nielsen, G.C. Fahey Jr, AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.* **123**, 1939–1951 (1993)
19. S. Barbosa-da-Silva, J.C. Fraulob-Aquino, J.R. Lopes et al., Weight cycling enhances adipose tissue inflammatory responses in male mice. *PLoS One* **7**, e39837 (2012)
20. E.D. Frantz, C. Crespo-Mascarenhas, A.R. Barreto-Vianna et al., Renin-angiotensin system blockers protect pancreatic islets against diet-induced obesity and insulin resistance in mice. *PLoS One* **8**, e67192 (2013)
21. S.A. Tschanz, P.H. Burri, E.R. Weibel, A simple tool for stereological assessment of digital images: the STEPanizer. *J. Microsc.* **243**, 47–59 (2011)
22. C.A. Mandarin-de-Lacerda, Stereological tools in biomedical research. *An. Acad. Brasil. Cienc.* **75**, 469–486 (2003)
23. C.A. Mandarin-de-Lacerda, C.F. Santos, M.B. Aguilá, Image analysis and quantitative morphology. *Methods Mol. Biol.* **611**, 211–225 (2010)
24. E.D. Frantz, M.B. Aguilá, A.R. Pinheiro-Mulder et al., Transgenerational endocrine pancreatic adaptation in mice from maternal protein restriction in utero. *Mech. Ageing Dev.* **132**, 110–116 (2011)
25. D. Eyles, J. Brown, A. Mackay-Sim et al., Vitamin D3 and brain development. *Neuroscience* **118**, 641–653 (2003)
26. H. Zhang, X. Chu, Y. Huang et al., Maternal vitamin D deficiency during pregnancy results in insulin resistance in rat offspring, which is associated with inflammation and Ikappabalpha methylation. *Diabetologia* **57**, 2165–2172 (2014)
27. C. Reichetzeder, H. Chen, M. Foller et al., Maternal vitamin D deficiency and fetal programming—lessons learned from humans and mice. *Kidney Blood Press. Res.* **39**, 315–329 (2014)
28. J. Bispham, D.S. Gardner, M.G. Gnanalingham et al., Maternal nutritional programming of fetal adipose tissue development: differential effects on messenger ribonucleic acid abundance for uncoupling proteins and peroxisome proliferator-activated and prolactin receptors. *Endocrinology* **146**, 3943–3949 (2005)
29. J.A. Pasco, J.D. Wark, J.B. Carlin et al., Maternal vitamin D in pregnancy may influence not only offspring bone mass but other

- aspects of musculoskeletal health and adiposity. *Med. Hypotheses* **71**, 266–269 (2008)
30. S.A. Clark, W.E. Stumpf, M. Sar, Effect of 1,25 dihydroxyvitamin D3 on insulin secretion. *Diabetes* **30**, 382–386 (1981)
 31. A. Vaidya, J.S. Williams, Vitamin D and insulin sensitivity: can gene association and pharmacogenetic studies of the vitamin D receptor provide clarity? *Metabolism* **61**, 759–761 (2012)
 32. J.L. Leahy, S. Bonner-Weir, G.C. Weir, Beta-cell dysfunction induced by chronic hyperglycemia. Current ideas on mechanism of impaired glucose-induced insulin secretion. *Diabetes Care* **15**, 442–455 (1992)
 33. K. Maedler, A. Fontana, F. Ris et al., FLIP switches Fas-mediated glucose signaling in human pancreatic beta cells from apoptosis to cell replication. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **99**, 8236–8241 (2002)
 34. H. Wolden-Kirk, L. Overbergh, C. Gysemans et al., Unraveling the effects of 1,25OH₂D₃ on global gene expression in pancreatic islets. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **136**, 68–79 (2013)
 35. C.C. Borges, A.F. Salles, I. Bringhenti et al., Adverse effects of vitamin D deficiency on the Pi3k/Akt pathway and pancreatic islet morphology in diet-induced obese mice. *Mol. Nutr. Food Res.* **60**, 346–357 (2016)
 36. F. Souza Dde, L.M. Ignacio-Souza, S.R. Reis et al., A low-protein diet during pregnancy alters glucose metabolism and insulin secretion. *Cell Biochem. Funct.* **30**, 114–121 (2012)
 37. J.H. Park, D.A. Stoffers, R.D. Nicholls et al., Development of type 2 diabetes following intrauterine growth retardation in rats is associated with progressive epigenetic silencing of Pdx1. *J. Clin. Invest.* **118**, 2316–2324 (2008)
 38. H. Hui, R. Perfetti, Pancreas duodenum homeobox-1 regulates pancreas development during embryogenesis and islet cell function in adulthood. *Eur. J. Endocrinol.* **146**, 129–141 (2002)
 39. Q. Cheng, B.J. Boucher, P.S. Leung, Modulation of hypovitaminosis D-induced islet dysfunction and insulin resistance through direct suppression of the pancreatic islet renin-angiotensin system in mice. *Diabetologia* **56**, 553–562 (2013)
 40. Y. Terauchi, Y. Tsuji, S. Satoh et al., Increased insulin sensitivity and hypoglycaemia in mice lacking the p85 alpha subunit of phosphoinositide 3-kinase. *Nat. Genet.* **21**, 230–235 (1999)
 41. X. Zhang, N. Tang, T.J. Hadden et al., Akt, FoxO and regulation of apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* **1813**, 1978–1986 (2011)
 42. J.A. Engelman, J. Luo, L.C. Cantley, The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat. Rev. Genet.* **7**, 606–619 (2006)
 43. R.L. Tuttle, N.S. Gill, W. Pugh et al., Regulation of pancreatic beta-cell growth and survival by the serine/threonine protein kinase Akt1/PKBalpha. *Nat. Med.* **7**, 1133–1137 (2001)
 44. W.H. Biggs 3rd, J. Meisenhelder, T. Hunter et al., Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **96**, 7421–7426 (1999)
 45. J.D. Johnson, N.T. Ahmed, D.S. Luciani et al., Increased islet apoptosis in Pdx1± mice. *J. Clin. Invest.* **111**, 1147–1160 (2003)
 46. H. Okamoto, J. Nakae, T. Kitamura et al., Transgenic rescue of insulin receptor-deficient mice. *J. Clin. Invest.* **114**, 214–223 (2004)
 47. T. Kitamura, Y.I. Kitamura, M. Kobayashi et al., Regulation of pancreatic juxtaductal endocrine cell formation by FoxO1. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 4417–4430 (2009)