



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


Celina Carvalho Borges

**Efeitos adversos da deficiência de vitamina D em ilhotas  
pancreáticas de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica**

Rio de Janeiro  
2015

Celina Carvalho Borges

**Efeitos adversos da deficiência de vitamina D em ilhotas pancreáticas de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica**



Dissertação apresentada como requisito parcial à 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.<sup>a</sup> Dra. Marcia Barbosa Águila  
Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Isabele Bringhenti Sarmiento

Rio de Janeiro

2015

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

B732 Borges, Celina Carvalho.  
Efeitos adversos da deficiência de vitamina D em ilhotas pancreáticas de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica / Celina Carvalho Borges. – 2015.  
77 f.

Orientadora: Marcia Barbosa Águila.  
Coorientadora: Isabele Bringhenti Sarmento.

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

1. Vitamina D - Teses. 2. Deficiência de vitamina D. 3. Obesidade - Teses. 4. Ilhotas pancreáticas. 5. Gorduras na dieta - Teses. 6. Resistência à insulina – Teses. I. Águila, Marcia Barbosa. II. Sarmento, Isabele Bringhenti. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 616.39

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

---

Assinatura

---

Data

Celina Carvalho Borges

**Efeitos adversos da deficiência de vitamina D em ilhotas pancreáticas de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica**

Dissertação apresentada como requisito parcial à 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 21 de julho de 2015.

Banca examinadora:

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Marcia Barbosa Águila (Orientadora)

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

---

Prof<sup>a</sup> Dra. Thereza Cristina Lonzetti Bargut

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

---

Prof<sup>o</sup> Dr. Anderson Junger Teodoro

Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2015

## DEDICATÓRIA

Para os meus pais, namorado e amigos.  
Pelo exemplo que são para mim.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Gorette e Alexandre, por estarem comigo a cada dificuldade. Acompanhar-me pelos caminhos trilhados sempre com muito amor, paciência, e zelo. Obrigada por acreditarem e cuidarem de mim, sem vocês eu nada seria.

Ao meu namorado Felipe, com quem eu divido seis lindos anos. Sempre me apoiando, é para mim um exemplo de companheirismo e amor. Obrigada por me acompanhar nessa jornada.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Barbosa Águila, pela oportunidade e confiança. Obrigada por me acolher tão bem no laboratório. Abriu-me portas e me mostrou caminhos por onde antes, eu não havia pensado em trilhar. Obrigada por acreditar no meu potencial e trabalho.

À minha coorientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Isabele Bringhenti Sarmento, pela confiança e dedicação. Obrigada pelo apoio e valorização do meu trabalho. Mostrou-me que para a realização de um trabalho científico, além de muito trabalho, é necessária muita paciência. Obrigada por me mostrar isso com tanto carinho.

Ao professor Dr. Carlos Alberto Mandarin de Lacerda pela oportunidade e investimentos depositados em mim e no meu trabalho. Obrigada pelo incentivo, orientações, correções e confiança.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vanessa Souza Mello pelo apoio e aprendizados, sempre disposta a me ajudar e colaborar, sempre com muito carinho. Obrigada! Obrigada também à Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sandra Barbosa por compartilhar seu conhecimento e experiência.

Às alunas de iniciação científica Andreza Salles e Thaís Duarte, dois presentinhos que fizeram parte dessa caminhada com tanto entusiasmo e êxito. Obrigada por se fazerem presentes e por todo carinho, dedicação e companheirismo.

Um muito obrigado especial à Tamiris Rachid pela amizade, carinho, risadas e tanta ternura; à Aline Penna, pela amizade, carinho, conselhos e inúmeras dúvidas tiradas; à pós-doutora Thereza Bargut pela amizade, apoio, conselhos e inúmeros aprendizados; à pós-doutora Fernanda Ornellas pela amizade, carinho, apoio, aprendizado e tanta doçura; ao André Vianna pelo apoio, risadas, pelas inúmeras ajudas durante todo o trabalho e principalmente pela paciência; à

Thatiany Marinho por toda ajuda, apoio e risadas; à Francielle Graus por todo carinho, apoio, conselhos e ajuda; ao Dan Magliano pelas risadas, apoio e conhecimento, ao Willian Lannes, pela ajuda, apoio e companheirismo e às técnicas e amigas Michele Soares e Léia Lau por toda ajuda e assistência durante o trabalho.

Aos amigos do laboratório Verônica Airceles, Fabiane Martins, Flávia Gombar, Victor Motta, Iara Karise, Paula Fontoura, Helder Gonçalves, Jorge Medeiros, Thais Ceciliano, Guilherme de Sá, Raul Meneguine e Carolina Chamma por fazerem parte dessa árdua jornada.

A todos os professores do programa de pós-graduação BHEX pelas disciplinas ministradas e pelos ensinamentos repassados durante o mestrado

À CAPES, FAPERJ e ao CNPq, pelo suporte financeiro deste trabalho e pela bolsa concedida.

Agradeço todas as dificuldades que enfrentei,  
não fosse por elas, eu não teria saído do lugar.

As facilidades nos impedem de caminhar.

Mesmo as críticas nos auxiliam muito.

*Chico Xavier*



## RESUMO

BORGES, Celina Carvalho. *Efeitos adversos da deficiência de vitamina D em ilhotas pancreáticas de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica*. 2015. 77f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Objetivo: Avaliar os efeitos da deficiência de vitamina D sobre a massa corporal, perfil hormonal, função do pâncreas endócrino e metabolismo de carboidratos nos animais que receberão dieta hiperlipídica com restrição de vitamina D. Métodos: camundongos C57BL/6 machos foram alimentados com dieta controle (C) contendo 10% de energia proveniente dos lipídios ou com dieta hiperlipídica (HL) contendo 50% de energia proveniente dos lipídios com ou sem vitamina D durante 8 semanas. Foram analisados parâmetros metabólicos, massa corporal e consumo de energia; análises hormonais da insulina, glucagon, leptina, adiponectina e 25(OH)D<sub>3</sub>, assim como a imunodensidade de insulina e glucagon, além de análises moleculares como a expressão de proteínas na via Pi3k/Akt. Resultados: Os resultados mostraram que não houve diferenças na massa corporal entre os grupos HL e HL/VitD-. A deficiência de vitamina D em camundongos do grupo HL/VitD- agravou o quadro de hiperinsulinemia ( $P=0,04$ ), hiperleptinemia ( $P=0,0002$ ), resistência à insulina (HOMA-IR,  $P=0,04$ ); alterações funcionais nas ilhotas pancreáticas, incluindo desarranjo das células beta e distribuição das células alfa. Na via de sinalização da insulina, a expressão de IRS2 foi aumentada no grupo C/VitD- ( $P=0,001$ ) e diminuída no grupo HL/VitD- ( $P=0,009$ ). Curiosamente, a expressão da FOXO1 foi maior no grupo HL/VitD- que no grupo HL ( $P=0,03$ ) e a expressão de PDX1 foi menor no grupo HL/VitD- do que no grupo HL ( $P=0,025$ ) indicando que tanto a dieta HL como a deficiência de vitamina D influenciaram na regulação destas proteínas (*Two-way ANOVA*,  $P<0,0001$ ). Conclusões: A deficiência de vitamina D potencializa o remodelamento morfofuncional adverso da ilhota pancreática em camundongos obesos, contribuindo para a homeostase irregular da glicose. Estes resultados sugerem que esta condição pode antecipar o início do diabetes mellitus tipo 2 em indivíduos obesos.

Palavras-chave: Deficiência de vitamina D. Obesidade. Ilhotas pancreáticas. Resistência à insulina.

## ABSTRACT

BORGES, Celina Carvalho. *Adverse effects of vitamin D deficiency in pancreatic islet animals that receive high-fat diet*. 2015. 77f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

**Objective:** To evaluate the effects of vitamin D deficiency on body mass, hormonal profile, endocrine pancreas function and carbohydrate metabolism in animals that received high-fat diet with vitamin D restriction. **Methods:** C57BL/6 male mice were fed a control diet (SC) containing 10% energy from fat or a high-fat diet (HF) containing 50% energy from fat, with or without vitamin D for 8 weeks. Metabolic parameters, such as body mass and energy intake were analyzed; hormonal analyses of insulin, glucagon, leptin, adiponectin and 25(OH)D<sub>3</sub> were performed as well as insulin and glucagon immunostaining; and molecular analyses such as protein expression in the Pi3k/Akt pathway were done. **Results:** The results showed that there were no differences in body mass between the HF and the HF/VitD- groups. Vitamin D deficiency in diet-induced obese mice exacerbated hyperinsulinemia ( $P=0.04$ ), hyperleptinemia ( $P=0.0002$ ), insulin resistance (HOMA-IR,  $P=0.04$ ), and promoted changes in pancreatic islet function, including disarrangement of alpha cells and beta cells distribution. In the insulin signaling pathway, IRS2 expression was up-regulated in the SC/VitD- group ( $P=0.001$ ) and down-regulated in the HF/VitD- group ( $P=0.009$ ). Interestingly, FOXO1 expression was higher in the HF/VitD- group than the HF group ( $P=0.03$ ) and the PDX1 expression was lower in the HF/VitD- group than the HF group ( $P=0.025$ ), indicating that both the HF diet and the vitamin D deficiency influenced the regulation of these proteins expressions (two-way ANOVA,  $P<0.0001$ ). **Conclusions:** Vitamin D deficiency exacerbates structural and physiological adverse remodeling of the pancreatic islet in obese mice, contributing to abnormal glucose homeostasis. These results suggest that this condition could anticipate type 2 diabetes mellitus onset in obese individuals.

**Keywords:** Vitamin D deficiency. Obesity. Pancreatic islet. Insulin resistance.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fórmulas químicas da vitamina D.....	17
Figura 2 – Ação da 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> sobre o metabolismo ósseo.....	21
Figura 3 – Obesidade e comorbidades associadas.....	23
Figura 4 – Via de sinalização da insulina Pi3k/Akt em células beta pancreáticas..	29
Figura 5 – Desenho experimental.....	34
Figura 6 – Isolamento das ilhotas pancreáticas pelo método da colagenase.....	38
Figura 7 – Densidade de volume das ilhotas pancreáticas dos grupos estudados	41
Figura 8 – Segmentação de ilhota pancreática.....	43
Figura 9 – Evolução da massa corporal dos animais no período estudado.....	47
Figura 10 – Curva do TOTG dos diferentes grupos estudados.....	51
Figura 11 – Dosagem plasmática de 25(OH)D <sub>3</sub> .....	53
Figura 12 – Área seccional média das ilhotas pancreáticas.....	55
Figura 13 – Imunohistoquímica de células alfa pancreáticas.....	56
Figura 14 – Imunohistoquímica de células beta pancreáticas.....	57
Figura 15 – Imunofluorescência de ilhotas pancreáticas.....	59
Figura 16 – Análise por western blotting das ilhotas pancreáticas.....	62

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição das dietas segundo recomendação da AIN-93M.....	35
Tabela 2 – Padrão alimentar, metabolismo glicídico e dosagem hormonal.....	49
Tabela 3 - Estereologia do pâncreas.....	54

## LISTA DE ABREVIATURAS

7-DHC – 7-deidrocolesterol  
AGL – Ácidos graxos livres  
Akt – Proteína quinase B  
AMP - monofosfato de adenosina  
AMPK - Via da proteína quinase ativada por adenosina monofosfato  
ANOVA - Análise de variância  
ASC – Área sob a curva  
 $A_{sec}$  – Área seccional média  
ATP – Trifosfato de adenosina  
BCA – *Protein Assay Kit*  
BSA - Albumina sérica bovina  
C – Controle  
C/VitD- Controle sem vitamina D  
Cpt2 - Carnitina palmitoil transferase tipo 2  
DAB - Diaminobenzidina  
DAPI – 4',6-diamidino-2-fenilindol  
DBP – Proteína ligante de vitamina D  
DM2 – Diabetes mellittus tipo 2  
DP – Desvio padrão  
DPGNA - Doença pancreática gordurosa não alcoólica  
ELISA - *Enzyme linked immunonosorbent assay*  
FOXO – Fator de transcrição *forkhead*  
GLUT – Transportador de glicose  
HL – Hiperlipídica  
HL/VitD- - Hiperlipídica sem vitamina D  
HOMA-IR – *Insulin resistance homeostasis model assessment*  
IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística  
IGF-1 - Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1  
IRS2 - Substrato do receptor de insulina tipo 2  
MP – Massa do pâncreas

OMS - Organização Mundial de Saúde  
p-Akt – Proteína quinase B fosforilada  
PBS - Tampão fosfato salino  
PCR – Proteína C reativa  
PDX1 – Fator homeobox pancreático-duodenal  
Pi3k – Fosfatidilinositol 3 quinase  
P<sub>P</sub> – Pontos parciais do sistema-teste  
PPAR - Receptores ativados de proliferação peroxissomal  
P<sub>T</sub> – Pontos totais do sistema-teste  
PTH – Paratormônio  
PVDF – Fluoreto de polivinilideno  
Q<sub>A</sub>- Número de estruturas pelo sistema teste  
SDS-PAGE - Dodecil-sulfato de sódio de poliacrilamida  
SRA - Sistema renina-angiotensina  
TBS-T - Tampão salina com Tris  
TOTG - Teste oral de tolerância à glicose  
u.a. – Unidade arbitrária  
UCP – Proteína desacopladora mitocondrial  
UVB – Luz ultravioleta B  
VDR – Receptor de vitamina D  
V<sub>v</sub> – Densidade de volume

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
1	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	17
1.1	<b>Vitamina D</b> .....	17
1.2	<b>Obesidade</b> .....	22
1.3	<b>Pâncreas</b> .....	26
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	32
2.1	<b>Geral</b> .....	32
2.2	<b>Específicos</b> .....	32
3	<b>METODOLOGIA</b> .....	33
3.1	<b>Animais e Dieta</b> .....	33
3.2	<b>Massa corporal e Ingestão alimentar</b> .....	36
3.3	<b>TOTG</b> .....	36
3.4	<b>Eutanásia e Preparo do material</b> .....	37
3.5	<b>Análise dos níveis de insulina e HOMA-IR</b> .....	38
3.6	<b>Análise Bioquímica</b> .....	39
3.7	<b>Análise do pâncreas</b> .....	39
3.7.1	<u>Estereologia do pâncreas</u> .....	39
3.7.1.1	Área seccional média das ilhotas.....	39
3.7.1.2	Densidade de volume de ilhotas e massa de ilhotas pancreáticas.....	40
3.8	<b>Imunohistoquímica</b> .....	41
3.8.1	<u>Densidade de volume e massa de células alfa pancreática</u> .....	42
3.8.2	<u>Densidade de volume e massa de células beta pancreática</u> .....	42
3.9	<b>Imunofluorescência</b> .....	43
3.10	<b>Western Blotting</b> .....	44
3.11	<b>Análise estatística</b> .....	45
4	<b>RESULTADOS</b> .....	46
4.1	<b>Massa corporal e Ingestão alimentar</b> .....	46
4.2	<b>Glicose em jejum e HOMA-IR</b> .....	48
4.3	<b>TOTG e Área sobre a Curva</b> .....	50
4.4	<b>Dosagem hormonal</b> .....	51
4.5	<b>Estereologia do pâncreas</b> .....	53

4.6	<b>Imunofluorescência.....</b>	58
4.7	<b>Western Blotting.....</b>	59
5	<b>DISCUSSÃO.....</b>	63
6	<b>CONCLUSÃO.....</b>	68
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	69
	<b>ANEXO A – Termo de submissão do artigo científico à publicação.....</b>	76
	<b>ANEXO B – Comitê de ética e pesquisa.....</b>	77



## INTRODUÇÃO

Atualmente a hipovitaminose D é considerado um problema de saúde pública em todo o mundo (de Borst *et al.*, 2011). A vitamina D é uma vitamina lipossolúvel cuja função fisiológica mais conhecida nos vertebrados é manter as concentrações séricas de cálcio e de fósforo a uma taxa que sustente os processos celulares, a função neuromuscular e a calcificação óssea, aumentando a eficiência do intestino delgado em absorver cálcio e fosfato da dieta (Norman, 2008).

Encontrada na forma biologicamente inativa, necessita de sucessivas hidroxilações no fígado para formar a 25-hidroxivitamina D [25(OH)D<sub>3</sub>] (Calcidiol) e no rim para formar a 1,25-diidroxivitamina D [1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>] (Calcitriol), sua forma biologicamente ativa. A 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> interage com um receptor nuclear específico, o receptor de vitamina D (Vitamin D Receptor - VDR) em seus tecidos alvo, presentes nos principais sítios de ação desta vitamina, como rins, glândulas paratireoides, intestino delgado e osso (Kimball *et al.*, 2008). Porém, recentemente descobriu-se que a maioria das células apresentam o VDR, como as células beta pancreáticas, hepatócitos, adipócitos e miócitos (Mason *et al.*, 2011), sugerindo que a função dessa vitamina se estenda além do metabolismo ósseo.

Além disso, estudos apontam que a deficiência de vitamina D pode predispor à intolerância à glicose, diminuir a secreção de insulina e favorecer o desenvolvimento do diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e obesidade (Pittas *et al.*, 2010). Em um estudo experimental em camundongos, os autores demonstraram que a deficiência de vitamina D provoca intolerância à glicose, alterando a transcrição de genes relacionados com a função normal das ilhotas pancreáticas (Cheng *et al.*, 2013). Por outro lado, a obesidade agrava o quadro de resistência à insulina, podendo levar ao DM2 (Pittas e Dawson-Hughes, 2010).

Normalmente, indivíduos obesos apresentam baixos níveis séricos de vitamina D, e a 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> controla o influxo de cálcio intracelular (Chiu *et al.*, 2004). Uma vez que o cálcio é necessário tanto para a secreção de insulina pelas células beta pancreáticas, como para a captação de glicose pelos músculos esqueléticos, o menor influxo de cálcio para o meio intracelular, diminui a secreção e a sensibilidade à insulina (Kenty e Melton, 2015).

O pâncreas é um dos órgãos mais afetados na obesidade. Com o consumo crônico de dietas hiperenergéticas ocorre um processo conhecido como glicolipototoxicidade que se refere aos efeitos deletérios combinados, de níveis elevados de glicose e ácidos graxos livres (AGL) na função das células beta pancreáticas (Poitout e Robertson, 2008).

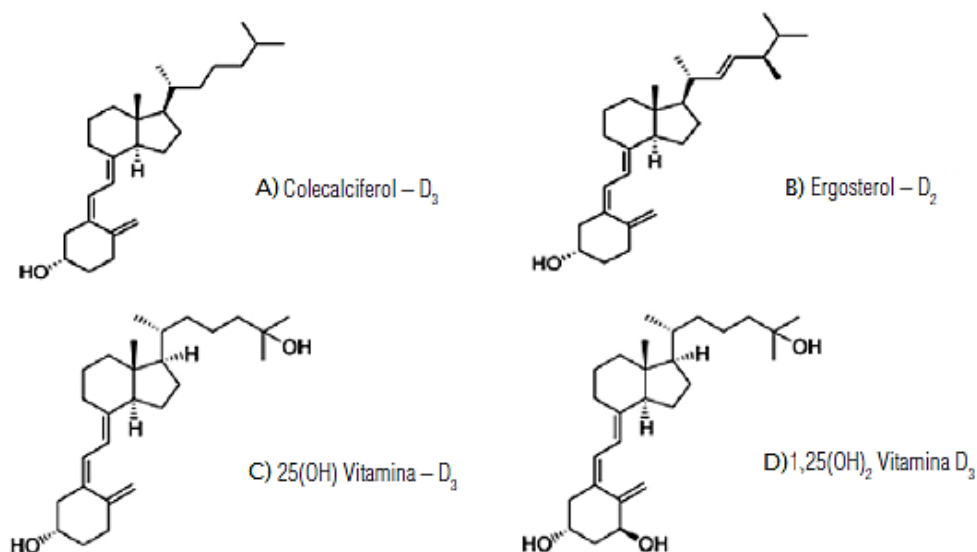
A hipótese deste trabalho é que a combinação da deficiência de vitamina D com a obesidade em camundongos, quadro tão comum na atualidade, agravaria os efeitos deletérios no pâncreas, alterando a via de sinalização da insulina, além de diminuir a secreção e a sensibilidade à insulina. Para testar tal hipótese, utilizamos camundongos machos C57BL/6 adultos que foram induzidos à obesidade por ingestão de dieta hiperlipídica sem vitamina D. Investigamos o pâncreas endócrino, a distribuição e a massa de células alfa/beta nas ilhotas pancreáticas e a expressão proteica de fatores de transcrição envolvidos na via de sinalização da insulina Pi3k/Akt (Fosfotidilinositol 3 quinase/Proteína quinase B), como possíveis mecanismos para o desencadeamento do DM2 neste modelo experimental.

## 1 REVISÃO DA LITERATURA

### 1.1 Vitamina D

A vitamina D, pertencente ao grupo das vitaminas lipossolúveis, é considerada um hormônio esteroide cujos precursores são adquiridos na dieta ou produzido na pele dos seres humanos. O termo vitamina D engloba um grupo de moléculas derivadas do 7-deidrocolesterol (7-DHC). Sob essa denominação ampla abrangem-se tanto o metabólito ativo  $[1,25(\text{OH})_2\text{D}_3]$  como a sua forma de pré-hormônio  $[25(\text{OH})\text{D}_3]$  comumente dosada, assim como seus precursores, entre eles a vitamina  $\text{D}_3$  (Colecalciferol) e vitamina  $\text{D}_2$  (Ergosterol) (Figura 1) (Castro, 2011).

Figura 1 - Fórmulas químicas da vitamina D



Legenda: Os diferentes compostos que são usualmente classificados como vitamina D: o Colecalciferol ou Vitamina  $\text{D}_3$  (A), Ergosterol ou Vitamina  $\text{D}_2$  (B), Calcidiol (C) e Calcitriol (D).

Fonte: Adaptado de CASTRO, 2011.

Inicialmente, o termo “vitamina” foi sugerido por Casimir Funk, em 1911 que previu que uma “amina vital” presente nos alimentos era necessária para a saúde e

sobrevivência de um ser e não apenas os macronutrientes como acreditava-se até então (Funk., 1911). Desde a descoberta da vitamina A, em 1913, a importância das vitaminas tem sido cada vez mais discutida e as recomendações dos valores de ingestão assim como as suplementações tornaram-se foco de alguns pesquisadores (Davis, 1913).

A função da vitamina D e sua ação nos processos metabólicos são pesquisadas desde o século XVII, baseado em sua relação com o raquitismo que assolava os países ocidentais naquela época (Bouillon *et al.*, 2008). O raquitismo era uma doença que atingia grande parcela das crianças, ou porque evitavam a exposição à luz solar, como acontecia com as de maior classe social ou porque consumiam alimentos pobres em vitamina D, como acontecia nas famílias mais pobres que viviam nas favelas. Além disso, a poluição crescente e a penumbra consequente do desenvolvimento nas grandes cidades europeias industrializadas agravaram ainda mais este quadro (Bouillon *et al.*, 2008).

Em 1916, Harry Steenbock, na Universidade de Wisconsin realizou um estudo experimental com cabras que mostrou que quando esses animais eram mantidos ao ar livre com exposição ao sol do verão, apresentavam balanço positivo de cálcio. Entretanto, no inverno, quando as cabras eram mantidas em local fechado e na ausência de luz solar, apresentavam balanço negativo de cálcio (Steenbock e Hart, 1916). Mais tarde, em 1924, Steenbock fez uma pesquisa semelhante com ratos e concluiu que uma fração de lipídios inativos presentes na pele dos ratos seriam ativados pela luz ultravioleta (até então desconhecia-se que a luz ultravioleta B [UVB] era responsável pela síntese de vitamina D) (Steenbock, 1924).

Com o avanço das pesquisas, o raquitismo gradualmente desapareceu ao longo dos anos, as pessoas passaram a se expor mais à luz solar (com maior exposição à luz UVB) e, concomitantemente, passaram a ingerir mais alimentos fonte de vitamina D ou a usar suplemento oral de vitamina D, como por exemplo, o óleo de fígado de bacalhau (fonte de vitamina D<sub>3</sub> ou colecalciferol) (Bouillon *et al.*, 2008).

O estudo da vitamina D tomou tal proporção que, em 1928, Adolf Otto Reinhold Windaus ganhou o Prêmio Nobel de Química com um trabalho sobre a formulação e síntese química do colecalciferol (Vitamina D<sub>3</sub>) e propôs que a vitamina D fosse considerada um composto nutricional vital para o organismo (Bouillon *et al.*, 2008).

Uma das principais funções da vitamina D é o controle da homeostase óssea. A  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  realiza esta função aumentando a eficiência da absorção no intestino delgado do cálcio e do fósforo da dieta e mobiliza os depósitos de cálcio e fósforo nos ossos, quando necessário, a fim de manter a homeostase sanguínea desses minerais. (Norman, 2008). Ambas as vitaminas D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub> podem ser obtidas pela alimentação, porém os alimentos não veiculam grandes quantidades dessa vitamina, contribuindo apenas com cerca de 10 a 20% das recomendações diárias (Norman, 2008). As principais fontes dietéticas de vitamina D<sub>2</sub> são encontradas nos alimentos de origem não animais como fungos comestíveis, e as fontes de vitamina D<sub>3</sub> são encontrados em alimentos de origem animal, como peixes gordurosos de água fria (atum e salmão), ovos e produtos lácteos. Os restantes 80% a 90% de vitamina D necessária para o organismo são sintetizadas endogenamente em um processo iniciado pela exposição aos raios solares UVB (Holick, 2006).

A síntese endógena de vitamina D se inicia através da transformação do precursor epitelial 7-DHC em vitamina D<sub>3</sub> por ação dos raios UVB, através de uma cascata de reações fotolíticas e enzimáticas na camada cutânea. Depois, a vitamina D<sub>3</sub> entra na circulação sanguínea e é transportada para o fígado unida à uma proteína ligante da vitamina D (Vitamin D Binding Protein - DBP). No fígado, ocorre a primeira hidroxilação para formar a  $25(\text{OH})\text{D}_3$ , que será secretada no plasma. Nos rins, ocorre a segunda hidroxilação e consequente ativação da vitamina D, tema que foi muito bem descrito em uma revisão recente de Kenty e Melton em 2015. Para se tornar ativa, a  $25(\text{OH})\text{D}_3$  é hidroxilada pela enzima 25-hidroxivitamina D-1 $\alpha$ -hidroxilase (1 $\alpha$ -hidroxilase) nos rins, transformando a vitamina D na sua forma metabolicamente ativa, a  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (Kenty e Melton, 2015).

O nível plasmático de vitamina D é mensurado na forma da  $25(\text{OH})\text{D}_3$ , pois a forma biologicamente ativa desta vitamina, a  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , é mais difícil de ser mensurada devido as seguintes razões:

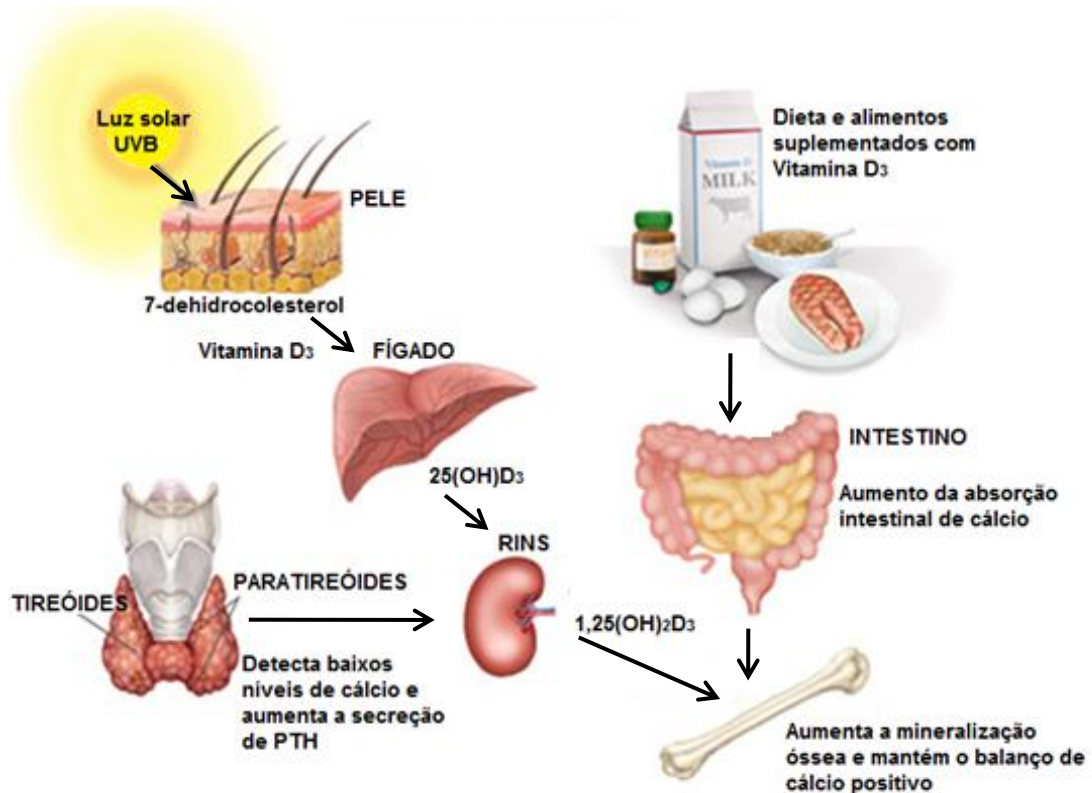
- a) Os níveis plasmáticos da  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  são mantidos rigorosamente em concentrações normais;
- b) Os níveis plasmáticos de  $25(\text{OH})\text{D}_3$  são aproximadamente cem vezes maiores do que os da  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ;
- c) A hidroxilação da  $25(\text{OH})\text{D}_3$  a  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ocorre em diversos tecidos, suprimindo as necessidades locais;

d) a meia-vida da  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  é de aproximadamente seis horas, enquanto que a meia vida da  $25(\text{OH})\text{D}_3$ , é de duas a três semanas (Mosekilde, 2005).

Os efeitos biológicos da forma ativa da vitamina D, a  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , são mediados pelo VDR, presentes nos principais locais de ação, como rins, glândulas paratireoides, intestino delgado e ossos (Kimball *et al.*, 2008) e na maioria das células nucleadas como as células beta-pancreáticas, hepatócitos, adipócitos e tecido muscular esquelético (Mason *et al.*, 2011).

Com a redução nos níveis plasmáticos da  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , ocorre diminuição dos níveis sanguíneos de cálcio, conseqüentemente as glândulas paratireoides detectam essa redução e aumentam a síntese e secreção do hormônio da paratireoide, o paratormônio (PTH) (Heaney *et al.*, 2003 ). Os níveis elevados de PTH circulantes aumentam a reabsorção do tecido ósseo, promovendo a retirada de cálcio deste tecido, aumentam também a reabsorção tubular de cálcio pelo ultrafiltrado tubular renal e aumentam a produção renal da  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (Holick, 2006). Com o objetivo de aumentar a eficiência da absorção intestinal de cálcio, associado ao PTH, a  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  induz indiretamente as células-tronco monocíticas a se tornarem osteoclastos funcionais e maduros e para induzir a mobilização dos depósitos de cálcio do osso (Figura 2) (Tsiaras e Weinstock, 2011).

Figura 2 - Ação da 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> sobre o metabolismo ósseo



Legenda: A vitamina D pode ser absorvida pela dieta ou ser sintetizada através da conversão da enzima 7-deidrocolesterol pela ação dos raios solares UVB. A vitamina D<sub>3</sub> é hidroxilada no fígado formando a 25(OH)D<sub>3</sub> e no rim, sofre ação da enzima 1 $\alpha$ -hidroxilase, formando a 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, forma metabolicamente ativa que atua no intestino delgado promovendo maior absorção de cálcio e mantendo o balanço de cálcio positivo. O PTH, produzido pelas glândulas paratireóides, também ajuda a manter o cálcio em níveis normais.

Fonte: A autora, 2015.

Apesar de o rim ser o principal local de ativação da vitamina D, a enzima 1 $\alpha$ -hidroxilase pode ser encontrada em outros tecidos, como próstata, mama, cólon, pâncreas e células do sistema imune. Acredita-se, porém, que a hidroxilação extrarrenal tenha efeito autócrino e parácrino local não fazendo parte da circulação sistêmica (Prentice, 2008).

Em humanos, a IDR de 25(OH)D<sub>3</sub> para indivíduos adultos, entre 20 e 70 anos, é de 50nmol/L (Ross *et al.*, 2011). Este valor garante uma adequada homeostase óssea, pode prevenir doenças cardiovasculares, hipertensão arterial, diabetes mellitus, síndrome metabólica, doenças autoimunes e desordens neuropsicológicas. Para atingir este valor da vitamina D sérica, a recomendação de ingestão diária é de 600UI/dia (Ross *et al.*, 2011).

A deficiência da vitamina D pode favorecer a intolerância à glicose, diminuir a secreção de insulina e favorecer o desenvolvimento do DM2 (Pittas e Dawson-Hughes, 2010), da obesidade e da hipertensão arterial sistêmica (Pittas *et al.*, 2010). Isto é preocupante, uma vez que em 2008, uma publicação referente ao 22<sup>nd</sup> *Marabou Symposium: the changing faces of vitamin D* mostrou que cerca de um bilhão de indivíduos em todo mundo apresentam algum nível de deficiência de vitamina D (James, 2008). Além do mais, pesquisas mostram que indivíduos obesos apresentam baixos níveis séricos de vitamina D e esta deficiência se agrava à medida que o grau de obesidade aumenta (Wortsman *et al.*, 2000).

## 1.2 Obesidade

O aumento da obesidade surge como uma epidemia e de forma alarmante atinge indivíduos de todas as idades e níveis socioeconômicos. Estudos confirmam a crescente magnitude de obesidade em crianças, adolescentes, adultos e mulheres em idade reprodutiva. Dados da Organização Mundial de Saúde<sup>1</sup> (OMS, 2014) mostram que aproximadamente 13% da população mundial adulta (11% dos homens e 15% das mulheres) eram obesos em 2014. A OMS<sup>2</sup> estima que, em 2015, aproximadamente 55% de adultos do Brasil tem excesso de peso e aproximadamente 17% são obesos.

Como causas da obesidade, podem ser apontados o estilo de vida sedentário e o consumo de alimentos com alta densidade energética (Gallou-Kabani e Junien, 2005). Segundo inquérito nutricional realizado no Brasil (IBGE, 2008) houve um aumento no consumo total de gordura, principalmente as gorduras saturadas e, também aumento do consumo de carboidratos simples. Além disso, houve aumento acentuado do consumo de alimentos industrializados como refrigerantes,

---

<sup>1</sup> Organização Mundial da Saúde. Obesidade e Sobrepeso. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>>. Acesso em: 20 jul. 2015.

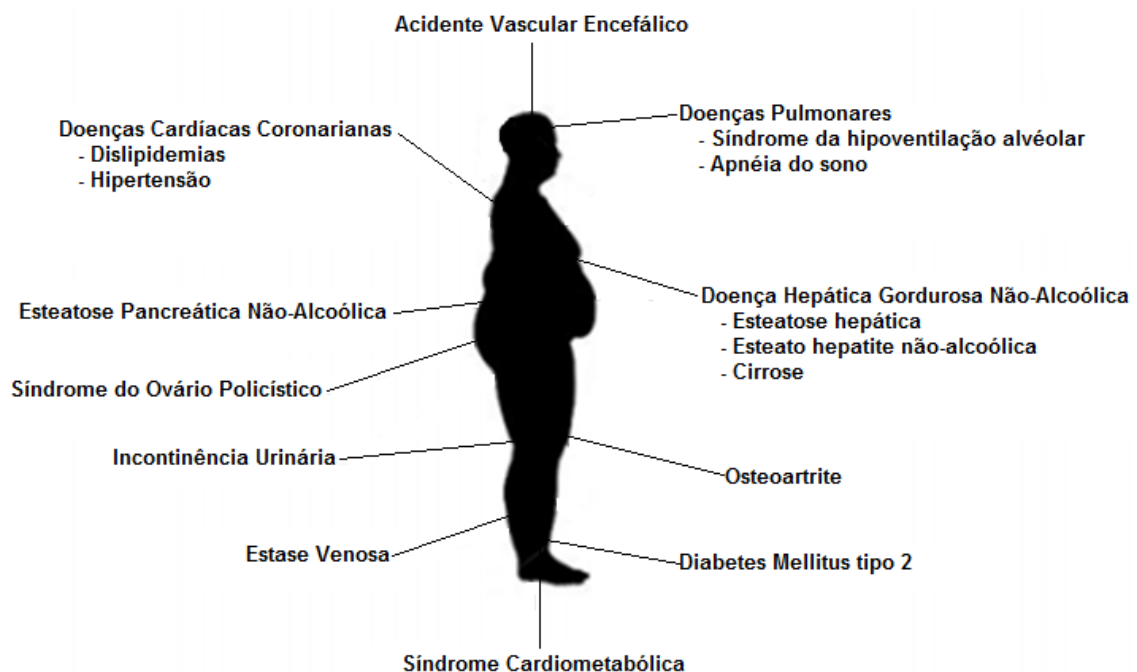
<sup>2</sup> Organização Mundial da Saúde. Obesidade e Sobrepeso. Disponível em: <[http://www.who.int/gho/ncd/risk\\_factors/overweight/en/](http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/overweight/en/)>. Acesso em: 20 jul. 2015.



salgadinhos e *fast food* e diminuição igualmente intensa do consumo de alimentos *in natura*, como leguminosas e vegetais<sup>3</sup>.

Além disso, a obesidade é considerada uma doença multifatorial que favorece o aparecimento de outras doenças, tais como dislipidemia, doença cardiovascular, DM2 e certos cânceres (Swinburn *et al.*, 2011)(Figura 3).

Figura 3 - Obesidade e comorbidades associadas



Legenda: A obesidade é uma doença multifatorial que acomete diversos órgãos, colaborando para o desenvolvimento de diversas doenças.

Fonte: A autora, 2015.

Atualmente, o tecido adiposo é considerado um órgão secretor altamente ativo e amplamente distribuído ao longo do corpo. O tecido adiposo secreta adipocinas que atuam em diferentes partes do organismo. As adipocinas influenciam na regulação da homeostase e atuam em diversos processos como: ingestão de alimentos, balanço energético, ação da insulina, metabolismo de lipídios e hidratos de carbono, remodelamento vascular, pressão sanguínea e coagulação (Blüher, 2012). Atualmente se conhece mais de 50 citocinas secretadas pelo tecido adiposo,

<sup>3</sup> Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de Orçamento Familiar 2008-2009. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008\\_2009/](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009/)>. Acesso em: 20 fev. 2015.

sendo as mais relevantes a leptina, adiponectina e resistina, além de componentes do sistema renina-angiotensina (SRA) e outros produtos como fator de necrose tumoral alfa, interleucina-6, proteína C reativa (PCR) e os receptores ativados de proliferação peroxissomal por ligantes gama (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma* - PPAR gama) (Tilg e Moschen, 2006).

Ao contrário das outras adipocinas, a adiponectina está diminuída nos indivíduos obesos, o que pode ser um fator a mais para o desenvolvimento do DM2, uma vez que um dos seus principais efeitos da adiponectina é o aumento da sensibilidade à insulina (Akagiri et al., 2008). Neste ponto, a vitamina D pode ser uma aliada para aumentar os níveis de adiponectina, pois estudos clínicos mostram que a concentração plasmática de 25(OH)D<sub>3</sub> tem correlação positiva com os valores plasmáticos de adiponectina (Nimitphong et al., 2009; Al-Daghri et al., 2013).

A leptina, outra adipocina importante secretada pelo tecido adiposo, depois de secretada pelo adipócito, chega à circulação, atravessa a barreira hematoencefálica e se liga à receptores específicos no hipotálamo. A estimulação destes receptores leva à supressão do apetite e aumento do metabolismo, por meio da estimulação da atividade simpática (Blüher, 2012). Também podem ser observados efeitos periféricos no pâncreas, como a inibição da liberação de insulina pelas células beta-pancreáticas no estado alimentado (Ceddia et al., 1999)

Há uma relação direta entre quantidade de tecido adiposo e as concentrações de leptina, de modo que um aumento das reservas de gordura normalmente leva a um aumento concomitante da quantidade de leptina no sangue. Entretanto, indivíduos obesos paradoxalmente apresentam resistência à leptina no hipotálamo e perda da capacidade de supressão da leptina sobre a secreção de insulina pelas células beta-pancreáticas, contribuindo assim, para o desenvolvimento de hiperinsulinemia e resistência à insulina (Gray et al., 2010).

Parece que a leptina atenua a resposta imune, o que contribuiria ainda mais para a inflamação crônica que os indivíduos obesos apresentam (Fantuzzi e Faggioni, 2000). E para agravar ainda mais este quadro, a vitamina D também tem um papel importante na resposta imune. Em situação de baixa concentração de vitamina D, o sistema imunológico produz uma resposta autorreativa, sintetizando células T e interleucinas pró-inflamatórias que agem contra o próprio organismo, predispondo o organismo a desenvolver um estado de inflamação crônica (Mangin et al., 2014).

Entretanto, a associação entre deficiência de vitamina D e sensibilidade à insulina na obesidade ainda é controverso. Uma discussão comum na literatura é a seguinte: é a hipovitaminose D que provoca obesidade ou é a obesidade que provoca hipovitaminose D? (Pourshahidi, 2015). Como já foi dito, indivíduos obesos apresentam baixos níveis de 25(OH)D<sub>3</sub>. Estudos epidemiológicos mostram que há uma relação inversamente proporcional entre os níveis plasmáticos de vitamina D e a quantidade de tecido adiposo (Earthman *et al.*, 2012; Gonzalez *et al.*, 2013).

Em roedores, o papel da vitamina D na obesidade ainda é controversa. Por exemplo, um trabalho recente com camundongos C57BL/6 mostrou que a suplementação com vitamina D<sub>3</sub> preveniu o aumento da massa corporal em camundongos obesos (Marcotorchino *et al.*, 2014). Liu e colaboradores mostraram em outro trabalho recente, que camundongos obesos da cepa ICR que receberam dieta sem vitamina D, diminuíram a adiposidade corporal e melhoram a resposta da insulina, pelo aumento das enzimas carnitina palmitoil transferase (carnitine palmitoyl transferase 2 - Cpt2) e da proteína desacopladora mitocondrial (uncoupling protein 3 - UCP3) em tecido adiposo branco, ambas envolvidas na beta-oxidação dos AGL (Liu *et al.*, 2015). As diferentes respostas observadas nos estudos mostra que este assunto não está bem esclarecido e pela grande influência que a vitamina D exerce em vários processos metabólicos é importante que os desenhos metodológicos usados em trabalhos experimentais apresentem alta acurácia e reprodutibilidade.

Uma hipótese para os indivíduos obesos apresentarem diminuição de vitamina D é que o tecido adiposo seria capaz de “sequestrar” a 25(OH)D<sub>3</sub> plasmática impedindo que esta se ligue à proteína carreadora de vitamina D, não ocorrendo assim, a ativação da vitamina D na sua forma metabolicamente ativa, ficando novamente disponível apenas com a mobilização da gordura do adipócito e o consequente emagrecimento, liberando a 25(OH)D<sub>3</sub> de volta para a circulação (Earthman *et al.*, 2012). Outra hipótese para a diminuição dos níveis plasmáticos de vitamina seria a síntese diminuída de 25(OH)D<sub>3</sub> no fígado, local de hidroxilação primária, uma vez que a esteatose hepática, comum nos indivíduos obesos, atrapalharia a conversão desta vitamina no fígado (Targher *et al.*, 2007).

Estudos mostram que camundongos *knockout* para o VDR apresentam resistência à obesidade induzida por dieta. Tal fenótipo estaria relacionado com um aumento de proteínas desacopladoras mitocondriais (Uncoupling Protein - UCP), tais

como a UCP1 no tecido adiposo marrom com consequente aumento da beta-oxidação dos ácidos graxos (Wong et al., 2009). A limitação de ganho de peso seria explicada pela oxidação de lipídios evidenciada pelo aumento da expressão dos genes envolvidos na oxidação dos ácidos graxos e no metabolismo mitocondrial, levando a um aumento do gasto de energia (Wong et al., 2009).

Como a produção de 25(OH)D<sub>3</sub> pelo fígado é regulada por um mecanismo de retroalimentação negativa controlada pela 25(OH)D<sub>3</sub> e 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> e, uma vez que o cálcio é necessário tanto para a secreção de insulina pelas células beta-pancreáticas, como para a captação de glicose pelo músculo esquelético, o menor influxo de cálcio para o meio intracelular, diminui a secreção da insulina (Schuch et al., 2009). Assim, é notável que concentrações adequadas de 25(OH)D<sub>3</sub> são necessárias para manter a secreção adequada de insulina (Boucher, 2011).

### 1.3 Pâncreas

O pâncreas é um dos órgãos mais afetados na obesidade, já que exerce papel importante no metabolismo dos carboidratos. Os hormônios glucagon e insulina são secretados a partir das células alfa e beta das ilhotas pancreáticas, respectivamente. Ambos participam da regulação da homeostase da energia e da sensibilidade à insulina. Fisiologicamente, o aumento na ingestão de alimentos leva a um aumento na secreção de insulina e diminuição dos níveis de glucagon (Cahill, 1971).

Com o consumo crônico de dietas ricas em hidratos de carbono simples ocorre um processo conhecido como glicotoxicidade. Este processo é caracterizado por excesso de glicose por períodos prolongados, sobrecarregando as células beta pancreáticas e resultando em aumento da secreção de insulina e redução progressiva dos estoques de pró-insulina com diminuição da massa de células beta por um mecanismo de morte celular conhecido como apoptose e sem um aumento compensatório na proliferação de células beta (Kaiser et al., 2003).

Por outro lado, com o aumento do consumo de dietas ricas em lipídios, as células beta pancreáticas utilizam o lipídio como combustível energético em detrimento à glicose, levando à um estado de lipotoxicidade, modulada por sinais

positivos resultantes de fatores circulantes, tais como hormônios, fatores de crescimento e incretinas. Esta resposta também pode ser modulada por sinais negativos, tais como mediadores inflamatórios e citocinas (Sharma e Alonso, 2014). Mecanismos intracelulares de lipotoxicidade incluem estresse oxidativo, estresse do retículo endoplasmático e, possivelmente, apoptose, prejudicando a secreção de insulina e ocasionando hiperglicemia e falência das células beta, levando, em longo prazo, ao desenvolvimento da resistência à insulina e DM2 (Szczepaniak *et al.*, 2012). Porém, como a hiperglicemia ocorre junto à lipotoxicidade, o termo glicolipotoxicidade é mais apropriado para descrever esses efeitos deletérios dos lipídios sobre a função das células beta (Poitout e Robertson, 2008).

Além da lipotoxicidade, o excesso da ingestão de lipídio, assim como acontece no fígado, leva ao acúmulo de gordura ectópica no tecido pancreático. Esta condição é chamada doença pancreática gordurosa não alcoólica (DPGNA), caracterizada pelo aumento de massa, gordura pancreática e liberação de citocinas inflamatórias com consequente hipertrofia das ilhotas e disfunção de células beta (Pitt, 2007).

De uma forma geral, a obesidade causa resistência à insulina devido às alterações morfofuncionais que acometem as células alfa e beta do pâncreas com subsequente prejuízo na via de sinalização da insulina (Ahren e Pacini, 2005; Cohen *et al.*, 2015). Devido ao prejuízo causado por essa comorbidade, nas células alfa, ocorre aumento da síntese de glucagon e concomitante aumento da secreção de insulina pelas células beta (Ferrannini *et al.*, 2007; Ahren, 2009). Essa desregulação na secreção dos hormônios por células alfa e beta ocasionam resistência à insulina e consequente desenvolvimento da intolerância à glicose, que em longo prazo, pode levar ao DM2 (Ahren, 2009).

Em humanos, a distribuição das células alfa acontece em praticamente toda a ilhota pancreática, assim como os outros tipos de células; nos roedores, por outro lado, as ilhotas apresentam uma conformação regular e arredondada onde a localização das células alfa se restringe à periferia e as células beta, ficam localizadas no interior junto com as demais células (*delta*, PP e *epsilon*) (Gil-Campos *et al.*, 2004). No entanto, quando roedores são alimentados com uma dieta hiperlipídica, observa-se hipertrofia da ilhota, perda do formato arredondado e as células alfa distribuídas de forma irregular, infiltradas para o interior da ilhota (Adeghate *et al.*, 2006). Em um trabalho com camundongos obesos, os autores

mostraram que as ilhotas pancreáticas estavam hipertrofiadas e a massa de células beta aumentada, características consideradas como adaptações que ocorrem nas ilhotas em resposta à obesidade (Earthman *et al.*, 2012).

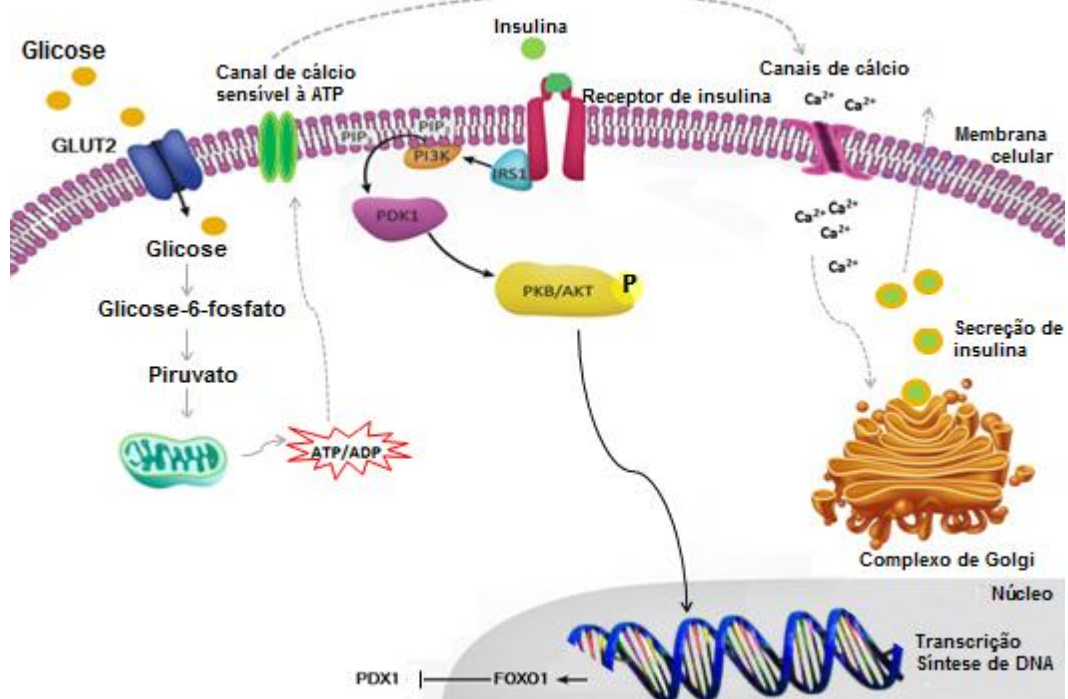
Nas células beta pancreáticas, a insulina e o fator de crescimento semelhante à insulina (*Insulin Growth Factor 1* - IGF-1) ativam Akt de forma dependente à ativação da Pi3k (Dickson e Rhodes, 2004). Na via da insulina Pi3k/Akt, o substrato do receptor de insulina tipo 1 (*Insulin Receptor Substrate 1* - IRS1) é o principal substrato do receptor de insulina (*Insulin Receptor* – IR) nas células beta pancreáticas. Quando a expressão da IRS1 diminui na resistência à insulina este substrato pode ser parcialmente compensado pelo aumento do IRS2 (Withers *et al.*, 1998). A ligação da insulina às subunidades alfa do seu receptor de membrana ativa as subunidades beta, promovendo a autofosforilação deste que por sua vez ativa a função tirosina-quinase intrínseca que catalisa a fosforilação de IRS1, que interage com Pi3k que estimula o recrutamento da principal molécula da cascata, a Akt (Brunet *et al.*, 1999; Kitamura *et al.*, 1999).

A proteína Akt uma vez fosforilada, regula positivamente o fator de transcrição *forkhead 2* (*Forkhead Transcription Factor 2* – FOXO2), que por sua vez, inibe o fator de transcrição *forkhead 1* (*Forkhead Transcription Factor 1* - FOXO1) (Brunet *et al.*, 1999; Katoh, 2004). Com a diminuição da expressão de Akt, a expressão de FOXO2 diminui e o FOXO1 é mais expresso, com conseqüente diminuição do fator *homeobox* pancreático-duodenal (*Pancreatic and duodenal homeobox 1* - PDX1), caracterizando um estado de disfunção celular (Kitamura *et al.*, 2002). O PDX1 é um fator de transcrição-chave que é expresso em diversos estágios do desenvolvimento do pâncreas e também no processo de diferenciação das células beta pancreáticas. O gene do PDX1 é o mais precocemente identificado no desenvolvimento embrionário do pâncreas (Schwitzgebel *et al.*, 2003). A expressão do PDX1 está ligada à preservação da função das células beta pancreáticas. Estudos clínicos mostram que há diminuição na expressão PDX1 na resistência à insulina e no DM2 (Yang *et al.*, 2012).

Outro fator importante na resposta da secreção de insulina são os transportadores de glicose (*Glucose Transporter* – GLUT). Em condições fisiológicas, o GLUT2, transportador de glicose presente no citoplasma das células beta pancreáticas, é estimulado à translocação na membrana plasmática pela concentração aumentada de glicose extracelular, possibilitando a entrada da glicose

na célula com consequente participação desta molécula no metabolismo energético. A glicose serve como substrato na via da glicólise, produzindo moléculas de piruvato que na mitocôndria, participa do ciclo do ácido tricarboxílico e da cadeia de transporte de elétrons, gerando moléculas de trifosfato de adenosina (ATP), a principal moeda energética que leva ao fechamento dos canais de potássio voltagem-dependentes (Folli et al., 2011). Estes por sua vez atuam causando despolarização da membrana plasmática sobre os canais de cálcio levando ao influxo desse íon no citoplasma, que por sua vez, promove a conversão da pró-insulina em insulina, regulando a secreção desse hormônio (Folli et al., 2011) (Figura 4).

Figura 4 - Via de sinalização da insulina Pi3k/Akt em células beta pancreáticas



Legenda: Fisiologicamente, em período pós-prandial, a insulina se liga ao seu receptor na subunidade alfa, levando à fosforilação da subunidade beta de seu receptor de membrana. A fosforilação de resíduos de tirosina ativa IRS1 levando à fosforilação de Akt que conduz a transcrição de FOXO2 que por sua vez leva à transcrição de PDX1. Em períodos de jejum, Akt-p promove a transcrição de FOXO1, que inibe a transcrição de PDX1.

Fonte: A autora, 2015.

A obesidade induzida por dieta hiperlipídica é normalmente acompanhada pelo acúmulo de gordura ectópica (em órgãos e tecidos normalmente isentos de gordura) e consequente inibição da sinalização da via Pi3k/Akt, o que contribui para

o prejuízo da sinalização de insulina nas células beta-pancreáticas (McCurdy e Klemm, 2013).

As alterações morfológicas e funcionais que acontecem na deficiência de vitamina D são pouco conhecidas, mas algumas publicações já mostram alguns achados. Apenas a deficiência de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  é capaz de causar uma desorganização estrutural das ilhotas pancreáticas como remodelamento da ilhota e alterações das funções como resistência à insulina, intolerância à glicose e diminuição da expressão de proteínas da via Pi3k/Akt. (Cheng et al., 2013).

Estudos *in vitro* e *in vivo* mostram que a  $25(\text{OH})\text{D}_3$  pode regular a secreção de insulina em resposta à glicose, através da modulação da calbindina-D28k, uma proteína dependente de vitamina D, responsável pelo transporte de cálcio no citosol, modulando assim, o influxo intracelular desse mineral pelos canais de cálcio presentes na membrana basal (Billaudel et al., 1995; Maestro et al., 2000); (Zheng et al., 2004). Essa ação da vitamina D sobre os canais de cálcio influencia também, a secreção de insulina, uma vez que a conversão de pró-insulina em insulina pelo retículo endoplasmático liso é modulada pelo cálcio (Billaudel et al., 1995; Faure-Dussert et al., 1997). Quando a  $25(\text{OH})\text{D}_3$  está em baixa concentração plasmática, a liberação de insulina fica prejudicada (Zanatta et al., 2012; Thorn, 2015). Dentro deste contexto, a deficiência de vitamina D pode ser considerada mais um fator de risco independente para o desenvolvimento do DM2 (Kayaniyil et al., 2011).

De fato, estudos envolvendo a deficiência de vitamina D sobre a via de ativação da insulina Pi3K/Akt mostram diminuição da expressão de algumas proteínas como PDX1, GLUT2 e Akt e aumento da expressão de FOXO1 (Cheng et al., 2013) (Figura 4). A diminuição da liberação normal de insulina pode ser compensada pela ativação da via da proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK), uma via alternativa, capaz de restaurar a secreção de insulina na deficiência de vitamina D (Bourlon et al., 1997).

A ativação da sinalização de Pi3k dependente de insulina leva à ativação do AMPK, uma importante via de sinalização nas células beta. A via AMPK atua como um sensor do estado de energia celular que é conservada em todas as células eucarióticas e ativada pelo aumento da razão AMP:ATP (monofosfato de adenosina:trifosfato de adenosina) causada por estresse metabólico que interfere na produção de ATP (por exemplo, privação de glicose ou oxigênio) (Towler e Hardie, 2007). Trabalhos experimentais mostram que camundongos alimentados com dieta



hiperlipídica, tem diminuição da produção de AMP nas células beta pancreáticas e inibição da via AMPK (Walz, 2006). Porém, em camundongos deficientes em vitamina D, a baixa taxa de secreção de insulina pode ser restaurada com a ativação da via AMPK nas células beta, promovendo a melhora da sensibilidade a este hormônio, apenas com o aumento da razão de ATP:AMP (Bourlon *et al.*, 1997). Em relação ao papel da 25(OH)D<sub>3</sub> sobre a secreção e ação de insulina, estudos clínicos indicam que a vitamina D melhora a sensibilidade à insulina (Teegarden e Donkin, 2009).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Gerais

Avaliar os efeitos da deficiência de vitamina D, função do pâncreas endócrino e metabolismo de carboidratos nos animais que receberam dieta hiperlipídica com restrição de vitamina D.

### 2.2 Específicos

- a) Avaliar a evolução da massa corporal, ingestão alimentar, tolerância à glicose e resistência à insulina nos camundongos;
- b) Comprovar a deficiência de 25(OH)D<sub>3</sub> nos animais que receberam dieta sem vitamina D;
- c) Avaliar o perfil de hormônios relacionados com o metabolismo dos carboidratos como insulina e glucagon; adipocinas como leptina e adiponectina após a deficiência de vitamina D;
- d) Avaliar nas ilhotas pancreáticas, a distribuição, a massa e a função de células alfa/beta após a deficiência de vitamina D;
- e) Avaliar a expressão proteica de fatores de transcrição envolvidos na função de insulina como possível mecanismo para o desenvolvimento do DM2 neste modelo experimental.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Animais e Dieta

Todos os procedimentos experimentais realizados seguiram as normas estabelecidas pelo guia convencional para a experimentação com animais (Publicação NIH N<sup>o</sup>. 85-23, revisado em 1996).

Os animais utilizados foram provenientes do biotério central da Universidade Federal Fluminense (UFF), Niterói, Rio de Janeiro e o protocolo de experimentação de número CEUA/038/2013 foi aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto de Biologia Alberto Alcântara Gomes (IBRAG).

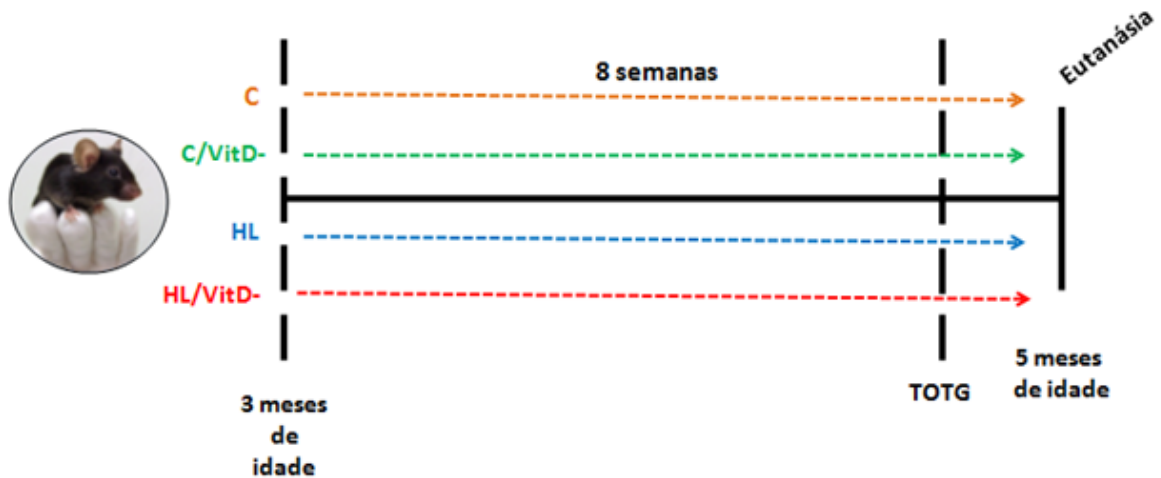
Camundongos machos, adultos, da linhagem C57BL/6 foram alocados no biotério do Laboratório de Morfologia, Metabolismo e Doença Cardiovascular (LMMC) e mantidos em gaiolas ventiladas e esterilizadas com fluxo de ar unidirecional e constante (Nexgen system, Allentown Inc., PA, EUA), em condições controladas de temperatura ( $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e umidade ( $57\pm 10\%$ ).

Os animais foram submetidos a ciclos de 12/12h claro-escuro e livre acesso à comida e água. Os animais foram separados aleatoriamente aos três meses de idade em quatro grupos com um número de 15 animais em cada grupo. Dos 15 animais de cada grupo, cinco foram usados para técnicas de análise morfológica e estereológica e 10 foram usados para a técnica de western blotting (Figura 5).

Os animais foram separados aleatoriamente nos seguintes grupos nutricionais:

- a) Grupo controle com dieta padrão AIN-93M: **C**
- b) Grupo dieta AIN-93M hiperlipídica com banha de porco: **HL**
- c) Grupo com dieta padrão AIN-93M sem vitamina D: **C/VitD-**
- d) Grupo dieta AIN-93M hiperlipídica com banha de porco sem vitamina D: **HL/VitD-**

Figura 5 - Desenho experimental



Legenda: Aos 3 meses de idade os animais receberam a dieta experimental durante 8 semanas, na sétima semana foi realizado o TOTG e aos 5 meses de idade (8 semanas) sofreram eutanásia.

Fonte: A autora, 2015.

O grupo controle (C) recebeu dieta padrão própria para roedores, segundo os critérios da “*American Institute of Nutrition*” (AIN 93M) (Reeves et al., 1993) com 10% da energia total proveniente dos lipídios. O grupo hiperlipídica (HL) recebeu dieta AIN-93M hiperlipídica, com acréscimo de banha de porco e veiculou 50% da energia total proveniente dos lipídios; o grupo com dieta controle sem vitamina D, recebeu dieta padrão AIN-93M sem vitamina D (C/VitD-), com 10% da energia total proveniente dos lipídios e sem vitamina D na formulação da dieta. O grupo com dieta hiperlipídica sem vitamina D recebeu dieta AIN-93M com acréscimo de banha de porco e sem vitamina D (HL/VitD-) veiculou 50% da energia total proveniente de lipídios. Todas as dietas experimentais tinham o mesmo conteúdo de proteínas e o incremento do percentual lipídico das dietas HL e HL/VitD- foi compensado pela diminuição de hidratos de carbono.

Diariamente as dietas eram ofertadas aos animais e, caso houvesse sobras, essas eram desprezadas. O aporte de minerais e das demais vitaminas (exceto a vitamina D) foi idêntico para as quatro dietas (Reeves et al., 1993). As dietas foram oferecidas dos 3 aos 5 meses de idade (em um total de 8 semanas de experimento que é um tempo suficiente para estabelecer um estado de deficiência de vitamina D). As dietas foram confeccionadas pela empresa PragSoluções (Jau, SP, Brasil) (Tabela 1).

Tabela 1 - Composição das dietas segundo recomendação da AIN-93M

<b>Nutrientes (g/Kg)</b>	<b>C</b>	<b>HL</b>	<b>CvitD-</b>	<b>HLVitD-</b>
Caseína	140	175	140	175
Amido de milho	619,7	347,7	619,7	347,7
Sacarose	100	100	100	100
Óleo de soja	40	40	40	40
Banha de porco	-	238	-	238
Fibra	50	50	50	50
L-Cistina	1,8	1,8	1,8	1,8
Colina	2,5	2,5	2,5	2,5
Antioxidante	1,0	1,0	1,0	1,0
Mistura de Minerais	35	35	35	35
Mistura de Vitaminas	10	10	10	10
Vitamina D (IU/Kg) *	1000	1000	0,0	0,0
Total de gramas	1000	1000	1000	1000
Energia (Kcal/Kg)	3.800	5.000	3.800	5.000
Energia (KJ/Kg)	15.960	21.000	15.960	21.000
Carboidrato (% Energia)	76	36	76	36
Proteína (% Energia)	14	14	14	14
Lipídios (% Energia)	10	50	10	50

Legenda: **C**, dieta controle; **HL**, dieta hiperlipídica; **CvitD-**, dieta controle sem vitamina D e **HLVitD-**, dieta hiperlipídica sem vitamina D. \*(vitamina D3 contida na mistura de vitaminas).

Fonte: A autora, 2015.

### **3.2 Massa Corporal e Ingestão Alimentar**

A massa corporal (em gramas) dos camundongos foi aferida semanalmente por meio de uma balança digital de precisão (Marte A-1500). A ingestão alimentar (em gramas) foi avaliada diariamente, sempre no mesmo horário, entre 11h e 13h. O resto/ingestão dos animais foi avaliado mediante subtração entre a quantidade total de ração ofertada e a quantidade remanescente na caixa. A ingestão energética foi calculada pela ingestão de ração (g/dia), multiplicada pela energia da ração em kilocalorias e convertido para kilojoules (medida padrão de energia).

### **3.3 Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG)**

Na semana anterior à eutanásia foi realizado o teste oral de tolerância à glicose (TOTG). Os camundongos ficaram em jejum durante 6 horas e depois foi administrada, por uma cânula de gavagem orogástrica, solução de glicose a 25% na dose de 1g de glicose/Kg de massa corporal. Depois, amostras de sangue foram coletadas da veia caudal por ordenha e a glicemia foi aferida no tempo zero (jejum) e sequencialmente nos tempos 15, 30, 60 e 120 minutos após a sobrecarga de glicose.

As concentrações de glicemia plasmática foram verificadas com o auxílio de um glicosímetro (Accu-Chek performa, Roche, Mannheim, Alemanha). Para a avaliação da intolerância à glicose foi considerada a área sob a curva (AUC), mensurada a partir da utilização do software Prisma (Prism version 6.05 for Windows, GraphPad Software, La Jolla CA, EUA).

### 3.4 Eutanásia e Preparo do Material

Após as oito semanas do protocolo experimental, a eutanásia foi realizada aos cinco meses de idade. Após 6 horas de jejum, os animais foram profundamente anestesiados com injeção intraperitoneal de pentobarbital sódico (150mg/kg) com incisão mediana na região torácica para exposição do coração. A coleta de sangue ocorreu através de punção cardíaca no átrio direito. O sangue foi armazenado em tubos de ensaio e após a centrifugação (120g por 15 min), o plasma foi congelado em freezer -80°C para posteriores análises.

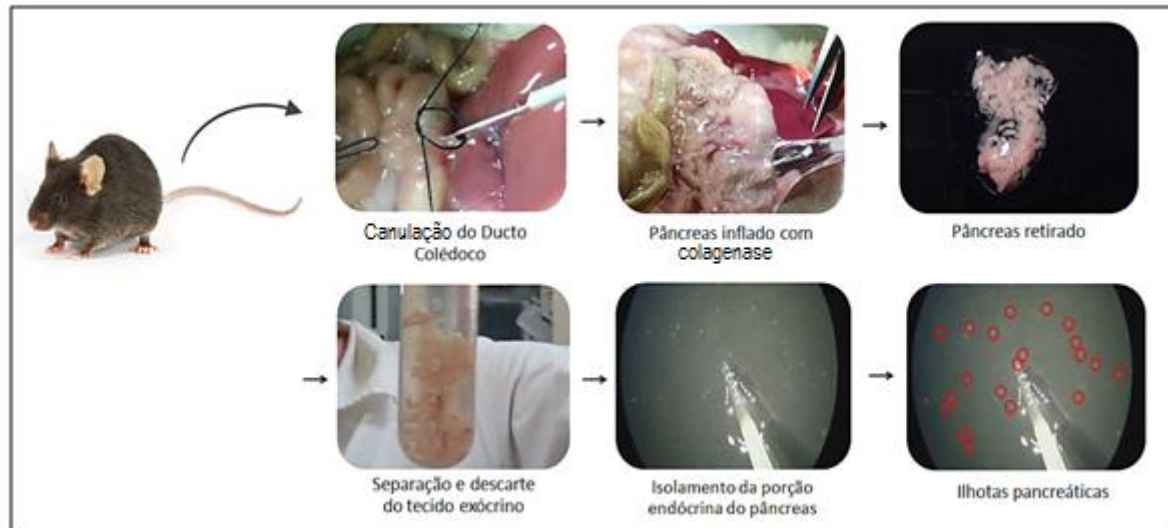
Em seguida, os animais separados aleatoriamente para a análise de microscopia de luz (n=5), tiveram o pâncreas cuidadosamente dissecado, pesado e fixado com formaldeído 4% a 0,1M em solução tampão fosfato pH 7,2 por 48 horas em temperatura ambiente. Após a fixação, o pâncreas foi processado para técnicas histológicas com sucessivas lavagens em água, soluções crescentes de álcool e incluído em *Paraplast Plus* (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA). Os blocos foram seccionados em cortes seriados com 10 µm de espessura para futuras análises.

Nos animais utilizados para análise de *Western blotting* (n=10) fez-se a digestão das ilhotas por colagenase (Lacy e Kostianovsky, 1967). No sacrifício, após incisão abdominal, o fígado foi rebatido para expor a vesícula biliar. O ducto colédoco foi localizado e suas porções cranial (fígado e vesícula biliar) e caudal (duodeno) foram amarradas para evitar a saída de solução de colagenase. Introduziu-se uma cânula no interior do ducto colédoco para que o pâncreas pudesse ser inflado com solução de *Hanks* (suplementado com albumina sérica bovina – BSA 1,0 mg/mL) contendo 0,8 mg/mL de colagenase (C9263, Sigma Aldrich, St. Louis, EUA). O pâncreas então foi removido, colocado em tubo *Falcon* e incubado em banho-maria com água a 37°C por 15 minutos para permitir a digestão do tecido exócrino, com preservação do tecido endócrino.

Os tubos foram então, agitados vigorosamente durante cerca de 20 segundos para permitir a digestão da parte exócrina do pâncreas pela colagenase. Após esse tempo, a digestão foi imediatamente interrompida pela adição de Solução de *Hanks* a 4°C seguida por mais três lavagens com a mesma solução para a eliminação do tecido digerido. As ilhotas pancreáticas, preservadas pela digestão com colagenase,

foram então recolhidas (isoladas) manualmente sob um estereomicroscópio (Luxeo 4D StereoZoom Microscópio Labomed, CA, EUA) com uma pipeta eletrônica e imediatamente congeladas em freezer -80°C (Figura 6).

Figura 6 - Isolamento das ilhotas pancreáticas pelo método da colagenase



Legenda: Foi introduzida uma cânula no interior do ducto biliar para que o pâncreas pudesse ser inflado com solução de Hanks suplementada com BSA. O pâncreas então foi removido, colocado em tubo *Falcon* e incubado para permitir a digestão do tecido exócrino, seguida por sucessivas lavagens para a eliminação do tecido digerido. As ilhotas pancreáticas, preservadas pela digestão com colagenase, foram então isoladas e recolhidas.

Fonte: A autora, 2015.

### 3.5 Análise das concentrações de insulina e HOMA-IR

A glicemia de jejum foi determinada no momento da eutanásia em que houve a coleta de sangue através da punção cardíaca no átrio direito. Para avaliar a glicemia de jejum foi utilizado um glicosímetro (Accu-chek performa, Roche, Mannheim, Alemanha).

Foi calculado o HOMA-IR (*Homeostasis Model Assessment*) para avaliar resistência à insulina. O HOMA-IR foi calculado com os valores da glicemia de jejum e da insulina sérica, utilizando a fórmula (Matthews et al., 1985):

$$\text{HOMA-IR} = (\text{insulina em jejum} \times \text{glicose}) / 22,5 \quad (1)$$



### 3.6 Análise Bioquímica

As amostras de plasma congeladas em temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  foram utilizadas na dosagem bioquímica por *kits* de ELISA para insulina, glucagon, leptina e adiponectina utilizando os *kits* #EZRMI-13K, #EZGLU-30K, #EZML-82K, #EZMADP-60K (Millipore, Darmstadt, Alemanha), respectivamente. Para a dosagem em duplicata da  $25(\text{OH})\text{D}_3$  foi utilizado o *kit* AC-57F1 IDS-EIA (Immunodiagnostic-Systems, Boldon, Reino Unido).

### 3.7 Análise do pâncreas

#### 3.7.1 Estereologia do pâncreas

##### 3.7.1.1 Área seccional média da ilhota

Para a análise da área média de ilhotas pancreáticas, foram selecionadas lâminas com secções do pâncreas, com cortes nos intervalos de  $100\mu\text{m}$  nos grupos que receberam dieta controle e com intervalos de  $240\mu\text{m}$  nos grupos que receberam dieta hiperlipídica. Os intervalos foram estabelecidos por testes prévios, respeitando o tamanho médio da ilhota nos respectivos grupos, de modo que o intervalo entre dois cortes não apresentasse uma mesma ilhota. As lâminas foram coradas com Hematoxilina-Eosina. A análise da área média foi realizada com o auxílio do *software STEPanizer* e foi utilizada uma grade contendo 64 pontos (Tschanz *et al.*, 2011). A área seccional média da ilhota ( $A_{\text{sec}}$ ) foi estimada através da seguinte fórmula:

$$A[\text{ilhota}] = V_V/2.Q_A \quad (2)$$

Sendo  $V_V$  a densidade de volume da ilhota, explicado logo abaixo e o número de estruturas (ilhas) por área teste ( $Q_A$ ) uma relação entre número de ilhotas contidas na área do sistema teste (Nyengaard, 1999).

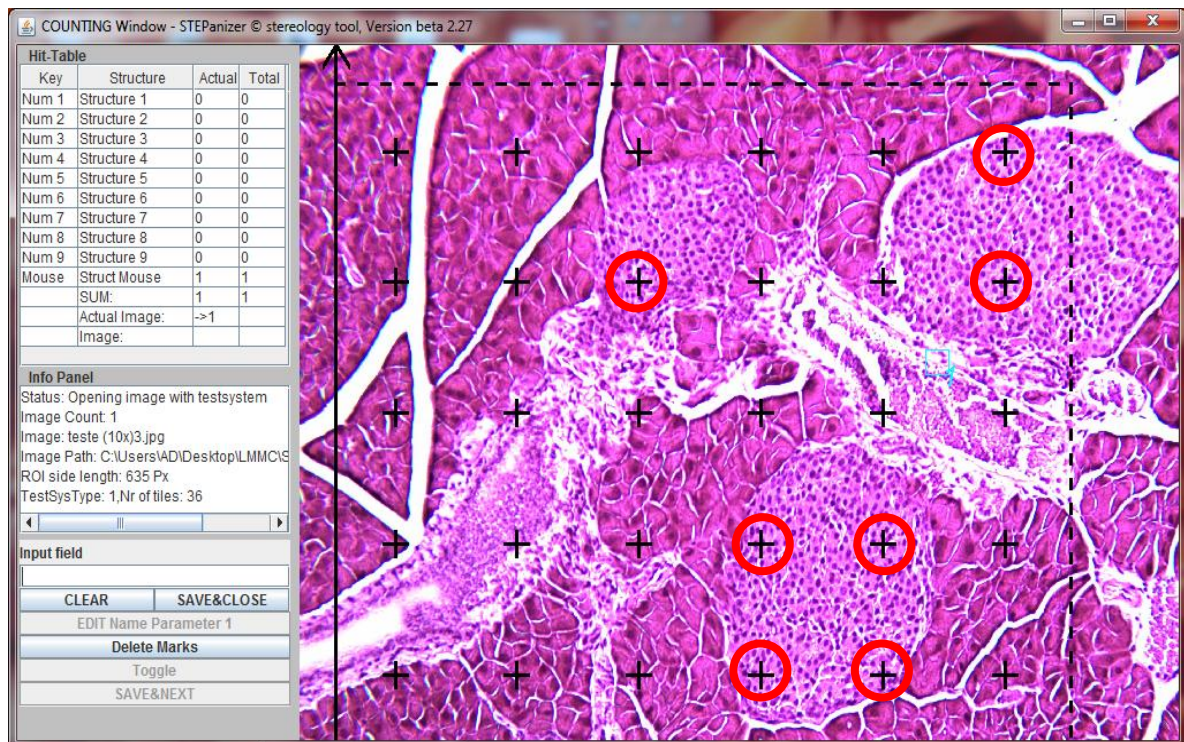
### 3.7.1.2 Densidade de volume de ilhota e massa de ilhota pancreática

A densidade de volume das ilhotas pancreáticas ( $V_v$ ) foi analisada com o auxílio do *software STEPanizer* através da razão entre os pontos parciais que tocavam a ilhota em relação aos pontos totais:

$$V_v [\text{ilhota}] = P_p[\text{ilhota}]/P_T (\%) \quad (3)$$

Onde  $P_p$  refere-se ao número de pontos que tocavam a estrutura analisada (pontos parciais) e  $P_T$  é o número de pontos totais do sistema-teste de 64 pontos; a massa de ilhota pancreática ( $M[\text{ilhota}]$ ) foi obtida através do produto do  $V_v$  [ilhota] pela massa do pâncreas ( $MP$ ) (Mandarim-de-Lacerda, 2003) (Figura 7).

Figura 7 - Densidade de volume das ilhotas pancreáticas dos grupos estudados



Legenda: A densidade de volume das ilhotas pancreáticas ( $V_v$ ) foi analisada com o auxílio do software STEPanizer através da razão entre os pontos parciais que tocam a ilhota em relação aos pontos totais:  $V_v [\text{ilhota}] = P_p [\text{ilhota}] / P_T (\%)$ , onde  $P_p$  refere-se ao número de pontos que tocavam a estrutura analisada (pontos parciais) e  $P_T$  é o número de pontos totais do sistema-teste.

Fonte: A autora, 2015.

### 3.8 Imunohistoquímica

A técnica de imunohistoquímica foi realizada com a marcação da expressão de insulina e glucagon em ilhotas pancreáticas. Após a desparafinização dos cortes em lâminas silanizadas, a recuperação antigênica foi realizada com tampão citrato (60°C, pH 6,0 por 30 minutos) a fim de facilitar a localização de proteínas intracelulares. Logo após, a atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com 0,3% de peróxido de hidrogênio em tampão fosfato salino (PBS).

A seguir, os cortes foram incubados durante a noite em câmara úmida, com anticorpos anti-insulina (ab7842, Abcam), e anti-glucagon (ab1846, Abcam), na diluição de 1:100. As reações foram amplificadas com um complexo de biotina-estreptavidina, seguido por incubação com anticorpos secundários biotinilados e

conjugados ao complexo estreptavidina-peroxidase (Histostain Plus Kit, Invitrogen, CA, USA). Os cortes foram lavados em solução PBS e em seguida as reações foram reveladas com o cromógeno diaminobenzidina líquido (DAB) (HistostainPlus Kit, Invitrogen, CA, EUA) e contrastadas com Hematoxilina.

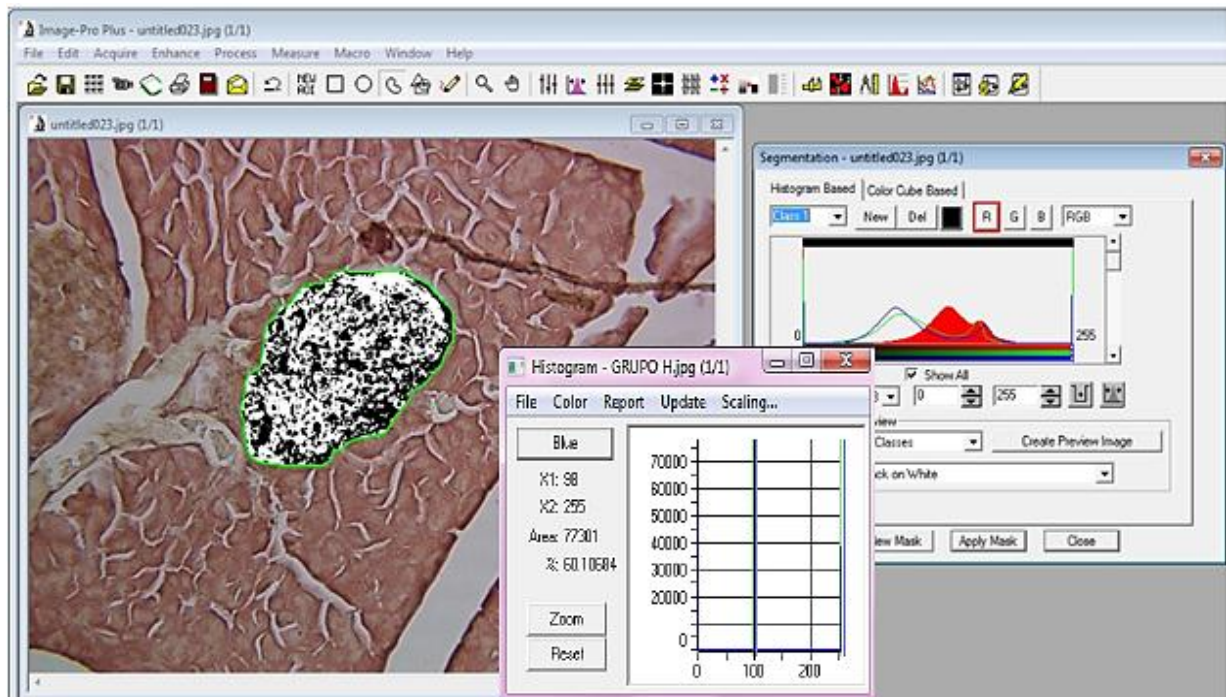
### 3.8.1 Densidade de volume e massa de células alfa pancreáticas

A densidade de volume de células alfa ( $V_v$  [células alfa]) foi calculada usando a área de segmentação glucagon-positivo das ilhotas, utilizando uma ferramenta do software *Image-Pro Plus* (versão 7.0, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) (Mandarim-de-Lacerda et al., 2010) usada para identificar áreas de imunorreatividade positiva. Primeiramente, a ilhota foi selecionada manualmente e segmentada em preto e branco, nas quais as áreas imunorreativas eram marcadas em branco e o tecido remanescente, em preto. A área ocupada pela marcação em branco foi então quantificada com o auxílio de um histograma (Mandarim-de-Lacerda et al., 2010). Dessa forma, a massa de células alfa ( $M$  [célula alfa]) foi estimada como o produto de  $V_v$  [células alfa] pela massa da ilhota pancreática ( $M$  [ilhota]) (Frantz et al., 2011).

### 3.8.2 Densidade de volume e massa de células beta pancreáticas

A densidade de volume das células beta ( $V_v$  [célula beta]), assim como a análise das células-alfa, foi estimada através da análise de imagem da área segmentada insulino-positiva na ilhota pancreática utilizando a ferramenta do software *Image-Pro Plus* (versão 7.0, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) (Mandarim-de-Lacerda et al., 2010). Da mesma forma que a massa de células alfa, a massa de células beta ( $M$  [célula beta]) foi estimada através do produto do  $V_v$  [célula beta] pela massa da ilhota pancreática ( $M$  [ilhota]) (Frantz et al., 2011).

Figura 8 - Segmentação de ilhota pancreática



Legenda: Obtem-se a densidade de volume de insulina. Após imunomarcção para insulina por imunofluorescência, 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, gerando um histograma com o percentual (%) imunorreativo.

Fonte: A autora, 2015.

### 3.9 Imunofluorescência

A técnica de imunofluorescência foi realizada para a dupla marcação da expressão de insulina e glucagon em ilhotas pancreáticas a fim de observar a distribuição das células alfa e beta pancreáticas. A recuperação antigênica com tampão citrato pH 6,0 e o triton X-100 0,5% foi usado para facilitar a localização de proteínas intracelulares. O bloqueio com cloreto de amônio e PBS foi realizado na sequência. Ligações inespecíficas de anticorpos policlonais foram bloqueadas com a incubação em PBS/BSA 5%. Após isto, os cortes foram incubados com os anticorpos primários anti-insulina (Ab7842, Abcam) e anti-glucagon (ab1846, Abcam) diluídos a 1:50 em tampão de bloqueio (PBS/BSA a 1%) e incubados durante a noite a 4°C. Os anticorpos secundários foram conjugados com o fluoróforo Alexa 546 e Alexa 488 (Invitrogen, Molecular Probes, Carlsbad, CA, EUA), ambos diluídos a 1:50

em PBS/BSA a 1% e as lâminas foram montadas com slow-fade (Invitrogen, Molecular Probes, Carlsbad, CA, EUA), a fim de manter a fluorescência. Os controles negativos foram obtidos pela omissão dos anticorpos primários. Para a análise foi utilizado o Sistema Confocal Laser Scanning Nikon (modelo C2, EUA) (formato TIFF, cor de 24 bits, 512x512 pixels).

### 3.10 *Western Blotting*

Aproximadamente 250 ilhotas pancreáticas dos animais de cada grupo foram isoladas. Para a extração, foram adicionados às ilhotas os inibidores de proteases e fosfatases, homogeneizadas e centrifugadas (10.000g durante 10 minutos a 4°C). Após esta etapa, foi realizada a separação do sobrenadante com frações lipídicas e restos do homogenato. A quantidade de proteína total das ilhotas foi quantificada utilizando-se o kit BCA Protein Assay (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) para a leitura em placa de ELISA. Após, foi adicionado o tampão de amostra. As proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (8-10% dependendo do peso molecular das proteínas analisadas, SDS-PAGE), e transferidas para uma membrana de PVDF (Hybond-P GE Healthcare Life Sciences, Amersham Place, LC, Reino Unido), incubadas durante toda a noite a 4°C com anticorpo primário diluído em tampão salina com Tris (TBS-T [20 mmol/L de Tris/HCl (pH 7,4) e 500 mmol/L de NaCl] e 3% de BSA (albumina bovina sérica, peso/volume) para o bloqueio de marcações inespecíficas.

Os anticorpos primários usados foram: IRS1 (anti-coelho, SC579; Invitrogen; 1:500), IRS2 (anti-coelho, SC8299; Santa Cruz Biotechnology; 1:500), Pi3k (anti-coelho, SC67306; Santa Cruz Biotechnology; 1:500), Akt/PKB (anti-coelho, 44-609G; Invitrogen; 1:500), p-Akt<sup>Ser473</sup> (anti-coelho, 44-621G; Biosource; 1:500), PDX1 (anti-coelho, AB3503; Chemicon; 1:500), FOXO1 (anti-coelho, SAB4300410; Sigma-Aldrich; 1:500), GLUT2 (anti-coelho, ab95256; Abcam; 1:500).

Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário com 5% (peso/volume) de leite em pó desnatado durante uma hora em temperatura ambiente. As membranas foram então reveladas usando um sistema de detecção de quimiluminescência com ECL e as imagens das bandas foram obtidas com o

sistema ChemiDoc XRS de imagens moleculares (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). Para a análise da expressão das proteínas, a intensidade das bandas quimioluminescentes foi quantificada utilizando o *software ImageJ*, versão 1.44 (NIH, [imagej.nih.gov/ij](http://imagej.nih.gov/ij), EUA). Após esta etapa, os anticorpos foram retirados das membranas por solução *stripping* e remarcados com beta-actina (anti-camundongo, SC81178, Santa Cruz Biotecnologia, 1:1000), como proteína constitutiva para normalizar os dados obtidos, exceto para p-Akt que foi corrigida pela Akt total.

### 3.11 Análise estatística

Os dados foram expressos como média e desvio padrão (DP). Inicialmente, foram testados quanto à normalidade e homocedasticidade das variâncias pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. A análise de variância (ANOVA) de um fator (*One-way*) foi realizada seguida pelo pós-teste de Holm-Sidak. *One-way* ANOVA com medidas repetidas foi realizada para analisar a evolução da massa corporal e os diferentes tempos do TOTG. ANOVA de dois fatores (*Two-way* ANOVA) foi feita para avaliar a influência do fator dieta hiperlipídica ou do fator restrição de vitamina D. O nível de significância de  $P < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo (GraphPad Prism version 6.05 para Windows, GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA).

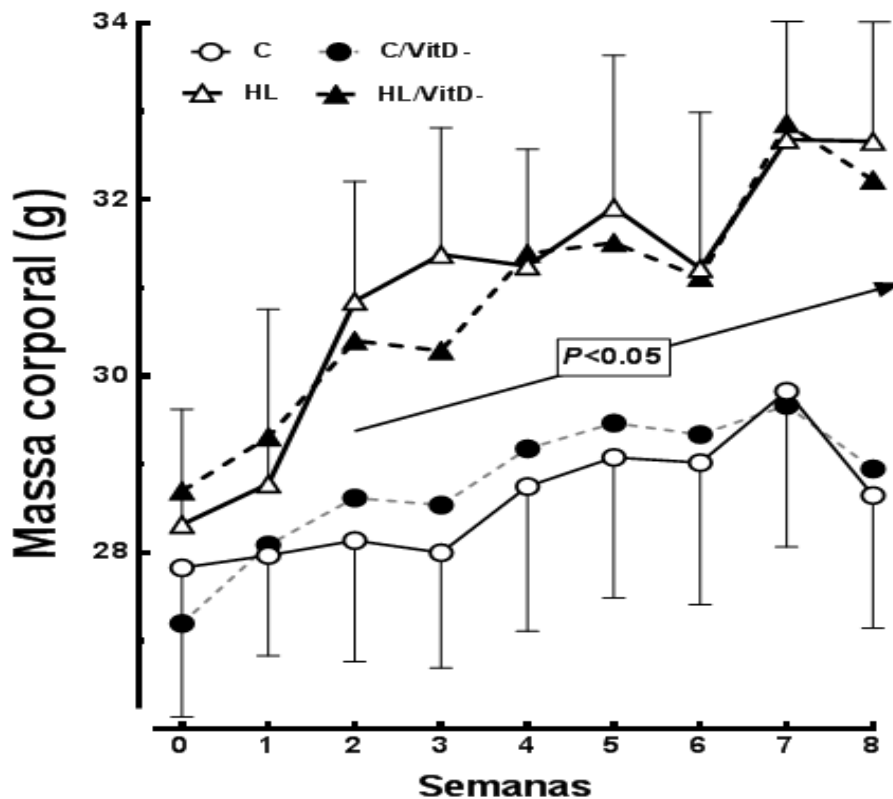
## 4 RESULTADOS

### 4.1 Massa Corporal e Ingestão Alimentar

Os animais dos quatro grupos estudados (C, C/VitD-, HL e HL/VitD-) começaram o experimento sem diferença estatística na massa corporal. Após duas semanas de ingestão da dieta hiperlipídica, os grupos HL (+10%,  $P<0,0001$ ) e HL/VitD- (+6%,  $P=0,004$ ) apresentaram aumento da massa corporal, tornando-se mais pesados que os grupos que receberam as dietas controle, grupos C e C/VitD-, respectivamente. Esse incremento da massa corporal nos grupos que receberam dieta hiperlipídica, foi observado durante todo o experimento e a partir da segunda semana essa diferença foi considerada estatisticamente significativa quando comparadas com os respectivos grupos controles (+10%,  $P<0,0001$  no grupo HL e +6%,  $P<0,005$  no grupo HL/VitD-) (Figura 9). Após as oito semanas de experimento, os grupos HL e HL/VitD- ficaram significativamente mais pesados que os grupos controles (+14% no grupo HL,  $P<0,0001$ ; +12% no grupo HL/VitD-,  $P<0,0001$ ) (Figura 9).



Figura 9 - Evolução da massa corporal dos animais no período estudado



Legenda: Os dados estão dispostos como média e DP (n=15). Dados analisados por ANOVA de um fator e pós-teste de Holm-Sidak.  $P < 0,05$ . Abreviaturas - C: dieta controle, C/VitD-: dieta controle sem vitamina D, HL: dieta hiperlipídica e HL/VitD-: dieta hiperlipídica sem vitamina D.

Fonte: A autora, 2015.

Os animais dos diferentes grupos não apresentaram diferença estatística na ingestão alimentar em gramas durante todo o período de experimento. Em relação à ingestão energética, ambos os grupos que receberam dieta hiperlipídica (HL e HL/VitD-) consumiram mais energia quando comparados aos grupos que ingeriram dieta controle (C e C/VitD-).

A diferença na ingestão de energia pelo grupo HL foi estatisticamente significativa comparada ao grupo C (+27%,  $P < 0,0001$ ), assim como o grupo HL/VitD- quando comparado ao grupo C/VitD- (+26%,  $P < 0,0001$ ), conforme dados apresentados na Tabela 2. O aumento na ingestão de energia foi esperado, pois reflete a maior densidade energética da dieta hiperlipídica em comparação com a dieta controle. Pelo teste do ANOVA de dois fatores, apenas a dieta hiperlipídica

mostrou influência sobre a massa corporal e a ingestão energética (*Two-way ANOVA*,  $P < 0,0001$ ).

#### 4.2 Glicose em jejum e HOMA-IR

Em relação à glicemia de jejum, os grupos que receberam dieta hiperlipídica HL e HL/VitD- tiveram valores maiores que os seus respectivos controles, tanto no grupo C (+30%,  $P < 0,05$ ), quanto no grupo C/VitD- (+45%,  $P < 0,001$ ) (Tabela 2). Houve resistência à insulina nos grupos que receberam dieta hiperlipídica quando comparados aos grupos que receberam dieta controle (+245%,  $P < 0,001$  no grupo HL e +250%,  $P < 0,0001$  no grupo HL/VitD-). O grupo HL/VitD- apresentou um aumento ainda mais acentuado deste valor, sugerindo que a deficiência de vitamina D pode potencializar o efeito da resistência à insulina (+42%,  $P < 0,05$ ) (Tabela 2).

Tabela 2 – Padrão alimentar, metabolismo glicídico e dosagem hormonal dos grupos do experimento

Dados	C	HL	C/VitD-	HL/VitD-
Ingestão alimentar (g/dia)	3,0±0,2	2,9±0,2	3,0±0,2	2,9±0,2
Ingestão energética (kJ/dia)	47,3±3,2	60,1±4,5 <sup>†</sup>	47,3±3,7	59,8±3,5 <sup>†</sup>
Glicose de jejum (mmol/L)	6,6±0,5	8,5±1,2 <sup>†</sup>	6,0±0,9	8,6±1,0 <sup>†</sup>
HOMA-IR	2,5±0,6	11,2±3,4 <sup>†</sup>	4,6±2,9	15,9±2,7 <sup>†‡</sup>
TOTG (x10 <sup>-3</sup> ASC, u.a)	16,1±1,3	19,7±2,1 <sup>†</sup>	16,2±1,7	21,6±1,7 <sup>†</sup>
Insulina (pg/mL)	304,4±51,1	1117,0±272,5 <sup>†</sup>	381,9±208,8	1468,0±130,8 <sup>†‡</sup>
Leptina (10 <sup>6</sup> pg/mL)	1,2±0,6	5,5±4,1 <sup>†</sup>	2,1±0,7	12,6±2,0 <sup>†‡</sup>
Glucagon (pg/mL)	15,8±0,9	18,4±2,2	15,9±1,2	18,0±2,3
Adiponectina (10 <sup>6</sup> pg/mL)	5,8±0,9	3,4±0,8 <sup>†</sup>	4,8±1,2	3,2±0,5 <sup>†</sup>

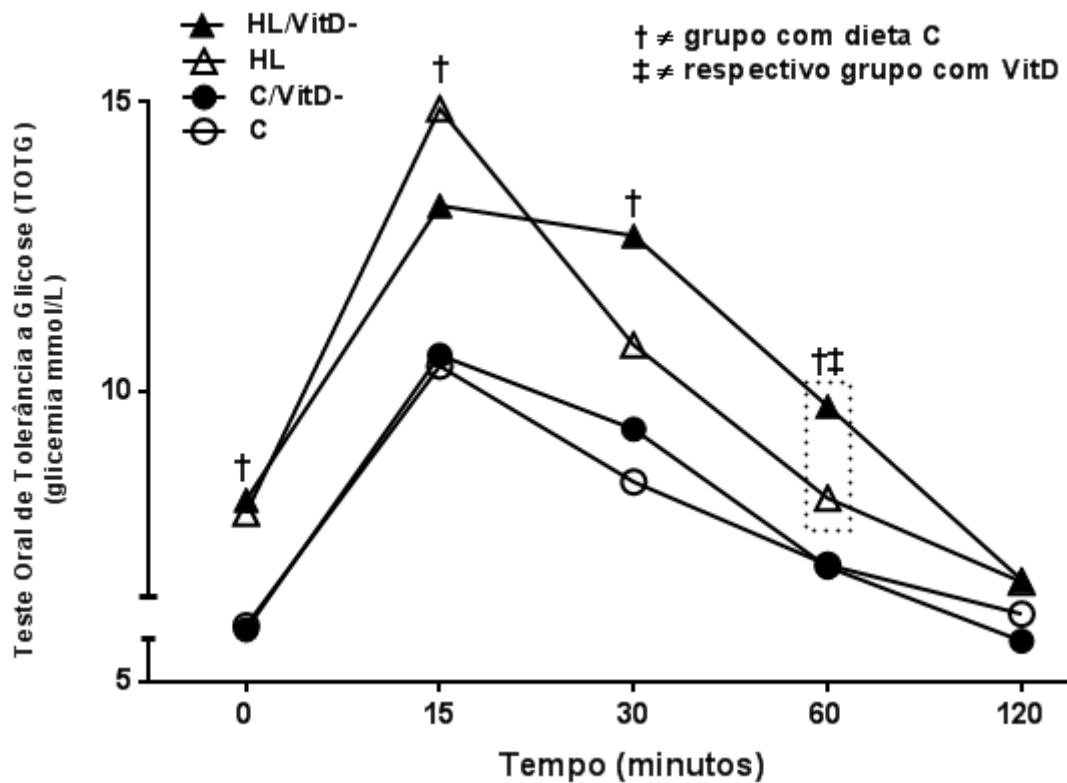
Legenda: Os dados estão expressos como media e desvio padrão. ANOVA de um fator com pós-teste de Holm-Sidak (n=15). Abreviações: C: dieta padrão, HL: dieta hiperlipídica, C/VitD-: dieta padrão sem vitamina D e HL/VitD-: dieta hiperlipídica sem vitamina D; TOTG: teste oral de tolerância à glicose, ASC: Área sob a curva, HOMA-IR: *homeostasis model assessment for insulin resistance index*. Valores com esse símbolo foram considerados estatisticamente significativos ( $P=0,05$ ): † comparado com o respectivo grupo com dieta controle; ‡ comparado com o respectivo grupo com vitamina D.

Fonte: A autora, 2015.

### 4.3 TOTG e Área sob a curva

O resultado do TOTG mostra que os animais dos grupos que receberam dieta hiperlipídica nos tempos 0, 15, 30 e 60 minutos apresentaram aumento significativo da glicemia quando comparados com os grupos que receberam dieta controle ( $P < 0,05$ ). O grupo HL apresentou glicemia aumentada e esse aumento foi significativo no tempo de 15 minutos quando comparada com o seu respectivo controle (+42%,  $P < 0,05$ ). O grupo HL/VitD-, além de apresentar valores maiores quando comparado com o seu controle C/VitD-, apresentou também um platô no reestabelecimento da glicemia entre os tempos 15 e 30 minutos (Figura 10). Ambos os grupos que receberam dieta hiperlipídica, HL e HL/VitD-, apresentaram maior valor da área sobre a curva (ASC) que os grupos que receberam dieta controle, sendo esta diferença significativa, tanto entre os grupos que consumiram vitamina D (+22%,  $P < 0,05$ ), quanto entre os grupos sem vitamina D- (+33%,  $P < 0,0001$ ), caracterizando um quadro de intolerância à glicose nesses grupos. Apenas a dieta hiperlipídica influenciou esse resultado (Two-way ANOVA,  $P < 0,0001$ ) (Tabela 2).

Figura 10 – Curva do TOTG dos diferentes grupos estudados



Legenda: Os dados estão dispostos como média e DP (n=6). Dados analisados por ANOVA de medidas repetidas e pós-teste de Holm-Sidak.  $P < 0,05$  quando: (†) comparado com o grupo com dieta controle, (‡) comparado com o respectivo grupo com Vitamina D. Abreviaturas - C: dieta controle, C/VitD-: dieta controle sem vitamina D, HL: dieta hiperlipídica e HL/VitD-: dieta hiperlipídica sem vitamina D.

Fonte: A autora, 2015.

#### 4.4 Dosagem hormonal

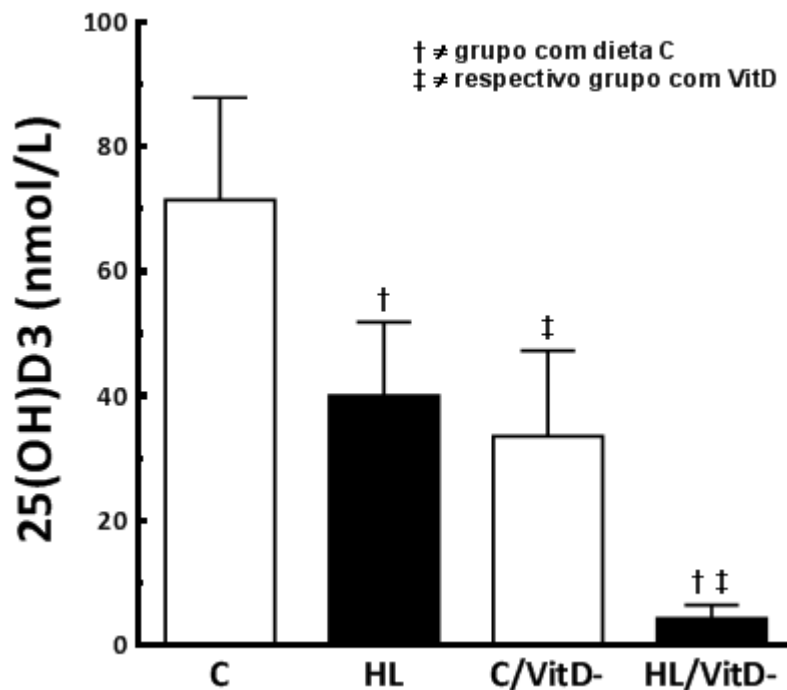
Os níveis plasmáticos de insulina de jejum foram maiores nos grupos HL e HL/VitD- do que nos grupos C e C/VitD- (+267%,  $P < 0,0001$ ; +310%  $P < 0,0001$ , respectivamente). Vale ressaltar que os níveis plasmáticos de insulina foram maiores no grupo HL/VitD- do que no grupo HL (+40%,  $P = 0,04$ ; Tabela 2). Assim como os níveis plasmáticos de insulina, a leptina plasmática também foi aumentada no grupo HL/VitD- quando comparado com o grupo HF (+126%,  $P = 0,0002$ ; Tabela 2). A leptina também estava aumentada no grupo HL quando comparada com o grupo C

(+359%,  $P=0,04$ ) e aumentada no grupo HL/VitD- quando comparado ao grupo C/VitD- (+489%,  $P=0,0001$ ).

Os níveis plasmáticos de adiponectina foram reduzidos nos grupos HL (-41%,  $P=0,02$ ) e HL/VitD- (-33%,  $P=0,03$ ) quando os grupos C e C/VitD-. Entre os grupos C e C/VitD- não houve diferença estatística. Também não houve diferença estatística entre os grupos HL e HL/VitD-. Os valores do glucagon não foram diferentes entre os grupos estudados.

Os níveis plasmáticos de 25(OH)D<sub>3</sub> foram menores nos grupos HL e HL/VitD- quando comparados com seus respectivos grupos C e C/VitD- (-54% no grupo HL,  $P=0,009$  e -88% no grupo HL/VitD-,  $P=0,03$ ). Interessante perceber que a obesidade induzida por dieta contribuiu para os níveis diminuídos de 25(OH)D<sub>3</sub> mesmo na dieta sem a restrição desta vitamina. Os valores de 25(OH)D<sub>3</sub> foram diminuídos nos grupos sem vitamina D, grupos C/VitD- e HL/VitD-, quando comparados aos seus respectivos grupos com vitamina D (-53% no grupo C/VitD-,  $P=0,0006$  e -87% no grupo HF/VitD-,  $P=0,001$ ) (Figura 11).

Tanto a dieta hiperlipídica quanto a deficiência de vitamina D foram fatores independentes significativos na avaliação destes parâmetros hormonais. A dieta HL influenciou os valores da insulina plasmática ( $P<0,0001$ ), do glucagon ( $P=0,01$ ), da leptina ( $P<0,0001$ ), da 25(OH)D<sub>3</sub> ( $P<0,0001$ ) e da adiponectina plasmática ( $P<0,0001$ ). A deficiência de vitamina D exerceu influência sobre os níveis de leptina ( $P=0,0009$ ), insulina ( $P<0,01$ ), adiponectina ( $P<0,01$ ) e da 25(OH)D<sub>3</sub> ( $P<0,0001$ ). Além disso, existiu uma interação entre a dieta HL e a deficiência de vitamina D, afetando os níveis de leptina (*Two-way ANOVA*,  $P=0,007$ ).

Figura 11 - Dosagem plasmática de 25(OH)D<sub>3</sub>

Legenda: Os dados estão dispostos como média e DP (n=6). Dados analisados por ANOVA de um fator e pós-teste de Holm-Sidak.  $P < 0,05$  quando: (†) comparado com o grupo com dieta controle, (‡) comparado com o respectivo grupo com Vitamina D. Abreviaturas - C: dieta controle, C/VitD-: dieta controle sem vitamina D, HL: dieta hiperlipídica e HL/VitD-: dieta hiperlipídica sem vitamina D.

Fonte: A autora, 2015.

#### 4.5 Estereologia do pâncreas

A massa pancreática foi maior nos animais que receberam dieta hiperlipídica quando comparada aos que receberam dieta controle (+56%,  $P < 0,0001$  no grupo HL e +64%,  $P < 0,001$  no grupo HL/VitD-, respectivamente; Tabela 3). Não houve diferença entre a massa pancreática entre os grupos C e C/VitD- ou entre os grupos HL e HL/VitD-. Quanto ao pâncreas endócrino, a densidade de volume das ilhotas dos grupos que receberam dieta hiperlipídica com e sem vitamina D foi significativamente maior que as ilhotas dos animais dos grupos alimentados com dieta controle (+110%,  $P < 0,0001$  no grupo HL e +155%,  $P < 0,0001$  no grupo HL/VitD-, respectivamente; Tabela 3). Quanto à massa das ilhotas, os animais que

receberam dieta hiperlipídica tiveram um aumento quando comparada aos animais que receberam dieta controle (+232%,  $P<0,0001$  no grupo HL e +326%,  $P<0,001$  no grupo HL/VitD-, respectivamente; Tabela 3). Não houve diferença na massa das ilhotas entre os grupos C e C/VitD- ou entre os grupos HL e HL/VitD-.

Tabela 3 – Estereologia do pâncreas

Dados	C	HL	C/VitD-	HL/VitD-
Massa do pâncreas (mg)	138,7±18,5	217,1±34,7 <sup>†</sup>	117,0±11,2	191,3±4,6 <sup>†</sup>
Densidade de volume ilhotas (%)	5,8±1,4	12,2±0,7 <sup>†</sup>	5,4±1,8	13,8±1,3 <sup>†</sup>
Massa das ilhotas (mg)	7,9±1,5	26,4±2,6 <sup>†</sup>	6,2±2,0	26,4±2,9 <sup>†</sup>
Imunomarcção de glucagon (%)	10,3±1,1	14,3±2,2 <sup>†</sup>	10,3±1,2	15,6±2,4 <sup>†</sup>
Massa de células alfa (mg)	0,9±0,5	3,7±2,2 <sup>†</sup>	0,8±0,4	4,5±0,9 <sup>†</sup>
Imunomarcção de insulina (%)	51,5±3,8	64,3±3,8 <sup>†</sup>	52,1±4,0	72,1±2,8 <sup>†‡</sup>
Massa de células beta (mg)	4,3±0,6	16,9±2,6 <sup>†</sup>	3,4±0,4	19,1±1,3 <sup>†</sup>

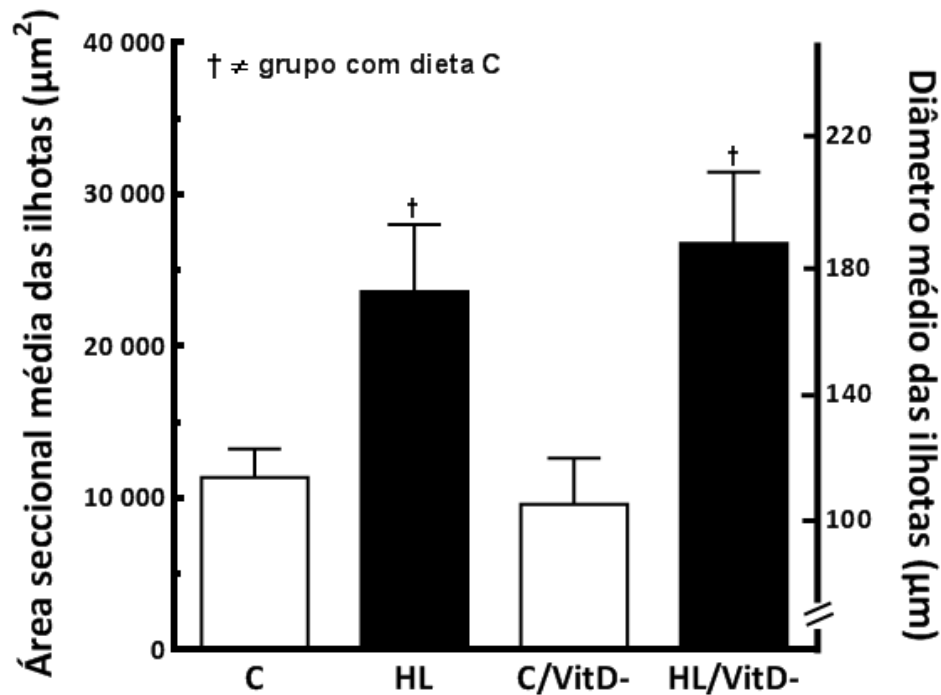
Legenda: Dados preliminares para o cálculo da massa de ilhotas pancreáticas, massa de células alfa e beta. Os dados estão expressos como média e desvio padrão. Para a análise estatística foi utilizado o teste One-Way ANOVA com pós-teste de Holm-Sidak (n=5). Abreviações: C: dieta padrão, HL: dieta hiperlipídica, C/VitD-: dieta padrão sem vitamina D e HL/VitD-: dieta hiperlipídica sem vitamina D. Valores com esse símbolo foram considerados estatisticamente significativos ( $P=0,05$ ): † comparado com o respectivo grupo com dieta controle; ‡ comparado com o respectivo grupo com vitamina D.

Fonte: A autora, 2015.

O aumento da massa das ilhotas, analisada pela técnica de imunosegmentação por imunohistoquímica, foi acompanhado por maior área seccional média e maior aumento do diâmetro das ilhotas pancreáticas, como pode ser observado na Figura 11 (+232%,  $P=0,0005$  no grupo HL e +326%,  $P<0,0001$  no grupo HL/VitD-, respectivamente).



Figura 12 – Área seccional média das ilhotas

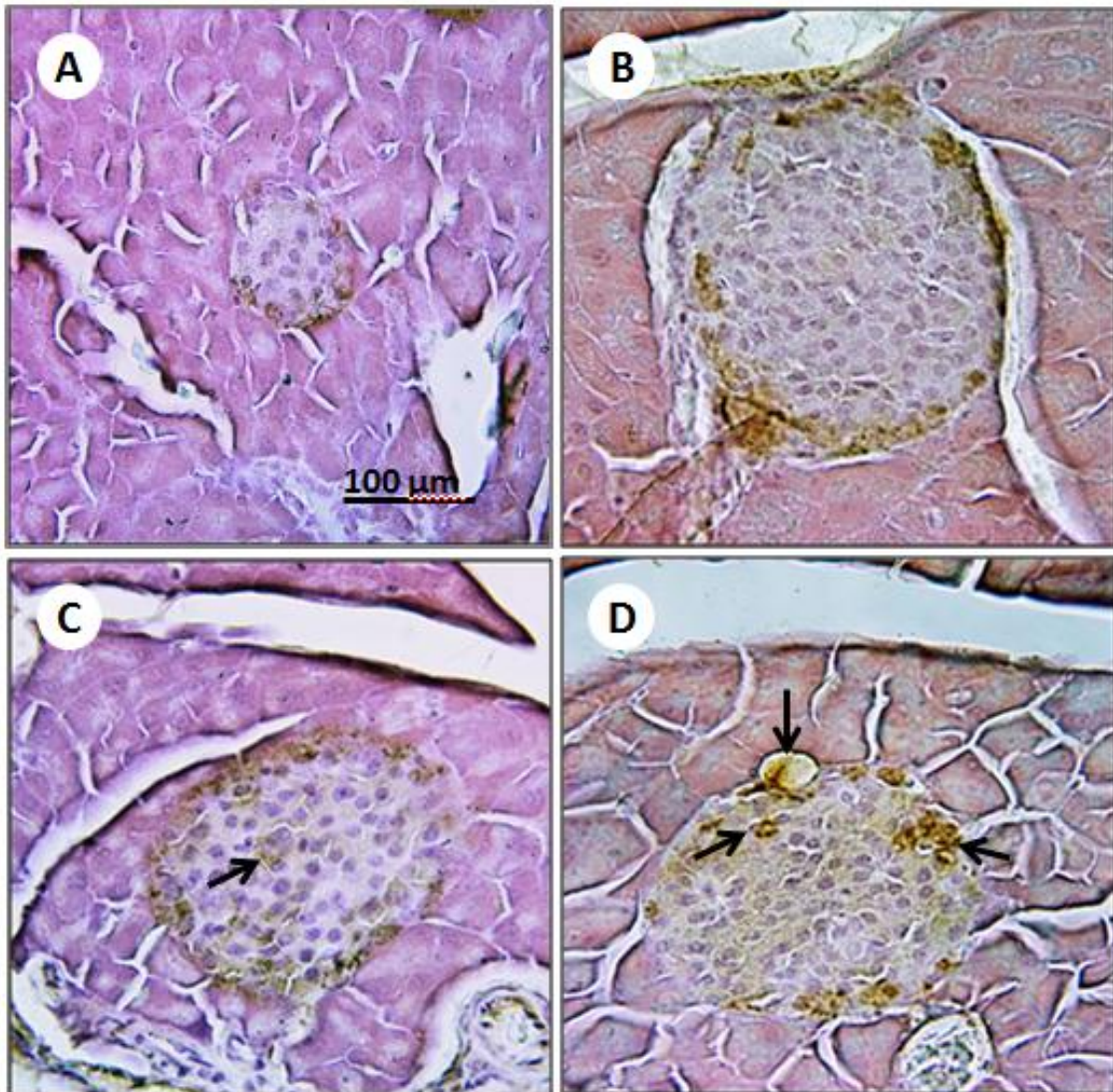


Legenda: Relação entre área seccional média e diâmetro das ilhotas. Os dados estão dispostos como média e DP (n=6). Dados analisados por ANOVA de um fator e pós-teste de Holm-Sidak.  $P < 0,05$  quando: (†) comparado com o grupo com dieta controle, (‡) comparado com o respectivo grupo com Vitamina D. Abreviaturas - C: dieta controle, C/VitD-: dieta controle sem vitamina D, HL: dieta hiperlipídica e HL/VitD-: dieta hiperlipídica sem vitamina D.

Fonte: A autora, 2015.

Quanto aos resultados da técnica de imunodensidade para glucagon (Figura 13), houve aumento da imunomarcção da massa das células alfa pancreáticas quando comparadas aos grupos que receberam dieta hiperlipídica com e sem vitamina D. Na imunomarcção para o glucagon, o grupo HL apresentou aumento de +39% ( $P < 0,002$ ) quando comparado ao grupo C. No grupo HL/VitD- houve aumento de +51% ( $P < 0,0001$ ) quando comparado ao grupo C/VitD- (Tabela 3). Quanto à massa de células alfa, o grupo HL apresentou aumento de +321% ( $P < 0,0001$ ) quando comparado ao grupo C. No grupo HL/VitD- houve aumento de +465% ( $P < 0,0001$ ) quando comparado ao grupo C/VitD- (Tabela 3).

Figura 13 – Imunohistoquímica de células alfa pancreáticas



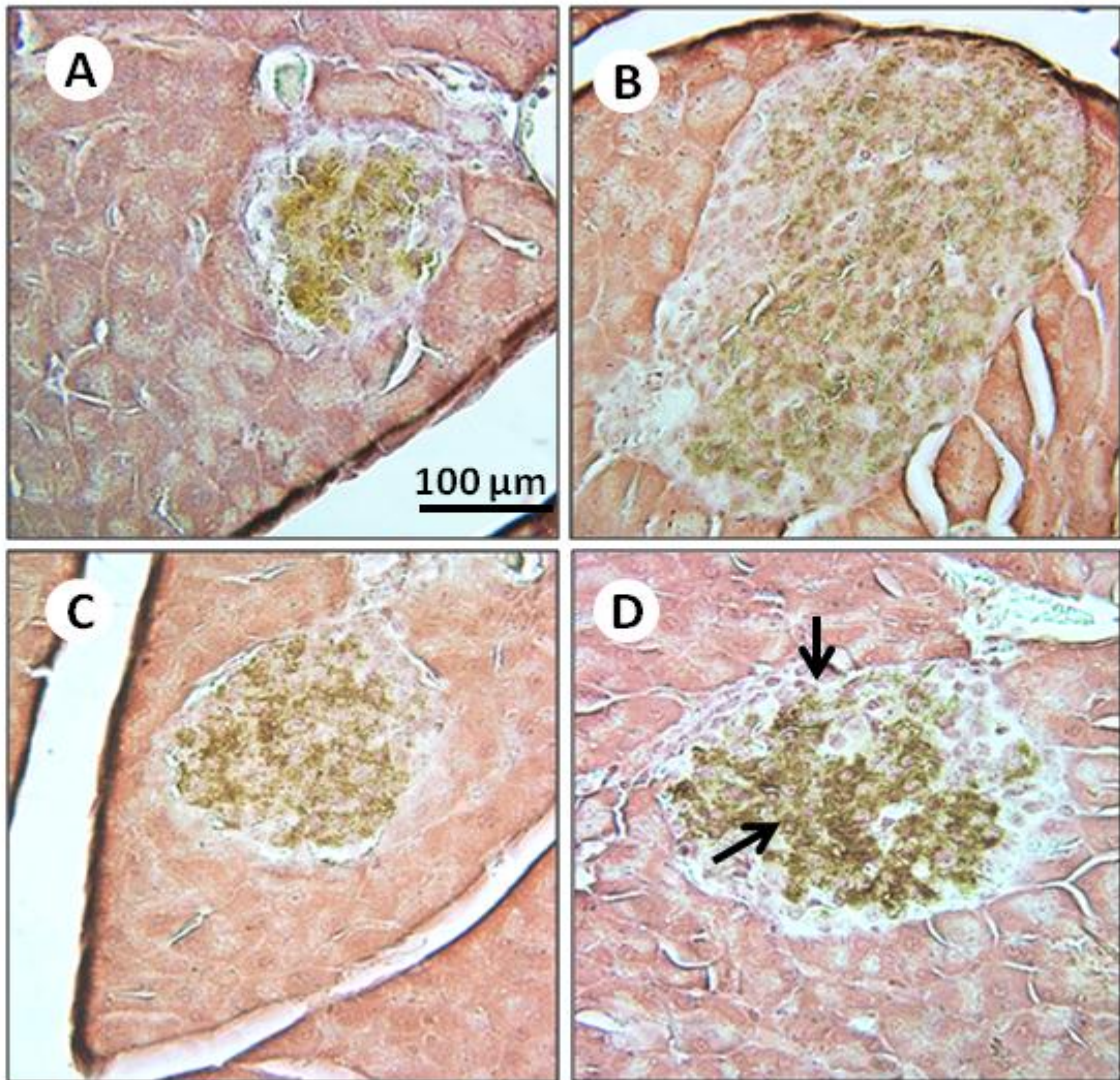
Legenda: Imunomarcção de glucagon dos animais aos 3 meses de idade (contrastado com hematoxilina, mesma ampliação, barra = 100 µm). Sendo C (A), HL (B), CVitD- (C) e HLvitD- (D). Setas mostram possíveis marcações de glucagon no interior da ilhota, caracterizando possíveis infiltrados de células alfa pancreáticas. Abreviaturas - C: dieta controle, C/VitD-: dieta controle sem vitamina D, HL: dieta hiperlipídica e HL/VitD-: dieta hiperlipídica sem vitamina D.

Fonte: A autora, 2015.

Quanto aos resultados da técnica de imunohistoquímica para a análise da imunodensidade da insulina (Figura 14), os grupos que receberam dieta hiperlipídica, apresentaram maior densidade de volume na imunomarcção de insulina em comparação com os animais que receberam dieta controle (+25%,  $P < 0,0001$  no grupo HL e +40%,  $P < 0,0001$  no grupo HL/VitD-, respectivamente). Além disso, houve aumento na imunomarcção da insulina no grupo HLvitD- comparado ao grupo HL (+11%,  $P < 0,05$ ). Este parâmetro, juntamente com o

aumento da massa de ilhotas corroborou com o aumento da massa de células beta (+292%,  $P<0,0001$  no grupo HL e +470%,  $P<0,0001$  no grupo HL/VitD-, respectivamente; Tabela 3). Não existiu interação entre a dieta hiperlipídica e a deficiência de vitamina D na massa de células beta ( $P=0.035$ ) (*Two-way ANOVA*).

Figura 14 – Imunohistoquímica de células beta pancreáticas



Legenda: Imunomarcção de insulina dos animais aos 3 meses de idade (contrastado com hematoxilina, mesma ampliação, barra = 100µm). Sendo C (A), HL (B), CVitD- (C) e HLvitD- (D). Setas mostram a imunomarcção mais forte de insulina. Abreviaturas - C: dieta controle, C/VitD-: dieta controle sem vitamina D, HL: dieta hiperlipídica e HL/VitD-: dieta hiperlipídica sem vitamina D.

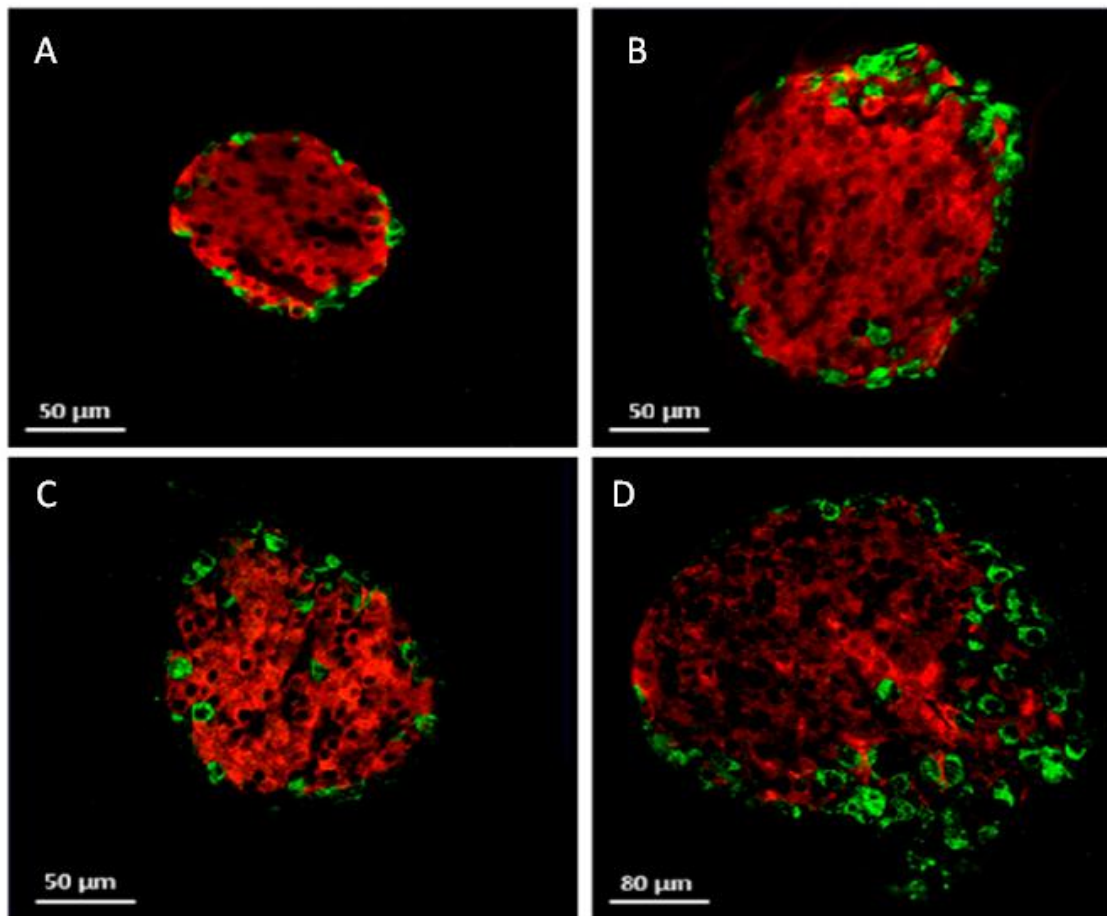
Fonte: A autora, 2015.

#### 4.6 Imunofluorescência

Através da técnica de imunofluorescência com dupla marcação para insulina e glucagon, notou-se que os animais do grupo C apresentaram ilhotas com o arranjo típico, arredondadas e regulares. As células-alfa estavam distribuídas na periferia e ao centro, na sua maioria, encontravam-se as células beta, corroborando com os valores normais de insulina e glucagon plasmáticos neste grupo.

Em contrapartida, os animais dos grupos que receberam dieta hiperlipídica: HL e HL/VitD-, mostraram ilhotas bem aumentadas (hipertrofia), aumento da imunomarcção das células beta insulino-reativas e das células alfa glucagon-reativas em comparação com os animais do grupo SC, como visualizado na Figura 15. Além disso, observou-se nos dois grupos restritos em vitamina D, C/VitD- e HL/VitD-, que algumas células-alfa migraram para o centro da ilhota, caracterizando um infiltrado celular e com desorganização da histoarquitetura das células alfa e beta nas ilhotas pancreáticas, tal como ilustrado pela Figura 15. Esses achados corroboram com a forma irregular e hipertrófica que as ilhotas pancreáticas dos grupos HL e HL/VitD- se mostram, perdendo sua característica normal de ilhotas ovais, arredondadas, como as encontradas nos grupos C e C/VitD-. Esses achados justificam os resultados que encontramos da disfunção das células alfa e beta evidenciado na resistência à insulina.

Figura 15 – Imunofluorescência de ilhotas pancreáticas



Legenda: As células foram duplamente marcadas para a insulina (vermelho) e glucagon (verde) e apresentaram distribuição normal de célula alfa e célula beta no grupo C (A), mas distribuição alterada das célula alfa e célula beta nos grupos C/VitD- (C) e HL/VitD- (D). Os grupos HL (B) e HL/VitD- apresentam ilhotas hipertrofiadas. Abreviaturas - C: dieta controle, C/VitD-: dieta controle sem vitamina D, HL: dieta hiperlipídica e HL/VitD-: dieta hiperlipídica sem vitamina D.

Fonte: A autora, 2015.

#### 4.7 Western Blotting

As proteínas das ilhotas foram expressas como proteínas totais corrigidas pela beta-actina, exceto a p-Akt que foi corrigida pela Akt total. A expressão de IRS1 nos grupos HL e HL/VitD- se mostraram diminuídas quando comparadas aos respectivos grupos controles C e C/VitD- (-45%,  $P=0,02$  e -56%,  $P=0,0009$ ; respectivamente). Não foi observada diferença estatística significativa entre os

grupos C e C/VitD- ou entre os grupos HL e HL/VitD-. O teste *two-way* ANOVA confirmou que de fato, a dieta hiperlipídica influenciou a expressão dessa proteína ( $P<0,0001$ ), assim como a deficiência de vitamina D ( $P=0,01$ ) (Figura 15-A).

De forma interessante, a expressão de IRS2 mostrou-se aumentada no grupo C/VitD- quando comparada com o seu controle C (+236%,  $P=0,001$ ) e diminuída no grupo HL/VitD- quando comparado com o grupo HL (-25%,  $P=0,009$ ). Não foi observada diferença estatística significativa na expressão de IRS2 entre os grupos C e HL ou entre os grupos C/VitD- e HL/VitD-. De fato, a dieta hiperlipídica influenciou significativamente esse parâmetro (*Two-way* ANOVA,  $P=0,008$ ), assim como a deficiência de vitamina D (*Two-way* ANOVA,  $P<0,0001$ ) (Figura 15-B).

A expressão de Pi3k, dos grupos HL e HL/VitD- foram menores quando comparados com os seus respectivos grupos controle (-53%,  $P=0,005$  e -24%  $P<0,0001$ , respectivamente (Figura 15-C) e o teste *two-way* ANOVA confirma o efeito isolado da dieta hiperlipídica na influência desse parâmetro ( $P<0,0001$ ). Não foi observada diferença estatística significativa na expressão de Pi3k entre os grupos HL e HL/VitD-.

Quando à expressão de p-Akt, o grupo HL mostrou-se menor quando comparado ao seu grupo C (-40%,  $P=0,02$ ). No grupo C/VitD-, a expressão de p-Akt também se mostrava diminuída quando comparada com o grupo C (-36%,  $P=0,04$ ). Não foi observada diferença estatística na expressão de p-Akt entre os grupos C/VitD- e HL/VitD- ou entre HL e HL/VitD- (Figura 15-D).

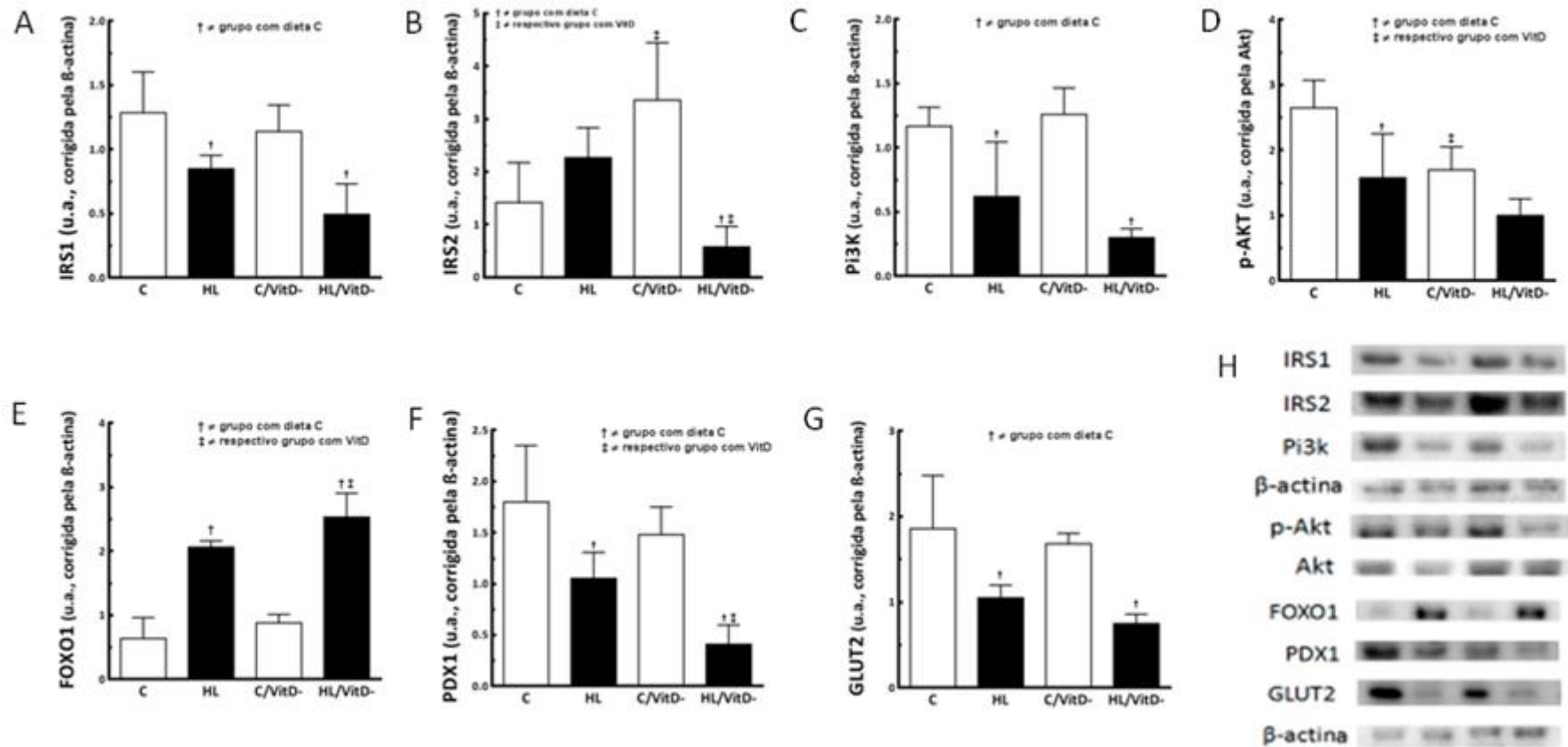
Por outro lado, a expressão de FOXO1 foi maior nos grupos HL e HL/VitD- em comparação com seus respectivos grupos controles C e C/VitD- (+221%,  $P<0,0001$ ; +187%,  $P=0,0002$ ; respectivamente) (Figura 15-E) e podemos perceber que além da dieta hiperlipídica ter uma influência significativa na expressão de FOXO1 (*Two-way* ANOVA,  $P<0,0001$ ), a vitamina D também foi capaz de exercer essa influência significativa (*Two-way* ANOVA,  $P=0,002$ ). De forma interessante, a expressão do FOXO1 foi aumentada no grupo HL/VitD- quando comparada com o grupo HL (+23%,  $P=0,03$ ).

A expressão de PDX1 foi diminuída nos grupos HL e HL/VitD- quando comparada com seus respectivos grupos controles -41%,  $P=0,008$  e -72%,  $P=0,0006$ , respectivamente (Figura 15-F) e menor no grupo HL/VitD- em comparação com o grupo HL (-39%,  $P=0,025$ ). A dieta hiperlipídica exerce uma influência significativa sobre os valores de PDX1 (*Two-way* ANOVA,  $P<0,0001$ ).

Além disso, a deficiência de vitamina D também se mostrou como um fator significativo e influente nesse parâmetro (*Two-way ANOVA*,  $P < 0,005$ ). Não foi observada diferença significativa na expressão de PDX1 entre os grupos C e C/VitD-

A expressão do GLUT2 nos grupos HL e HL/VitD-, foi diminuída quando comparados aos seus respectivos grupos controles C e C/VitD- (-43%,  $P = 0,004$  e -55%,  $P = 0,0009$ ; respectivamente) (Figura 15-G), mostrando uma influência da dieta hiperlipídica sobre esse parâmetro (*Two-way ANOVA*,  $P < 0,0001$ ). Não foi observada diferença estatística significativa na expressão de GLUT2 entre os grupos C e C/VitD- ou entre os grupos HL e HL/VitD-.

Figura 16 – Análise por western blotting das ilhotas pancreáticas



Legenda: A expressão de proteínas da via de insulina Pi3k/Akt foi expressa como proteína total corrigida pela proteína constitutiva  $\beta$ -actina, exceto Akt-p corrigida por Akt. Os dados são expressos como média $\pm$ DP, n=6. Dados analisados por ANOVA de um fator e pós-teste de Holm-Sidak.  $P < 0,05$  quando: (†) comparado com o grupo com dieta controle, (‡) comparado com o respectivo grupo com Vitamina D. Abreviaturas - C: dieta controle, C/VitD-: dieta controle sem vitamina D, HL: dieta hiperlipídica e HL/VitD-: dieta hiperlipídica sem vitamina D.

Fonte: A autora, 2015.



## 5 DISCUSSÃO

Já é demonstrado na literatura que a deficiência de vitamina D causa efeitos prejudiciais como intolerância à glicose, diminuição da secreção de insulina, diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (Cheng *et al.*, 2013) e obesidade (Pittas e Dawson-Hughes, 2010). No entanto, ainda são escassos os trabalhos para avaliar as alterações pancreáticas da deficiência de vitamina D associadas à obesidade. O presente estudo demonstrou que a combinação de deficiência de vitamina D com obesidade em camundongos machos C57BL/6 adultos, aumentou a hiperinsulinemia, hiperleptinemia, resistência à insulina e prejudicou a expressão de proteínas essenciais da via Pi3k/Akt.

Oito semanas de restrição dietética de vitamina D em camundongos C57BL/6 é um período suficiente para diminuir os estoques hepáticos de vitamina D, permitindo a análise dos efeitos da deficiência de vitamina D (Cheng *et al.*, 2013), como foi feito no presente estudo. Observamos também, que só a deficiência de vitamina D, sem a obesidade, foi capaz de causar algumas alterações morfológicas significativas, incluindo desarranjo na distribuição das células alfa e beta nas ilhotas pancreáticas, além de evidências de prejuízo na sinalização da insulina no pâncreas.

Uma recorrente discussão na literatura é se a deficiência de vitamina D causa a obesidade ou se é a obesidade que leva à diminuição das concentrações séricas de vitamina D (Pourshahidi, 2014). No presente estudo, o grupo C mostrou níveis normais de vitamina D séricos, enquanto o grupo HL mostrou níveis diminuídos dessa vitamina no sangue, mesmo com os animais recebendo dieta com vitamina D. Estudos epidemiológicos mostraram que a concentração sérica de vitamina D é inversamente proporcional à massa corporal.

Contudo, o papel da vitamina D na obesidade em roedores ainda é controversa. Um estudo recente com camundongos ICR obesos mostrou que a deficiência de vitamina D amenizou o ganho de massa corporal e a hiperinsulinemia, sugerindo que a deficiência de vitamina D pode aumentar a enzima carnitina palmitoil transferase (CPT2, enzima chave para a beta-oxidação) e a UCP3 (proteína de desacoplamento dos canais de elétrons) no tecido adiposo branco (Liu *et al.*, 2015). No entanto, este trabalho difere um pouco do presente estudo uma vez que os autores estudaram camundongos de outra cepa e muito jovens (com 5 semanas

de idade) e ofereceram uma dieta inapropriada, a AIN-93M ao invés de AIN-93G (Reeves et al., 1993), já que os animais estavam ainda em fase de crescimento. Outro ponto discordante foi que no trabalho de Liu e colaboradores (Liu *et al.*, 2015), os autores observaram que os animais obesos que receberam dieta sem vitamina D comiam menos que os animais do grupo controle. No presente estudo não observamos diferença na ingestão alimentar entre os grupos, a deficiência da vitamina D não afetou este parâmetro. Esses resultados sugerem que o *status* de vitamina D provavelmente não regula a massa corporal.

Dados na literatura têm demonstrado que a obesidade induzida por dieta, em camundongos, provoca resistência à insulina e hiperinsulinemia (Fraulob *et al.*, 2010), hipertrofia das ilhotas, prejuízo à função de células beta pancreáticas (Souza-Mello et al., 2010) e alteração da via de sinalização da insulina como PDX1 e FOXO1 (Frantz *et al.*, 2011). As alterações na estrutura pancreática normalmente são associadas à lipotoxicidade causada pelo aumento da lipólise, típico em estados de hiperinsulinemia. Esse fenômeno pode comprometer a função pancreática normal, levando ao remodelamento pancreático (Szczepaniak *et al.*, 2012).

Além disso, vitamina D ou sua forma ativa  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  seria capaz de desempenhar um importante papel no desenvolvimento do DM2. Estudos mostram que além da relação inversamente proporcional entre  $25(\text{OH})\text{D}_3$  e massa corporal existem também essa correlação entre glicemia de jejum, insulina sérica e HOMA-IR. A vitamina D desempenha papel importante na resistência à insulina, incluindo seu papel na liberação de insulina e na expressão do receptor de insulina (RI) (Sung et al., 2012) e, no caso da diminuição plasmática dessa vitamina, uma ativação local de vitamina D mediada pela enzima  $1\alpha$ -hidroxilase supriria essa necessidade local (Teegarden e Donkin, 2009). A relação entre a baixa concentração plasmática de  $25(\text{OH})\text{D}_3$  e a obesidade, mais precisamente sobre a resistência à insulina pode ser um fator determinante na organização celular das ilhotas pancreáticas e sobre as alterações na sinalização de insulina (Hypponen e Power, 2006).

No presente estudo, observou-se que todos os grupos apresentaram o mesmo consumo alimentar e os grupos que receberam dieta hiperlipídica, com e sem vitamina D, tiveram um aumento similar da massa corporal. Este resultado exclui a possibilidade de os efeitos adversos observados no grupo HL/VitD- serem devido à uma obesidade mais pronunciada (Vimalleswaran *et al.*, 2013).

A desregulação da secreção da insulina e do glucagon estão associadas à um aumento e uma irregularidade na distribuição das células alfa e beta nas ilhotas pancreáticas nos animais do grupo HL. Vimos também que a dieta HL provocou hipertrofia nas ilhotas. Nos grupos C/VitD- e HL/VitD-, as células-alfa não se restringiam à periferia da ilhota, mas apresentavam-se como infiltrados no interior da estrutura. A relação desse remodelamento estrutural e a deficiência de vitamina D é pouco estudada e a disfunção progressiva das células beta e a consequente resistência à insulina estão associada com o remodelamento adverso das ilhotas pancreáticas (Cheng et al., 2013).

A função das células beta pancreáticas é regulada pela via de sinalização da insulina. Nas células beta, a insulina e o IGF-1 ativam a Akt através da ativação da via Pi3k (Dickson e Rhodes, 2004). A via Pi3k está implicada na fisiopatologia de diversas doenças humanas, incluindo o DM2 (Cantley, 2002). A sinalização dependente das moléculas de IRS nas ilhotas pancreáticas é necessária não somente para a manutenção das massas normais de células alfa e beta, mas também está envolvida na regulação da secreção de insulina (Cantley et al., 2007; Weir e Bonner-Weir, 2007).

Além disso, o IRS1 é o principal substrato receptor de insulina nas células beta pancreáticas. Normalmente, quando ocorre a redução da expressão dessa proteína na RI, a IRS2 é aumentada como forma de compensação (Withers *et al.*, 1998). No presente estudo foi demonstrado que ambos, a dieta hiperlipídica e a deficiência de vitamina D foram capazes de diminuir a expressão de IRS1, no entanto, a deficiência de vitamina D como um estímulo único, promoveu efeito compensatório levando ao aumento da expressão de IRS2.

Quando a deficiência de vitamina D e a dieta hiperlipídica estavam associados, ocorreu uma redução acentuada na expressão de IRS2. As alterações na expressão de IRS2 sugerem que a deficiência de vitamina D exerce efeito significativo sobre o mecanismo compensatório entre a IRS1/IRS2 (Briaud *et al.*, 2003; Jhala *et al.*, 2003). Quando a deficiência de vitamina D era associada com obesidade, o mecanismo compensatório de contra regulação da IRS2 era falho (Withers *et al.*, 1998).

A ativação da sinalização de Pi3k dependente de insulina conduz à ativação de AMPK, uma importante via de sinalização para a adaptação adequada das células beta pancreáticas à efeitos adversos. Assim como vimos no presente estudo,

a obesidade induzida por dieta hiperlipídica é normalmente acompanhada pela inibição da sinalização da via Pi3k, o que contribui para o prejuízo da sinalização de insulina nas células beta pancreáticas (McCurdy e Klemm, 2013).

A dieta hiperlipídica prejudica a função do pâncreas endócrino na produção de AMP pelas células beta pancreáticas, inibindo a via AMPK (Walz, 2006). No entanto, na deficiência de 25(OH)D<sub>3</sub>, a baixa taxa de liberação de insulina poderia ser restaurada com a ativação da via AMPK promovendo melhora da sensibilidade à insulina (Bourlon *et al.*, 1997), porém esse efeito compensatório parece estar comprometido quando a deficiência de vitamina D está associada com a obesidade, o que pode explicar o quadro mais acentuado de hiperinsulinemia, intolerância à glicose e alterações estruturais e funcionais no grupo HL/VitD-.

Nas células-beta, o FOXO1 é um inibidor secundário da PDX1, o que leva a célula a um estado de “senescência prematura”. A insulina e o IGF-1 regulam negativamente a transcrição da molécula de FOXO1 através da fosforilação e consequente ativação de Pi3k e Akt (Kitamura *et al.*, 2002). No presente estudo, a regulação positiva de FOXO1 foi maximizada pela interação entre dieta hiperlipídica e a deficiência de vitamina D e, em consequência, a expressão PDX1 foi diminuída no grupo HLVitD-. A expressão PDX1 está ligada à preservação da função das células beta pancreáticas. Estudos têm demonstrado uma menor expressão de PDX1 na resistência à insulina e no desenvolvimento do DM2 (Yang *et al.*, 2012). No presente estudo, observou-se um aumento da FOXO1 e diminuição na expressão de PDX1, corroborando com o estado resistência à insulina no grupo HL, tal como descrito na literatura (Kitamura *et al.*, 2002).

GLUT2 é um transportador de glicose das ilhotas pancreáticas, que promove a secreção de insulina nas células beta estimulada pela glicose em condições fisiológicas (Folli *et al.*, 2011). Portanto, a redução da expressão do GLUT2 sugere redução na função da célula beta e na secreção de insulina (Thorens, 2011). A PDX1 regula a expressão do GLUT2, e ambos desempenham papel na resistência à insulina. De acordo com estas observações, o grupo HL mostrou uma expressão reduzida do GLUT2, causando hipertrofia das ilhotas pancreáticas e uma hipersecreção compensatória, porém, a deficiência de vitamina D não influenciou este parâmetro.

Diante do exposto, nosso trabalho apresenta achados importantes, pois mostra os efeitos da deficiência de vitamina D sobre o metabolismo de animais

obesos. Além dos efeitos deletérios observados sobre o metabolismo da glicose, o pâncreas de animais acometidos pelos dois insultos (deficiência e obesidade) apresentam efeitos potencializados como maior desorganização e prejuízo à sua função.

## CONCLUSÃO

Em conclusão, nossos resultados sugerem que a deficiência de vitamina D juntamente com a dieta hiperlipídica pode agravar a homeostase anormal de glicose, a hiperinsulinemia, a hiperleptinemia, resistência à insulina e alteração da expressão de proteínas na via Pi3k/Akt como IRS2, FOXO1 e PDX1 em camundongos C57BL/6 machos adultos. Além disso, o nosso estudo mostrou que ocorreu um remodelamento estrutural nas ilhotas pancreáticas, assim como um desarranjo das células alfa pancreáticas infiltradas na ilhota. Estas alterações são características de um quadro de resistência à insulina e que podem antecipar o início do quadro de DM2 em camundongos obesos.

Estes resultados são importantes se considerarmos que estamos tratando de duas pandemias mundiais que comumente estão associadas. O diagnóstico antecipado da deficiência de vitamina D pode evitar que os efeitos deletérios da obesidade fiquem mais graves. Nesse sentido, mais estudos experimentais são necessários a fim de esclarecer outras vias metabólicas envolvidas nas alterações pancreáticas e propor estratégias pertinentes ao controle da homeostase da glicose em indivíduos obesos com deficiência de vitamina D.

## REFERÊNCIAS

Adeghate E, Christopher Howarth F, Rashed H, Saeed T, Gbewonyo A. The effect of a fat-enriched diet on the pattern of distribution of pancreatic islet cells in the C57BL/6J mice. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1084:361-370.

Ahren B. Beta- and alpha-cell dysfunction in subjects developing impaired glucose tolerance: outcome of a 12-year prospective study in postmenopausal Caucasian women. *Diabetes* 2009; 58:726-731.

Ahren B, Pacini G. Islet adaptation to insulin resistance: mechanisms and implications for intervention. *Diabetes Obes Metab* 2005; 7:2-8.

Akagiri S, Naito Y, Ichikawa H, Mizushima K, Takagi T, Handa O *et al.* A Mouse Model of Metabolic Syndrome; Increase in Visceral Adipose Tissue Precedes the Development of Fatty Liver and Insulin Resistance in High-Fat Diet-Fed Male KK/Ta Mice. *J Clin Biochem Nutr* 2008; 42:150-157.

Al-Daghri NM, Al-Attas OS, Alokail MS, Alkharfy KM, Al-Othman A, Draz HM *et al.* Hypovitaminosis D associations with adverse metabolic parameters are accentuated in patients with Type 2 diabetes mellitus: a body mass index-independent role of adiponectin? *J Endocrinol Invest* 2013; 36:1-6.

Billaudel BJ, Bourlon PM, Sutter BC, Faure-Dussert AG. Regulatory effect of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on insulin release and calcium handling via the phospholipid pathway in islets from vitamin D-deficient rats. *J Endocrinol Invest* 1995; 18:673-682.

Bluher M. Clinical relevance of adipokines. *Diabetes Metab J* 2012; 36:317-327.  
Boucher BJ. Vitamin D insufficiency and diabetes risks. *Curr Drug Targets* 2011; 12:61-87.

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.

Bourlon PM, Faure-Dussert A, Billaudel B. Modulatory role of 1,25 dihydroxyvitamin D3 on pancreatic islet insulin release via the cyclic AMP pathway in the rat. *Br J Pharmacol* 1997; 121:751-758.

Briaud I, Lingohr MK, Dickson LM, Wrede CE, Rhodes CJ. Differential activation mechanisms of Erk-1/2 and p70(S6K) by glucose in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 2003; 52:974-983.

Brunet A, Bonni A, Zigmund MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS *et al.* Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 1999; 96:857-868.

Cahill GF, Jr. The Banting Memorial Lecture 1971. Physiology of insulin in man. *Diabetes* 1971; 20:785-799.

Cantley J, Choudhury AI, Asare-Anane H, Selman C, Lingard S, Heffron H *et al.* Pancreatic deletion of insulin receptor substrate 2 reduces beta and alpha cell mass and impairs glucose homeostasis in mice. *Diabetologia* 2007; 50:1248-1256.

Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 2002; 296:1655-1657.  
Castro LC. [The vitamin D endocrine system]. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2011; 55:566-575.

Ceddia RB, William WN, Jr., Curi R. Comparing effects of leptin and insulin on glucose metabolism in skeletal muscle: evidence for an effect of leptin on glucose uptake and decarboxylation. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1999; 23:75-82.

Cheng Q, Boucher BJ, Leung PS. Modulation of hypovitaminosis D-induced islet dysfunction and insulin resistance through direct suppression of the pancreatic islet renin-angiotensin system in mice. *Diabetologia* 2013; 56:553-562.

Chiu KC, Chu A, Go VL, Saad MF. Hypovitaminosis D is associated with insulin resistance and beta cell dysfunction. *Am J Clin Nutr* 2004; 79:820-825.

Cohen G, Shamni O, Avrahami Y, Cohen O, Broner EC, Filippov-Levy N *et al.* Beta cell response to nutrient overload involves phospholipid remodelling and lipid peroxidation. *Diabetologia* 2015.

Davis MEVM. The necessity of certain lipins in the diet during growth. *Journal of Biological Chemistry* 1913; 15:167-175.

de Borst MH, de Boer RA, Stolk RP, Slaets JP, Wolffenbuttel BH, Navis G. Vitamin D deficiency: universal risk factor for multifactorial diseases? *Curr Drug Targets* 2011; 12:97-106.

Dickson LM, Rhodes CJ. Pancreatic beta-cell growth and survival in the onset of type 2 diabetes: a role for protein kinase B in the Akt? *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; 287:E192-198.

Earthman CP, Beckman LM, Masodkar K, Sibley SD. The link between obesity and low circulating 25-hydroxyvitamin D concentrations: considerations and implications. *Int J Obes (Lond)* 2012; 36:387-396.

Fantuzzi G, Faggioni R. Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. *J Leukoc Biol* 2000; 68:437-446.

Faure-Dussert AG, Delbancut AP, Billaudel BJ. Low extracellular calcium enhances beta cell sensitivity to the stimulatory influence of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on insulin release by islets from vitamin D3-deficient rats. *Steroids* 1997; 62:554-562.



- Ferrannini E, Muscelli E, Natali A, Gabriel R, Mitrakou A, Flyvbjerg A et al. Association of fasting glucagon and proinsulin concentrations with insulin resistance. *Diabetologia* 2007; 50:2342-2347.
- Folli F, Okada T, Perego C, Gunton J, Liew CW, Akiyama M et al. Altered insulin receptor signalling and beta-cell cycle dynamics in type 2 diabetes mellitus. *PLoS one* 2011; 6:e28050.
- Frantz ED, Aguila MB, Pinheiro-Mulder Ada R, Mandarim-de-Lacerda CA. Transgenerational endocrine pancreatic adaptation in mice from maternal protein restriction in utero. *Mech Ageing Dev* 2011; 132:110-116.
- Fraulob JC, Ogg-Diamantino R, Fernandes-Santos C, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. A Mouse Model of Metabolic Syndrome: Insulin Resistance, Fatty Liver and Non-Alcoholic Fatty Pancreas Disease (NAFPD) in C57BL/6 Mice Fed a High Fat Diet. *J Clin Biochem Nutr* 2010; 46:212-223.
- Funk. C. The chemical nature of the substance that cures polyneuritis in birds produced by a diet of polished rice. *Journal of Physiology* 1911; 43:395–402.
- Gallou-Kabani C, Junien C. Nutritional epigenomics of metabolic syndrome: new perspective against the epidemic. *Diabetes* 2005; 54:1899-1906.
- Gil-Campos M, Canete RR, Gil A. Adiponectin, the missing link in insulin resistance and obesity. *Clin Nutr* 2004; 23:963-974.
- Gonzalez A, Merino B, Marroqui L, Neco P, Alonso-Magdalena P, Caballero-Garrido E et al. Insulin hypersecretion in islets from diet-induced hyperinsulinemic obese female mice is associated with several functional adaptations in individual beta-cells. *Endocrinology* 2013; 154:3515-3524.
- Gray SL, Donald C, Jetha A, Covey SD, Kieffer TJ. Hyperinsulinemia precedes insulin resistance in mice lacking pancreatic beta-cell leptin signaling. *Endocrinology* 2010; 151:4178-4186.
- Heaney RP, Dowell MS, Hale CA, Bendich A. Calcium absorption varies within the reference range for serum 25-hydroxyvitamin D. *J Am Coll Nutr.* 2003 22:142-146.
- Holick MF. High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health. *Mayo Clin Proc* 2006; 81:353-373.
- Hypponen E, Power C. Vitamin D status and glucose homeostasis in the 1958 British birth cohort: the role of obesity. *Diabetes Care* 2006; 29:2244-2246.
- James WP. 22nd Marabou Symposium: the changing faces of vitamin D. *Nutr Rev* 2008; 66:286-290.
- Jhala US, Canettieri G, Sreaton RA, Kulkarni RN, Krajewski S, Reed J et al. cAMP promotes pancreatic beta-cell survival via CREB-mediated induction of IRS2. *Genes Dev* 2003; 17:1575-1580.

Kaiser N, Leibowitz G, Nesher R. Glucotoxicity and beta-cell failure in type 2 diabetes mellitus. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2003; 16:5-22.

Katoh M. Human FOX gene family (Review). *Int J Oncol* 2004; 25:1495-1500.

Kayaniyil S, Vieth R, Harris SB, Retnakaran R, Knight JA, Gerstein HC et al. Association of 25(OH)D and PTH with metabolic syndrome and its traditional and nontraditional components. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96:168-175.

Kenty JH, Melton DA. Testing pancreatic islet function at the single cell level by calcium influx with associated marker expression. *PLoS One* 2015; 10:e0122044.

Kimball S, Fuleihan Gel H, Vieth R. Vitamin D: a growing perspective. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2008; 45:339-414.

Kitamura T, Kitamura Y, Kuroda S, Hino Y, Ando M, Kotani K et al. Insulin-induced phosphorylation and activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B by the serine-threonine kinase Akt. *Mol Cell Biol* 1999; 19:6286-6296.

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.

Lacy PE, Kostianovsky M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes* 1967; 16:35-39.

Liu XJ, Wang BW, Zhang C, Xia MZ, Chen YH, Hu CQ et al. Vitamin D Deficiency Attenuates High-fat Diet-Induced Hyperinsulinemia and Hepatic Lipid Accumulation in male Mice. *Endocrinology* 2015:en20142037.

Maestro B, Champion J, Davila N, Calle C. Stimulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3 of insulin receptor expression and insulin responsiveness for glucose transport in U-937 human promonocytic cells. *Endocr J* 2000; 47:383-391.

Mandarim-de-Lacerda CA. Stereological tools in biomedical research. *An Acad Bras Cienc* 2003; 75:469-486.

Mandarim-de-Lacerda CA, Fernandes-Santos C, Aguila MB. Image analysis and quantitative morphology. *Methods Mol Biol* 2010; 611:211-225.

Mangin M, Sinha R, Fincher K. Inflammation and vitamin D: the infection connection. *Inflamm Res* 2014; 63:803-819.

Marcotorchino J, Tourniaire F, Astier J, Karkeni E, Canault M, Amiot MJ et al. Vitamin D protects against diet-induced obesity by enhancing fatty acid oxidation. *J Nutr Biochem* 2014; 25:1077-1083.

Mason RS, Sequeira VB, Gordon-Thomson C. Vitamin D: the light side of sunshine. *Eur J Clin Nutr* 2011; 65:986-993.

Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28:412-419.

McCurdy CE, Klemm DJ. Adipose tissue insulin sensitivity and macrophage recruitment: Does PI3K pick the pathway? *Adipocyte* 2013; 2:135-142.

Mosekilde L. Vitamin D and the elderly. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005; 62:265-281.

Nimitphong H, Chanprasertyothin S, Jongjaroenprasert W, Ongphiphadhanakul B. The association between vitamin D status and circulating adiponectin independent of adiposity in subjects with abnormal glucose tolerance. *Endocrine* 2009; 36:205-210.

Norman AW. From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. *Am J Clin Nutr* 2008; 88:491S-499S.

Nyengaard JR. Stereologic methods and their application in kidney research. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10:1100-1123.

Pitt HA. Hepato-pancreato-biliary fat: the good, the bad and the ugly. *HPB (Oxford)* 2007; 9:92-97.

Pittas AG, Dawson-Hughes B. Vitamin D and diabetes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010; 121:425-429.

Pittas AG, Sun Q, Manson JE, Dawson-Hughes B, Hu FB. Plasma 25-hydroxyvitamin D concentration and risk of incident type 2 diabetes in women. *Diabetes Care* 2010; 33:2021-2023.

Poitout V, Robertson RP. Glucolipotoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction. *Endocr Rev* 2008; 29:351-366.

Pourshahidi LK. Vitamin D and obesity: current perspectives and future directions. *Proc Nutr Soc* 2014:1-10.

Pourshahidi LK. Vitamin D and obesity: current perspectives and future directions. *Proc Nutr Soc* 2015; 74:115-124.

Prentice A. Vitamin D deficiency: a global perspective. *Nutr Rev* 2008; 66:S153-164.  
Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, 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* 1993; 123:1939-1951.

Ross AC, Manson JE, Abrams SA, Aloia JF, Brannon PM, Clinton SK et al. The 2011 Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D: what dietetics practitioners need to know. *J Am Diet Assoc* 2011; 111:524-527.

Schuch NJ, Garcia VC, Martini LA. [Vitamin D and endocrine diseases]. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2009; 53:625-633.

Schwitzgebel VM, Mamin A, Brun T, Ritz-Laser B, Zaiko M, Maret A et al. Agenesis of human pancreas due to decreased half-life of insulin promoter factor 1. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:4398-4406.

Sharma RB, Alonso LC. Lipotoxicity in the pancreatic beta cell: not just survival and function, but proliferation as well? *Curr Diab Rep* 2014; 14:492.

Souza-Mello V, Gregorio BM, Cardoso-de-Lemos FS, de Carvalho L, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Comparative effects of telmisartan, sitagliptin and metformin alone or in combination on obesity, insulin resistance, and liver and pancreas remodelling in C57BL/6 mice fed on a very high-fat diet. *Clin Sci (Lond)* 2010; 119:239-250.

Steenbock H. The Induction of Growth Promoting and Calcifying Properties in a Ration by Exposure to Light. *Science* 1924; 60:224-225.

Steenbock H, Hart EB. The influence of function on the lime requirement of animals. *J. Biol. Chem.* 1916; 14:59-73.

Sung CC, Liao MT, Lu KC, Wu CC. Role of vitamin D in insulin resistance. *J Biomed Biotechnol* 2012; 2012:634195.

Swinburn BA, Sacks G, Hall KD, McPherson K, Finegood DT, Moodie ML et al. The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. *Lancet* 2011; 378:804-814.

Szczepaniak LS, Victor RG, Mathur R, Nelson MD, Szczepaniak EW, Tyer N et al. Pancreatic steatosis and its relationship to beta-cell dysfunction in humans: racial and ethnic variations. *Diabetes Care* 2012; 35:2377-2383.

Targher G, Bertolini L, Scala L, Cigolini M, Zenari L, Falezza G et al. Associations between serum 25-hydroxyvitamin D3 concentrations and liver histology in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2007; 17:517-524.  
Teegarden D, Donkin SS. Vitamin D: emerging new roles in insulin sensitivity. *Nutr Res Rev* 2009; 22:82-92.

Thorens B. Of fat, beta cells, and diabetes. *Cell Metab* 2011; 14:439-440.

Thorn HODa. Insulin secretion from beta cells within intact islets; location matters. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2015.

Tilig H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 2006; 6:772-783.

Towler MC, Hardie DG. AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circ Res* 2007; 100:328-341.

Tschanz SA, Burri PH, Weibel ER. A simple tool for stereological assessment of digital images: the STEPanizer. *J Microsc* 2011; 243:47-59.

Tsiaras WG, Weinstock MA. Factors influencing vitamin D status. *Acta Derm Venereol* 2011; 91:115-124.

Vimaleswaran KS, Berry DJ, Lu C, Tikkanen E, Pilz S, Hiraki LT et al. Causal relationship between obesity and vitamin D status: bi-directional Mendelian randomization analysis of multiple cohorts. *PLoS Med* 2013; 10:e1001383.

Walz HAH, L.; Wierup, N.; Zmuda-Trzebiatowska, E.; Svennelid, F.; Manganiello, V.C.; Ploug, T.; Sundler, F.; Degerman, E.; Ahrén, B.; Holst, L.S. Early and rapid development of insulin resistance, islet dysfunction and glucose intolerance after high-fat feeding in mice overexpressing phosphodiesterase 3B. *J Endocrinol.* 2006; 189:627-641.

Weir GC, Bonner-Weir S. A dominant role for glucose in beta cell compensation of insulin resistance. *J Clin Invest* 2007; 117:81-83.

Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM, Previs S et al. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* 1998; 391:900-904.

Wong KE, Szeto FL, Zhang W, Ye H, Kong J, Zhang Z et al. Involvement of the vitamin D receptor in energy metabolism: regulation of uncoupling proteins. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 296:E820-828.

Wortsman J, Matsuoka LY, Chen TC, Lu Z, Holick MF. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *Am J Clin Nutr* 2000; 72:690-693.

Yang BT, Dayeh TA, Volkov PA, Kirkpatrick CL, Malmgren S, Jing X et al. Increased DNA methylation and decreased expression of PDX-1 in pancreatic islets from patients with type 2 diabetes. *Mol Endocrinol* 2012; 26:1203-1212.

Zanatta L, Goulart PB, Goncalves R, Pierozan P, Winkelmann-Duarte EC, Woehl VM et al. 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D(3) mechanism of action: modulation of L-type calcium channels leading to calcium uptake and intermediate filament phosphorylation in cerebral cortex of young rats. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1823:1708-1719.

Zheng W, Xie Y, Li G, Kong J, Feng JQ, Li YC. Critical role of calbindin-D28k in calcium homeostasis revealed by mice lacking both vitamin D receptor and calbindin-D28k. *J Biol Chem* 2004; 279:52406-52413.

## ANEXO A - Termo de submissão do artigo científico à publicação

### Submissão de artigo científico

Fwd: Molecular Nutrition and Food Research - Manuscript # mnfr.201500398

---

22-May-2015

Dear Miss Aguila:

Your manuscript entitled "Adverse effects of vitamin D deficiency in pancreatic islet in diet-induced obese mice" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in "Molecular Nutrition and Food Research".

Your manuscript # is mnfr.201500398

Please mention the above manuscript # in all future correspondence regarding this submission.

You can view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging into <https://mc.manuscriptcentral.com/mnf>.

If you have difficulty using this site, please contact our Support Desk at [edsupport@wiley.com](mailto:edsupport@wiley.com).

Thank you for submitting your manuscript to "Molecular Nutrition and Food Research".

Sincerely,

Molecular Nutrition and Food Research  
Editorial Support

--

Marcia B Aguila, RD, PhD

---

## ANEXO B - Comitê de ética e pesquisa



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/038/2013 sobre "Vitamina D e ilhotas pancreáticas", sob a responsabilidade de **Márcia Barbosa Águila Mandarim 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 (CEUA) do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ em **04/10/2013**. Este certificado expira em **04/10/2017**.

Rio de Janeiro, 04 de Outubro de 2013.

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

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Israel Felzenszwalb  
CEUA/IBRAG/UERJ

*Profª Dra. Patricia Cristina Lisboa de Silva*  
*Profª Adj. de Depo. Ciências Fisiológicas / IBRAG / UERJ*  
t.ass *Matricula 34765-8*

☎ (21) 2587-6455 / 2587-6109 – Fax (21) 2284-9748  
biologia@uerj.br