

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ – CAMPUS DE CASCAVEL
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM BIOCÊNCIAS E
SAÚDE – NÍVEL MESTRADO

ZOÉ MARIA NEVES DE CARVALHO GUARESCHI

**O efeito da suplementação crônica com vitamina D sobre a
obesidade hipotalâmica e o controle secretor de insulina**

:

CASCAVEL-PR
Março/2018

ZOÉ MARIA NEVES DE CARVALHO GUARESCHI

**O efeito da suplementação crônica com vitamina D sobre a
obesidade hipotalâmica e o controle secretor de insulina**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Biociências e Saúde – Nível Mestrado, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Saúde.

Área de concentração:

Processo saúde-doença

ORIENTADORA: Profa. Dra. Sabrina Grassioli

CASCADEL-PR

Março/2018

FOLHA DE APROVAÇÃO

ZOÉ MARIA NEVES DE CARVALHO GUARESCHI

**O EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO CRÔNICA COM VITAMINA D
SOBRE A OBESIDADE HIPOTALÂMICA E O CONTROLE
SECRETOR DE INSULINA**

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Saúde e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

Orientadora: Prof. Dr. (a): _____

Sabrina Grassioli

Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Campus Cascavel (UNIOESTE)

Prof. Dr. (a): _____

Rose Meire Costa Brancalhão

Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Campus Cascavel (UNIOESTE)

Prof. Dr. (a): _____

Henriette Rosa de Oliveira Emílio

Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à DEUS por todo Seu amor, por toda a Sua bondade, por toda a Sua misericórdia e, principalmente, por nos permitir termos sempre as nossas escolhas, nosso livre-arbítrio, e com isso, colhermos o fruto das nossas ações, seja para nossa evolução/aprendizado.

Agradeço à minha orientadora, Sabrina Grassioli, que sem nem ao menos me conhecer, confiou que eu seria capaz; me orientando e tendo sempre muita paciência com todos os questionamentos. Agradeço nestes dois anos de orientação, ter conhecido uma professora fantástica, com aulas simplesmente fascinantes!!

Agradeço todos os alunos da graduação, colegas e amigos/as que participaram em algum momento do projeto, seja no cuidado e manejo dos animais, durante as etapas das análises.

Ao Professor João Paulo Amorim, por permitir a utilização do seu laboratório de Histotécnica. Vera, Zenilde e Clislaine, que tive o prazer de conhecer.

Um agradecimento especial para Sandra e Odete, técnicas do LAFEM.

Muitas amizades foram construídas nestes dois anos, mas uma em especial, eu não posso deixar de falar...minha amiga e companheira de mestrado Ana Valcanaia Amaral. Lembro do dia em que te conheci, já estava lá gavando os animais...e eu mal sabia (ou até sabia) quão linda seria nossa amizade, amizade esta que foi essencial, fundamental, para que todo este tempo não ficasse resumido apenas aos estudos, e sim, a conhecer uma das pessoas mais doces que eu já conheci. Obrigada por tudo amiga!!

Vanessa, Ellen Carol, um agradecimento especial para vocês. Tarlizza Nardelli, obrigada por toda ajuda, paciência e dedicação nas análises WB.

Professora Sara Sagae, agradeço pela oportunidade de estágio de docência em sua disciplina com os alunos da graduação, foi uma experiência ótima, só não foi melhor do que conhecê-la, junto com a sua calma e tranquilidade!!

Finalizo agradecendo ao meu marido Ricardo, o principal, único e meu maior incentivador...obrigada por me permitir realizar e dedicar ao mestrado durante esses dois anos com tanta tranquilidade e conforto, tirando de mim qualquer responsabilidade e preocupação. Obrigada, por em vários e incontáveis

momentos, ter segurado a barra, aguentando as loucuras, as minhas neuras, os meus dias de “mau-humor”... me desculpe por cada minuto que deixei de te dar atenção, que deixei de estar contigo, que tive preguiça, que sentei no sofá e dormi no mesmo instante por estar muito cansada. Cada minuto será compensado a partir de hoje!! Eu te amo!!

Obrigada!

RESUMO GERAL

A vitamina D (VD) é conhecida por atuar no metabolismo ósseo. Receptores de VD (VDR) no tecido adiposo e pâncreas endócrino demonstram a ação da VD sobre a homeostase energética. O acúmulo de tecido adiposo promove resistência à insulina (RI), rompendo a homeostase glicêmica e lipídica, inicialmente superada por hipersecreção de insulina pelas células beta (β) pancreáticas. Este estudo avaliou o efeito da suplementação crônica com VD sobre a obesidade hipotalâmica e controle secretor de insulina de ratos obesos-MSG. Após o nascimento dos roedores, foram mantidos 6 filhotes machos por rata. Metade da prole ($n=30$) foi induzida à obesidade por aplicação de glutamato-monossódico (MSG; 4g/Kg) na fase neonatal. Controles (CON; $n=30$) receberam salina equimolar. Adesmame ocorreu aos 30 dias, metade de cada grupo ($n=15$; $n=15$) foi suplementado com VD (12 μ g/Kg) em óleo de milho (veículo). Animais não suplementados (NS) receberam apenas o veículo. Formaram-se 4 grupos experimentais ($n=15$ /grupo): CON-NS; CON-VD; MSG-NS; MSG-VD. Aos 86 dias os animais foram eutanasiados e os depósitos de gordura coletados. Parte das ilhotas pancreáticas foram isoladas e incubadas na presença de glicose (5.6 e 8.3mM). A resposta colinérgica foi avaliada na presença de glicose + carbacol (CCh, 10 μ M). A outra parte das ilhotas pancreáticas foram isoladas e transferidas para tampão de extração proteica para análise da expressão do receptor muscarínico (RM3), proteína quinase A (PKA) e proteína C quinase (PKC), por Western Blotting. O pâncreas total foi submetido à histologia para análise de número e área das ilhotas pancreáticas. O sangue total foi coletado, plasma usado para dosagens de glicose, colesterol, triglicerídeos e insulina. Dados expressos em média \pm erro padrão da média, avaliados por *Anova-2 way* e pós teste *Tukey* ($p\leq 0,05$). Ao final, observou-se que o peso corporal e CNA foram menores nos animais do grupo MSG-NS quando comparados aos do grupo CON-NS (31,57% e 12,47%, respectivamente). Maior média de peso das gorduras subcutânea (188,31%) e visceral (47,63%), comparando médias MSG-NS com CON-NS. A média glicêmica foi significativamente maior nos grupos MSG-NS (78,29%) e MSG-VD (48,81%), comparado ao grupo CON-NS. Animais do grupo MSG-VD apresentaram média inferior (86,76%) de insulina, comparados aos do grupo MSG-NS. Animais suplementados apresentaram média inferior de triglicerídeos (50,40%) em relação aos do grupo MSG-NS. O colesterol foi maior (33,58%) nos animais MSG-VD, comparado aos animais MSG-NS. O tratamento com MSG prejudicou a sensibilidade à insulina, sendo melhorada pela VD. O HOMA-IR foi maior nos animais do grupo MSG-NS em relação aos outros grupos experimentais, diminuído pela VD nos animais MSG-VD (89,81%), em relação aos do grupo MSG-NS. Ilhotas de roedores MSG-NS apresentaram redução do efeito colinérgico, sem diferenças significativas nas expressões de RM3, PKA e PKC. O número de ilhotas pancreáticas não foi alterado, entretanto ilhotas pancreáticas de roedores MSG-VD, apresentaram-se menores em relação às do grupo MSG-NS. A suplementação com VD em roedores obesos pode reduzir a hipertrigliceridemia, hiperinsulinemia, melhorando a sensibilidade à insulina; a redução do efeito insulínico colinérgico nas ilhotas dos roedores MSG-VD pode contribuir para redução da insulina plasmática.

Palavras – chave: secreção de insulina, obesidade, vitamina D.

GENERAL ABSTRACT

The effect of chronic oral vitamin D supplementation on adiposity and insulin secretion in hypothalamic obese rats

Vitamin D (VD) is known to play a role in bone metabolism. VD receptors (VDRs) in adipose tissue and endocrine pancreas demonstrate the action of VD on energy homeostasis. The accumulation of adipose tissue promotes insulin resistance (IR), breaking the glycemic and lipid homeostasis, initially overcome by hypersecretion of insulin by beta (β) pancreatic cells. This study evaluated the effect of chronic VD supplementation on hypothalamic obesity and insulin secretory control of obese rats-MSG. After rodents birth, 6 male pups per rat were kept. Half of the offspring ($n = 30$) were induced to obesity by application of monosodium glutamate (MSG, 4g / kg) in the neonatal phase. Controls (CON; $n = 30$) received equimolar saline. Weaning occurred at 30 days, half of each group ($n = 15$; $n = 15$) was supplemented with VD (12 μ g / kg) in corn oil (vehicle). Animals not supplemented (NS) received only vehicle. Four experimental groups ($n = 15$ / group) were formed: CON-NS; CON-VD; MSG-NS; MSG-VD. At 90 days the animals were euthanized and the fat deposits were collected. Part of the pancreatic islets were isolated and incubated in the presence of glucose (5.6 and 8.3 mM). The cholinergic response was evaluated in the presence of glucose + carbachol (CCh, 10 μ M). The other part of the pancreatic islets were isolated and transferred to protein extraction buffer for analysis of muscarinic receptor (RM3), protein kinase A (PKA) and protein C kinase (PKC) by Western blotting. The total pancreas was submitted to histology for analysis of the number and area of the pancreatic islets. Whole blood was collected, plasma used for dosages of glucose, cholesterol, triglycerides and insulin. Data expressed as mean \pm standard error of the mean, evaluated by Anova-2 way and post Tukey test ($p < 0.05$). At the end, it was observed that body weight and CNA were lower in the MSG-NS group than in the CON-NS group (31.57% and 12.47%, respectively). Highest mean weight of subcutaneous fat (188.31%) and visceral fat (47.63%), comparing mean MSG-NS with CON-NS. The glycemic mean was significantly higher in the MSG-NS (78.29%) and MSG-VD (48.81%) groups compared to the CON-NS group. Animals from the MSG-VD group had lower mean (86.76%) insulin, compared to the MSG-NS group. Supplemented animals presented lower mean triglycerides (50.40%) than those in the MSG-NS group. Cholesterol was higher (33.58%) in MSG-VD animals compared to MSG-NS animals. Treatment with MSG impaired insulin sensitivity and was improved by VD. HOMA-IR was higher in animals of the MSG-NS group than in the other experimental groups, decreased by VD in MSG-VD animals (89.81%), compared to the MSG-NS group. MSG-NS rodent islets decreased cholinergic effect, with no significant differences in RM3, PKA and PKC expression. The number of pancreatic islets was not altered; however, pancreatic islets of MSG-VD rodents were smaller than those of the MSG-NS group. Supplementation with VD in obese rodents may reduce hypertriglyceridemia, hyperinsulinemia, and improve insulin sensitivity; the reduction of the cholinergic insulinotropic effect in the islets of MSG-VD rodents may contribute to the reduction of plasma insulin.

Keywords: insulin-secretion; obesity; vitamin D

SUMÁRIO

RESUMO GERAL.....	6
INTRODUÇÃO GERAL.....	11
REVISÃO GERAL DA LITERATURA.....	18
Vitamina D (VD) na homeostase glicêmica e obesidade	18
Secreção de Insulina Induzida por Glicose.....	23
Sistema nervoso autônomo (SNA) no controle glicêmico.....	27
Obesidade, resistência à insulina e síndrome metabólica.....	29
Indução de Obesidade Hipotalâmica por Glutamato Monossódico.....	33
REFERÊNCIAS.....	38
ARTIGO CIENTÍFICO.....	56
THE EFFECT OF CHRONIC VITAMIN D SUPPLEMENTATION ON HYPOTHALAMIC OBESITY AND INSULIN SECRETORY CONTROL.....	56
APÊNDICES/ANEXOS	88
Anexo A Parecer do Comitê de Ética	89
Anexo B Normas da Revista: British Journal of Nutrition.....	91
Anexo C Tampões para isolamento de ilhotas pancreáticas.....	105
Anexo D Tampões para expressão protéica.....	106
Anexo E Solução de fixação: em tecidos e em lâmina para microtomia..	107

LISTA DE ABREVIATURAS

25 OHase	25 hidroxilase
25(OH)D3	Calcifediol
1,25(OH)2D3	Dihidroxitamina D3
ACH	Acetilcolina
ADP	Adenosina difosfato
ALH	Área lateral hipotalâmica
ATP	Adenosina Trifosfato
ARC	Núcleo Arqueado
Ca ²⁺	Cálcio
CCh	Carbacol
CNA	Comprimento naso-anal
CON-NS	Controle não suplementado
CON-VD	Controle suplementado com vitamina D
DAG	Diacilglicerol
DBP	Proteínas ligadoras de VD
DM	Diabetes mellitus
DMT1	Diabetes mellitus tipo 1
DMT2	Diabetes mellitus tipo 2
EM	Eminência Mediana
G6P	Glicose-6-Fostato
GH	Hormônio do crescimento
GHRH	Hormônio liberador do hormônio do crescimento
GLUT	Transportador de glicose tipo GLUT
GLUT2	Transportador de glicose subtipo GLUT 2
HDL	Lipoproteína de alta densidade
IP3	Inositol-3-fostato
K-ATP	Canais de potássio sensíveis ao ATP
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LPL lipase	Lipoproteína lipase
MR3	Receptor muscarínico M3

MSG -----Glutamato monossódico
MSG-NS -----Glutamato monossódico não suplementado
MSG-VD ----- Glutamato monossódico suplementado com vitamina D
NHV ----- Núcleo hipotalâmico ventral
OGTT -----Teste oral de tolerância à glicose
PDE ----- Fosfodiesterase
PIP3-----Fosfatidilinositol 3-quinases
PKA-----Proteína quinase A
PKC-----Proteína C quinase
PLC -----Fosfolipase C
PRTGq/0 -----Proteína G q
PP ----- Polipeptídeo pancreático
PTH -----Parathormônio
RI -----Resistência à insulina
RIA-----Radioimunoensaio
SM ----- Síndrome metabólica
SNA ----- Sistema nervoso autônomo
SNC ----- Sistema nervoso central
SNP ----- Sistema nervoso parassimpático
SNS ----- Sistema nervoso simpático
TNF- α ----- Fator de necrose tumoral alfa
VD -----Vitamina D
VD2 ----- Ergocalciferol
VD3 -----Colecalciferol
VDR----- Receptor de vitamina D
VLDL -----Lipoproteína de muito baixa densidade

INTRODUÇÃO GERAL

A vitamina D (VD) é um hormônio esteróide conhecido, principalmente, pelos seus efeitos sobre a homeostase do cálcio e fósforo, bem como no desenvolvimento e manutenção do metabolismo ósseo (SCHUCH; GARCIA; MARTINI, 2009). Interessantemente, observa-se que há, em muitas situações, em especial na obesidade, a redução da biodisponibilidade de VD e, paralelamente a isso, considera-se que a diminuição plasmática desta vitamina parece estar associada primariamente ao aumento do processo inflamatório e do estresse oxidativo, causados pelo excesso de peso. Adicionalmente, parece que a carência nutricional desta vitamina, pode estar também relacionada ao desenvolvimento de diversas enfermidades, além de resistência à insulina (RI), que pode culminar em *diabetes mellitus* tipo 2 (DMT2), a principal doença associada à expansão excessiva do tecido adiposo (SCHUCH; GARCIA; MARTINI, 2009; MARCOTORCHINO et al., 2014; PERCEGONI; CASTRO et al., 2014; JAMKA et al., 2015).

Em grande parte dos indivíduos obesos, pode ser observado o desenvolvimento de RI, em decorrência do aumento na demanda de insulina, hormônio responsável pelo equilíbrio glicêmico. O quadro de RI induz, inicialmente, ao aumento na secreção de insulina pelas células- β do pâncreas endócrino, a fim de corrigir a hiperglicemia, esta secreção excessiva culmina na expansão da massa celular das células- β pancreáticas, como uma adaptação momentânea, na tentativa de realizar a secreção compensatória deste hormônio. A longo prazo, isto levará à perda celular no pâncreas endócrino, sendo um elemento chave para o desenvolvimento do DMT2 (ALEJANDRO et al., 2015). Portanto, a exposição constante das células- β à hiperglicemia em decorrência da obesidade, impõe efeitos deletérios nestas células, deteriorando a sua massa celular e prejudicando a sua função, resultando em DMT2. Logo, o DMT2 apresenta, como principais características, a deficiência na secreção e/ou ação da insulina e, conseqüentemente, redução na massa de células- β do pâncreas endócrino, após

passada a fase de necessária adaptação celular (ALEJANDRO et al., 2015; SATIN et al., 2015).

A melhora na tolerância à glicose e sobre a síntese e secreção de insulina são alguns efeitos da VD quando suplementada em indivíduos obesos ou animais experimentais que apresentam esta hipovitaminose associada à obesidade, RI ou DMT2 (BOURLON; BILLAUDEL; FAURE-DUSSERT, 1998). Assim, a suplementação com VD pode melhorar a síntese de insulina e parece agir diretamente sobre o pâncreas endócrino de humanos e modelos experimentais, exclusivamente sobre a resposta à insulina quando estimulada por glicose (ZEITZ et al., 2003; LAHBIB et al., 2015; VANGOITSENHOVEN et al., 2016). Tal associação com o pâncreas endócrino pode ser explicada pela presença de receptores para VD, denominados VDR (*Vitamin D Receptor*) nas ilhotas pancreáticas, atuando sobre a funcionalidade das células- β , influenciando pontualmente na biossíntese de insulina, por ativar o *turnover* de insulina e acelerar a conversão de pró-insulina em insulina, conseqüentemente na secreção de insulina (MATHIEU et al., 2006; PALOMER et al., 2008). Deste modo, a capacidade da VD de atuar diretamente sobre o pâncreas endócrino, ajustando a secreção de insulina é importante ferramenta no combate à apoptose das células- β pancreáticas, a qual está associada a melhora da RI e na possibilidade de atenuar ou evitar o DMT2.

A insulina facilita a captação celular de glicose pelos tecidos, e regula o metabolismo dos carboidratos, lipídeos e proteínas (WILCOX, 2005). No entanto, as ações periféricas da insulina sobre o metabolismo, em particular sobre a homeostase glicêmica, são alteradas pelo excesso de tecido adiposo (RUTTER et al., 2015). Contudo, este tecido pode ser considerado um órgão endócrino ativo, capaz de secretar hormônios, como leptina e adiponectina e citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF α) e interleucinas, que são caracterizados por contribuírem para inflamação vascular e sistêmica (ESPOSITO et al., 2003). Neste sentido, a relação entre obesidade e o desenvolvimento de RI tem sido bastante documentada.

A RI é definida como a ação deficiente da insulina sobre os tecidos-alvo periféricos tais como, os tecidos muscular, adiposo e hepático. A RI resulta em menor entrada de glicose nas células musculares esqueléticas e adiposas e no

aumento da produção endógena de glicose hepática, culminando com hiperglicemia (CASTRO et al., 2014). Inicialmente, para superar a RI ocorre a hipersecreção de insulina pelo pâncreas endócrino, gerando o quadro de hiperinsulinemia, a qual favorece a lipogênese nos adipócitos e conseqüentemente, a expansão da massa adiposa. Todavia, a longo prazo a RI também se instala no tecido adiposo, agravando os efeitos da RI e sobrecarregando as células- β pancreáticas. Estes elementos promovem alteração na estrutura e área das ilhotas pancreáticas e durante sua progressão resultam em aumento de apoptose destas células e a instalação definitiva do DMT2 (EIZIRICK; CNOP, 2010; MA; ZHAO; TURK, 2012; COSTES et al., 2013).

Indivíduos com obesidade, particularmente aquela caracterizada pelo excesso de tecido adiposo na região visceral, apresentaram maior incidência de RI, a qual é base para a denominada Síndrome Metabólica (SM), reunindo diferentes anormalidades metabólicas, tais como, dislipidemia, intolerância à glicose e doenças cardiovasculares (GALLAGHER; LEROITH; KARNIELI, 2010; PREIS et al., 2010). A obesidade associada à SM favorece a instalação precoce do DMT2 e a deterioração da função endócrina do pâncreas, em particular a falência das células- β (PENALVA, 2008), culminando em falha na ação e/ou secreção da insulina estimulada pela glicose.

O principal estímulo para síntese e secreção de insulina nas células- β pancreáticas é a glicose. Em estados pós-prandiais, ocorre aumento da concentração plasmática de glicose, a qual é internalizada pelas células- β pancreáticas via proteína transportadora de glicose, denominada GLUT (*Glucose transporter*). Em roedores, o subtipo 2 (GLUT2) é responsável pela difusão de glicose nas células- β pancreáticas. Entretanto em condições de SM tanto em animais experimentais como em humanos, há redução na sensibilidade deste transportador, de modo que apenas concentrações excitatórias de glicose desencadearão a secreção de insulina. Logo, em humanos esta função é desempenhada pelos subtipos 1 e 3 (GLUT1 e 3) (MACHADO, 1998; MACHADO; SCHAAN; SERAPHIM, 2006).

Em condições normais, a secreção de insulina ocorre pelo estímulo da glicose nas células- β . Desta forma, a entrada da glicose nas células- β estimula o metabolismo intracelular, aumentando a produção de ATP, levado ao fechamento

dos canais de potássio sensíveis ao ATP (KATP). Conseqüentemente, ocorre a despolarização da membrana celular, permitindo a entrada de Ca^{+2} através dos canais de Ca^{+2} voltagem-dependentes, culminando na exocitose dos grânulos de insulina e secreção de insulina (FÉLIX-MARTÍNEZ et al., 2014). Adicionalmente, alterações na concentração de glicose nas células- β pancreáticas atuará no controle da proliferação celular, podendo ocasionar hiperplasia, hipertrofia e/ou apoptose destas células (THORENS, 2014; THORENS, 2015). Além disso, sabe-se que a massa celular das células- β , em situações normais, pode também ser controlada pela ação parassimpática (LUBACZEUSKI et al., 2015).

A secreção de insulina iniciada pela glicose é ajustada pela demanda fisiológica e por outros fatores, tais como hormônios e neurotransmissores, considerados moduladores da re de insulina. Neste sentido, destacam-se os efeitos do sistema nervoso autônomo (SNA), sendo a acetilcolina (ACh) liberada pelos terminais vagais da subdivisão parassimpática, o principal agente potencializador da secreção de insulina iniciada pela glicose (WILCOX, 2005). O controle dos ramos autonômicos para o pâncreas endócrino é exercido por núcleos hipotalâmicos, destacando-se o núcleo hipotalâmico ventral (NHV) e a área lateral hipotalâmica (ALH), os quais exercem controle da atividade dos ramos autonômicos periféricos, incluindo o pâncreas endócrino. Dentro deste contexto, é importante reconhecer que muitos modelos de indução à obesidade em roedores, assim como a obesidade em humanos, apresentam um desajuste da atividade autonômica, particularmente caracterizada pela hiperativação vagal, resultando em hiperestimulação da secreção de insulina (GILON; HENQUIN, 2001). A ação insulínica da ACh sobre as ilhotas pancreáticas, em particular a célula- β pancreática, depende da presença de um receptor de membrana, acoplado à proteína G farmacologicamente classificado como receptor muscarínico subtipo 3 (RM3) (GILON; HENQUIN, 2001). Embora outros subtipos de receptores muscarínicos também tenham sido encontrados nas células- β pancreáticas, as cascatas de sinalização ativadas pelo RM3 têm um efeito predominante sobre o controle secretor de insulina, bem como, podem acionar vias de proliferação celular nas células- β pancreáticas (RIBEIRO et al., 2013; MIRANDA et al., 2014).

Desta forma, a perfeita interação entre os fatores estimuladores – secretagogos, destacando-se a glicose - e os agentes potencializadores, como a

Ach, são necessários para o controle adequado da secreção de insulina e conseqüentemente para a homeostase da glicose e lipídios (WILCOX, 2005; GUSTAFSON et al., 2015). É evidenciado que o indivíduo obeso com RI aparenta ter uma sensibilidade maior ao estímulo colinérgico, e, conseqüente, maior secreção de insulina, quando comparado a um indivíduo magro (GUSTAFSON et al., 2015). Em roedores diabéticos, foi observada a diminuição de receptores RM3, podendo ser corrigido com a suplementação de VD nestes animais. Assim, a administração de VD pode melhorar a homeostase glicêmica por modular a expressão dos receptores RM3 nas células- β pancreáticas, corrigindo a regulação funcional colinérgica (KUMAR et al., 2009). Balbo e colaboradores (2002; 2007), observaram que a vagotomia subdiafragmática em ratos obesos pela lesão hipotalâmica por glutamato monossódico (MSG), melhorou a progressão da obesidade e da tolerância à glicose, paralelamente houve um ajuste sobre a hipersecreção de insulina pelas células- β pancreáticas em resposta à glicose. Isto evidencia a participação do SNP sobre a função exacerbada das ilhotas pancreáticas, o que está relacionado às comorbidades observadas em roedores obesos-MSG.

Para compreender a fisiopatologia da obesidade e suas comorbidades, particularmente o controle secretor de insulina, diferentes modelos de obesidade experimental em roedores têm sido estudados (MACHO et al., 2000; DIEMEN; TRINDADE; TRINDADE, 2006). Desta forma, o tratamento neonatal com MSG, um aminoácido excitatório para o sistema nervoso central (SNC), quando administrado em elevadas concentrações, induz a lesões neurais, em especial no hipotálamo (OLNEY, 1969). A obesidade induzida pelo MSG caracteriza-se pela expansão excessiva do tecido adiposo, hiperinsulinemia, intolerância à glicose e RI, reproduzindo, portanto, os elementos centrais da SM que ocorre em humanos (MARMO et al., 1994; DOLNIKOFF et al., 2001). Adicionalmente, este modelo de obesidade obtido pela lesão hipotalâmica também apresenta alterações da secreção de insulina, resultado de uma hiperatividade vagal sobre o pâncreas endócrino (LUBACZEUSKI et al., 2015). Assim, ilhotas pancreáticas isoladas de ratos obesos-MSG apresentam hipersecreção de insulina em resposta à glicose, acompanhado de falha no efeito insulínico da ACh (BALBO et al., 2000; LUBACZEUSKI et al., 2015). Adicionalmente, ilhotas pancreáticas de ratos obesos-

MSG apresentam hipertrofia e redução do número de ilhotas no pâncreas endócrino (PRENTKI; NOLAN, 2006; LUBACZEUSKI et al., 2015).

Embora nas últimas décadas nosso conhecimento sobre metabolismo energético, sensibilidade à insulina, assim como o controle secretor da insulina tenha aumentado, até o presente momento não foi possível impedir o crescente avanço mundial da obesidade e evitar a progressão de suas comorbidades, como a instalação do DMT2. Assim, fica evidente que o tratamento para a obesidade continua sendo um dilema para profissionais e gestores da área da saúde; uma vez que a obesidade e as enfermidades que esta agrega, consomem importante parte do orçamento público destinado ao combate de doenças crônicas não transmissíveis (FLOR et al., 2015).

Evidenciada como um problema de saúde pública, a obesidade alcança proporções alarmantes a cada ano, em todas as regiões do mundo, sua prevalência em adultos quase dobrou no período de 1980 até 2014 (WHO, 2014). Segundo a Organização Mundial da Saúde, em 2014, mais de 1,9 bilhões de adultos acima de 18 anos estavam com sobrepeso, e destes, 600 milhões já eram considerados obesos (ZHANG et al., 2013; WHO, 2014). Observado pela pesquisa Vigitel (2006/2016), o excesso de peso no Brasil cresceu 26,3% em 10 anos, passando de 42,6% em 2006, para 53,8% em 2016. No Brasil, entre indivíduos de 30 a 70 anos, a prevalência de DM é de 7,6%. O DMT2 engloba aproximadamente 90% dos casos de DM na população, seguido pelo *diabetes mellitus* tipo 1 (DMT1), com 8% (SESA/PR, 2014).

Apesar de ser um problema de saúde recorrente, a obesidade tem sido amplamente explorada nacional e internacionalmente. Pesquisas buscam aprofundar os conhecimentos sobre os mecanismos de associação desta condição com alterações metabólicas, cuja prevalência aumenta simultaneamente (AZEVEDO; BRITO, 2012). A perda e o controle do peso corporal são essenciais na redução do risco de doenças metabólicas, principalmente DMT2 e doenças cardiovasculares. Para isso, estratégias têm sido desenvolvidas, a partir da tradicional recomendação da prática de atividade física e controle na dieta e alimentação, à utilização de medicamentos ou procedimentos cirúrgicos. Entretanto, a utilização de suplementos de VD têm obtido resultados positivos em modelos

experimentais, prevenindo o processo de adipogênese, por inibir a diferenciação dos pré-adipócitos no tecido adiposo branco (ROSS et al., 2004).

Frente ao exposto, questiona-se se “A suplementação crônica com VD poderá exercer efeitos sobre a obesidade e o controle secretor de insulina em ratos obesos-MSG?”. Até o presente momento não existem dados na literatura que mostrem a associação da suplementação crônica com VD sobre a obesidade-MSG e o controle secretor de insulina. Espera-se que a suplementação com VD possa reduzir o excesso de tecido adiposo, contribuindo para normalização da RI, melhorando a hiperinsulinemia, em particular, por modular o controle secretor de insulina e a morfologia do pâncreas endócrino.

REVISÃO GERAL DA LITERATURA

A pesquisa em questão avaliou o impacto da suplementação crônica com VD sobre a obesidade hipotalâmica induzida pelo glutamato monossódico, com enfoque sobre o controle secretor de insulina induzido em ilhotas pancreáticas isoladas. O texto a seguir foi organizado em tópicos, a fim de facilitar a compreensão do assunto.

Vitamina D (VD): homeostase glicêmica e obesidade

A vitamina D (VD) é um hormônio esteróide com importantes ações no metabolismo ósseo (NORMAN, 2008). Porém, desde a década de 80, efeitos da VD não relacionados às estruturas ósseas (NYOMBA et al., 1986) têm sido identificados em diferentes tecidos e órgãos; tais como efeitos imunomodulatórios (BRANON et al., 2008), efeitos sobre a pressão arterial (BEVERIDGE; WITHMAN, 2013), regulação dos processos de multiplicação e diferenciação celular (PERCEGONI; CASTRO, 2014), além de importante papel antioncogênico (CASTRO, 2011). Interessantemente, na última década, também, tem sido evidenciado o papel da VD sobre a homeostase energética, modificando a massa adiposa e a homeostase glicêmica (CASTRO, 2011; BAHT et al., 2014).

Conforme mencionado anteriormente, a VD é classificada como um hormônio esteróide, uma molécula lipossolúvel integrante de um extenso eixo metabólico. A VD pode ser encontrada naturalmente em alguns alimentos, tais como, óleo de fígado de bacalhau e peixes gordos, ou pode ser adicionada como complemento em outros alimentos, como leite ou farinhas. Adicionalmente, pode ser ingerida isoladamente (em cápsulas ou soluções) como suplementos alimentares (NORMAN, 2008). Entretanto, a principal fonte endógena desta vitamina é oriunda da biossíntese na pele, desencadeada pela exposição solar e posteriormente, por reações de hidroxilações, quando a VD é convertida na forma ativa, tornando-se biodisponível para executar suas funções (PERCEGONI; CASTRO, 2014).

A carência nutricional de VD é reconhecida em diversos países como um problema de saúde pública assim como a obesidade. Tal hipovitaminose tem sido diagnosticada tanto em adultos, mulheres, idosos e em crianças (HOLICK et al., 2006; GONZÁLEZ et al., 2015). Em relação à obesidade, até o presente momento, não há cura definitiva para esta doença, com isso, diferentes técnicas têm sido aplicadas no seu combate e suas comorbidades, tais como tratamentos comportamentais e psicológicos, farmacológicos, procedimentos cirúrgicos, e, recentemente a suplementação com compostos vitamínicos (GONZÁLEZ et al., 2015). Dentro deste contexto, pesquisas apontam a associação entre a hipovitaminose D, obesidade e suas comorbidades, em particular a resistência à insulina (RI). Diferentes estudos epidemiológicos e experimentais em roedores obesos, têm demonstrado que a diminuição na concentração plasmática de VD pode ser relevante para acentuar o problema da obesidade e o desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) (BISCHOFF et al, 2006; HOLICK, 2006; SNEVE; FIGENSCHAU; JORDE, 2008).

Assim, como em outras populações (GINDE; LIU; CAMARGO, 2009), estudos apontam que indivíduos adultos brasileiros apresentam baixas concentrações plasmáticas de VD (PREAMOR et al., 2008; SILVA et al., 2008). Segundo estas pesquisas, reduzidas concentrações plasmáticas de VD ocorrem em 60% dos adolescentes; entre 40 a 58% em jovens adultos e, na população idosa a deficiência de VD atinge de 42 a 83% dos indivíduos (PREAMOR et al., 2008; BANDEIRA et al., 2010; CASTRO, 2011). Embora ainda não exista um consenso na literatura médica e científica sobre os valores plasmáticos ideais de VD em humanos, conforme descrito em revisão por Hollick e colaboradores (2011), a *Endocrine Society (Estados Unidos)*, orienta que sejam considerados os valores plasmáticos de VD em três categorias: i) Deficiência: valores plasmáticos < 20 ng/mL; ii) Insuficiência: valores plasmáticos entre 21 – 29 ng/mL e iii) Suficiência: valores plasmáticos entre 30 – 100 ng/mL.

A carência nutricional de VD pode ser decorrente de diferentes situações, tais como, baixa ingestão alimentar, inadequada exposição solar, resultando em menor produção endógena ou problemas nas reações enzimáticas envolvidas na ativação da vitamina (BOUILLON et al, 2008; SNEVE; FIGENSCHAU; JORDE, 2008). As formas mais conhecidas da VD são o ergocalciferol (VD₂), de origem

vegetal e o colecalciferol (VD₃), produzido na pele a partir de uma reação em resposta aos raios ultravioletas após à exposição solar. Ambas as formas necessitam passar por modificações na sua estrutura química básica, para se tornarem biologicamente ativas. Deste modo, a VD₃ é hidroxilada no fígado pela enzima 25- α hidroxilase dando origem ao 25-hidroxicolecalciferol, ou 25(OH)D₃, sendo esta a forma circulante predominante da VD (CASTRO, 2011). Uma segunda hidroxilação ocorre, principalmente nos rins, monócitos, macrófagos e células dendríticas, de modo que a 25(OH)D₃ será hidroxilada pela enzima 1 α -hidroxilase, resultado em 1,25(OH)₂D₃, ou calcitriol, a forma biologicamente ativa da VD, responsável pelos efeitos fisiológicos em vários tecidos-alvo (PERCEGONI; CASTRO, 2014).

Considerando que a VD possa ter importantes efeitos sobre o metabolismo, por modular a adipogênese, bem como, a homeostase glicêmica (GONZALEZ et al., 2015), há grande interesse em compreender os efeitos da suplementação com VD sobre a obesidade, em especial o seu potencial em atenuar ou evitar a instalação de RI e do DMT2 (MARCOTORCHINO et al., 2014).

A principal característica da obesidade é o excesso de tecido adiposo, frequentemente oriundo do desajuste no metabolismo energético (GALGANI; DÍAZ, 2000). O tecido adiposo apresenta grande capacidade em estocar VD, deste modo, em situações em que há excesso de tecido adiposo pode haver baixa biodisponibilidade de VD (BAHT et al., 2014). Adicionalmente, elevada concentração plasmática de paratormônio (PTH) associado à redução plasmática de VD, podem levar ao aumento de cálcio (Ca⁺²) intracelular nos adipócitos, estimulando a lipogênese e resultando em expansão do tecido adiposo e ganho de peso. Entretanto, ainda não é claro se a carência de VD seria uma causa ou uma consequência da obesidade (TAKIISHI et al., 2010). A VD possui duas ações intracelulares importantes, que podem envolver o seu receptor intranuclear (VDR) em vários tecidos; ou que relaciona a vitamina com a calbindina, uma proteína ligante de cálcio citoplasmático. Desta maneira, a VD se liga ao VDR, responsável pela modulação da expressão gênica, agindo através da regulação extra e intracelular de Ca⁺², fazendo papel de mediador deste mineral em diversos tecidos como rins, encéfalo e intestinos. Além disso, ações endócrinas da VD envolvem a

ativação de VDR, mapeados em outros tecidos, incluindo os adipócitos e o pâncreas endócrino (GONZALEZ et al., 2015; VANGOITSENHOVEN et al., 2016).

Tem sido demonstrado que a menor ação da VD no hipotálamo resulta em aumento da sensação de fome (hiperfagia) e na diminuição do gasto energético, principais elementos desencadeadores do desequilíbrio energético, culminando no ganho de peso (SU; ZEMEL, 2008). A carência nutricional de VD no indivíduo obeso parece estar associada à alteração no controle secretor de insulina, prejudicando a homeostase glicêmica (HARINARAYAN et al., 2014). A diminuição da sensibilidade periférica à insulina na obesidade, a longo prazo, pode culminar na hipersecreção de insulina, levando ao quadro de hiperinsulinemia (GONZALEZ et al., 2015), sendo este um elemento chave para desenvolvimento do DMT2 (KAHN; HULL; UTZSCHNEIDER, 2006). Assim, um aspecto central na evolução do estado de obesidade e RI para a instalação definitiva do DMT2 é capacidade do pâncreas endócrino em sustentar a hipersecreção de insulina (SATIN et al., 2015). Já em 1984, experimento *in vitro* realizado por Yamaguchi e Takahashi, demonstrou que VD é capaz de induzir a síntese de insulina pelas células- β pancreáticas de ratos. Posteriormente, estudos em ratos e coelhos mostraram que a deficiência de VD diminui a secreção pancreática de insulina, sugerindo que níveis adequados de VD sejam essenciais para o correto funcionamento do pâncreas endócrino (TAKIISHI et al., 2010). Pittas e colaboradores (2007) confirmaram que a VD é fundamental no controle da homeostase glicêmica, de modo que a suplementação com a vitamina corrigiu o defeito na secreção de insulina, induzindo a síntese de insulina pelas células- β das ilhotas pancreáticas destes animais. Além dos receptores VDR, a presença da enzima 1α -hidroxilase tem sido confirmada no pâncreas endócrino de humanos e roedores (HEWISON et al., 2000).

Mais tarde, Lahbib e colaboradores (2015) certificaram que a suplementação com VD foi capaz de preservar a homeostase glicêmica em roedores que foram expostos a campos magnéticos a fim de simular o estado diabético. Desta forma sugere-se que a VD exerceu efeitos diretos sobre os receptores VDR nas células- β pancreáticas destes animais. Corroborando, Jamka e colaboradores (2015) descrevem que em modelos animais e em humanos, a deficiência de VD altera a síntese e a secreção de insulina. Deste modo, a carência desta vitamina pode agravar a intolerância à glicose, promovendo falhas na

secreção de insulina pelo pâncreas endócrino, contribuindo para o maior risco de DMT2. De fato, a literatura aponta que doses contínuas de VD podem ser capazes de corrigir a hiperglicemia induzida em ratos expostos a campos magnéticos para indução de DMT2. O resultado encontrado pode ser explicado por, provavelmente, a VD estimular a secreção de insulina (LAHBIB et al., 2015), como discutido por outros autores (YAMAGUCHI; TAKAHASHI, 1984; HEWISON et al., 2000; PITAS et al., 2007; TAKIISHI et al., 2010; JAMKA et al., 2015; SATIN et al., 2015). Neste sentido, é descrito e evidenciado o aumento da prevalência de DM em indivíduos com hipovitaminose D. As evidências da participação da VD nos processos de secreção e ação da insulina e no controle glicêmico sugerem que a VD deve ser mais um fator considerado tanto na prevenção como no tratamento do DMT2 (RUDNICKI; MOLSTED-PEDERSEN, 1997; SCHUCH; GARCIA; MARTINI, 2009).

Adicionalmente, ratos diabéticos suplementados com VD (12µg/Kg de peso corporal) apresentaram aumento da síntese e secreção de insulina pelas células-β pancreáticas. Neste estudo, a suplementação com VD foi capaz de restaurar a homeostase glicêmica e o peso corporal de ratos diabéticos, efeitos decorrentes da melhora na secreção e ação da insulina nos tecidos-alvo (KUMAR et al., 2011).

Além da presença dos VDR nas células-β, estas também possuem proteínas ligadoras de VD (DBP) (HEWISON et al., 2000), sugerindo que a VD possa influenciar a resposta insulínica ao estímulo da glicose direta ou indiretamente (MAESTRO et al., 2000). Dentro deste contexto, os mecanismos possivelmente responsáveis pelo controle da síntese e secreção de insulina induzidos por VD podem envolver o controle do influxo e da reserva de cálcio (Ca^{+2}) no citosol das células-β pancreáticas. Segundo estes estudos, os efeitos genômicos do VDR aceleram a clivagem da pró-insulina em insulina pelas endopeptidases cálcio-dependentes, o que, por sua vez, estimularia a liberação dos grânulos de insulina (ZIEROLD; MINGS; DELUCA, 2003).

Sabe-se ainda que a obesidade é uma condição associada a um processo inflamatório crônico (SHAW; HALL; WILLIAMS, 2005), o qual contribui para a RI e para a deterioração do pâncreas endócrino (KAHN; HULL; HUTZSCHNEIDER, 2005; CASTRO et al., 2014). Assim, a exposição das células-β pancreáticas à citocinas pró-inflamatórias, como ocorre na obesidade, induz a

apoptose destas células, reduzindo a massa celular de células- β e, conseqüentemente, a secreção de insulina (EIZIRIK; CARDOSO; CNOP, 2008). A administração de VD melhora os marcadores de inflamação sistêmica, que são comumente encontrados na obesidade e DMT2, preservando a estrutura e função das células- β pancreáticas (GIULIETTI et al., 2007). Corroborando com estes achados, a suplementação com VD pode proteger diretamente as células- β contra a morte celular por estar envolvida na regulação celular do sistema imunológico (RIACHY et al., 2002). Além disso, diminui a vulnerabilidade das ilhotas pancreáticas de humanos, frente à destruição induzida por citocinas *in vitro* (RIACHY et al., 2002; RIACHY et al., 2006). Além disso, o tratamento de ilhotas pancreáticas com VD diminui a migração e recrutamento das células T e macrófagos para as ilhotas pancreáticas e deste modo, diminui a produção de interleucinas pró-inflamatórias intra-ilhota (GYSEMANS et al., 2005).

Portanto, a redução de VD tem sido associada ao aumento do risco de SM e DMT2 (CHIU et al., 2004; TAKIISHI et al., 2010). Deste modo, estabelecer as concentrações plasmáticas, bem como, caracterizar o efeito direto da VD sobre o pâncreas endócrino, principalmente em grupos de risco como obesos, indivíduos com SM ou DMT2 pode ser importante para atenuar ou reverter as comorbidades.

Secreção de insulina induzida por glicose

O pâncreas é uma glândula mista, com funções exócrina e endócrina, secretando, respectivamente, o suco pancreático, e os hormônios proteicos, tais como insulina, glucagon e polipeptídio pancreático (GUYTON; HALL, 2002). As ilhotas de *Langherans* ou ilhotas pancreáticas constituem a porção endócrina do pâncreas, compreendem menos de 2% do volume da glândula, e secretam pelo menos quatro tipos de hormônios proteicos, dos quais dois são fundamentais para a regulação metabólica: insulina e glucagon. Estruturalmente as ilhotas pancreáticas são constituídas do agrupamento de diferentes subtipos celulares sendo que, em termos quantitativos os três tipos celulares principais são: células alfa (α), beta (β) e delta (δ), que se distinguem por características morfológicas e secretórias (THORENS, 2014). As células- α secretoras de glucagon abrangem 25% do volume celular, seguidas pelas células- δ , secretoras de somatostatina, que

fazem parte de 10% do total de células da ilhota. Representando, 60 até 80% de células da ilhota estão as células- β pancreáticas situadas na porção central das ilhotas, responsáveis pela síntese e secreção de insulina. Além destes três tipos celulares principais, pode ser citada a célula PP, encontrada em pequeno número nas ilhotas pancreáticas, responsável pela secreção do hormônio PPP – Polipeptídico Pancreático (SHILLS et al., 2003).

A insulina é um hormônio fundamental no controle da homeostase glicêmica, assim o controle secretor de insulina é um dos eventos endócrinos mais estudados, em especial pela sua relação com umas das patologias mais comuns no mundo todo: o diabetes (RUTTER et al., 2015; SATIN et al., 2015). A síntese de insulina pelas células- β das ilhotas pancreáticas, no pâncreas endócrino, ocorre inicialmente como pré-pró-hormônio o qual será clivado no retículo endoplasmático formando a pró-insulina, sendo esta posteriormente clivada no aparelho de Golgi, originando a insulina, que será armazenada nos grânulos secretores das células- β pancreáticas. A insulina constitui-se de duas cadeias de polipeptídeos, denominadas cadeias A e B, unidas por duas pontes dissulfeto, onde cada cadeia é formada por 21 e 30 aminoácidos, respectivamente. Além disso, outro constituinte da insulina, o peptídeo C, apresenta como principal função alinhar as pontes de dissulfeto, mantendo ligadas as cadeias α -carboxiterminal e β -aminoterminal, permitindo o correto dobramento da molécula, levando à clivagem da pró-insulina. Em um processo ATP-dependente, a pró-insulina é transportada para o complexo de Golgi, até a formação dos grânulos de secreção, e, pela clivagem do peptídeo C, é convertida em insulina. Posteriormente, insulina e peptídeo C são armazenados separadamente e acomodados nos grânulos secretores (ORIÁ; BRITO, 2016). Uma vez secretada na corrente sanguínea, a insulina circula quase totalmente na forma não-ligada. Para iniciar seus efeitos sobre as células-alvo, a insulina fixa-se inicialmente a uma proteína receptora na membrana, evento que dará início à uma cascata de reações citoplasmáticas que resultarão em mudanças no fluxo de glicose ou no metabolismo celular, dependendo do tipo celular acionado (GUYTON; HALL, 2002; RUTTER et al., 2015).

As células- β pancreáticas são sensíveis à elevação de nutrientes no plasma, destacando-se a glicose, o mais potente estímulo para secreção da insulina (RUTTER, 2005). Embora seja o combustível primário para a maioria das

células do corpo, a passagem da glicose pela membrana plasmática é lenta. Este transporte é realizado a partir de difusão facilitada, a favor do gradiente de concentração do secretagogo, sendo necessária a presença de proteínas transportadoras denominadas transportadores de glicose (GLUT) (THORENS, 2014).

Em indivíduos saudáveis, a secreção de insulina estimulada pela glicose apresenta característica bifásica, uma vez que apresenta duas fases secretórias. A presença de concentrações estimulatórias de glicose dará início à “primeira fase” secretória de insulina, que é de grande amplitude, atingindo seu pico máximo após 4 minutos, sendo mantida por 6 a 10 minutos. Esta primeira fase é sustentada pelos grânulos previamente justapostos a membrana, denominado “*pool lábil*” de insulina. A “segunda fase” se dá mais lentamente mantendo-se enquanto houver hiperglicemia, com duração entre 30 a 120 minutos (MATHIAS; TORREZAN; GRASSIOLLI, 2009; BILOUS; DONELLY, 2014). A segunda fase depende da mobilização de grânulos que se movem de um estoque mais interior e também de nova insulina sintetizada, sendo mantida pelo aumento gradual no sinal de potencialização. Em vista disso, a secreção de insulina é proporcional ou equivalente à concentração plasmática de glicose (CHEN; PORTE, 1976; BILOUS; DONELLY, 2014).

Para que a glicose penetre nas células- β pancreáticas há necessidade da presença de um subtipo de proteína transportadora de glicose expressa na superfície celular, o GLUT-2, considerado um elemento central para a captação de glicose pelas células- β e importante mecanismo para secreção da insulina em resposta ao estímulo da glicose (MACHADO, 1998; THORENS, 2014). Ao penetrar na células- β via GLUT-2, a glicose é imediatamente fosforilada à glicose-6-fostato (G6P) pela enzima glicocinase, acelerando o metabolismo oxidativo e culminando com a elevação da razão ATP/ADP. O aumento do ATP intracelular resulta em fechamento dos canais de potássio (K^+) sensíveis ao ATP (K-ATP), promovendo oscilação do potencial de membrana que leva ao influxo de Ca^{+2} , através dos canais de Ca^{+2} -voltagem-dependentes. O aumento do Ca^{+2} citosólico ativará a maquinaria excitotica, resultando em liberação pulsátil de insulina (WILCOX, 2005; SZOLLOSI et al., 2007). Importante ressaltar que o Ca^{+2} é um mineral indispensável para várias reações celulares, de modo que sua concentração é regulada pelo PTH e

pela própria VD. A reabsorção intestinal de Ca^{+2} é aumentada pela VD, que também melhora a captação de cálcio por vários outros tecidos, dentre eles as ilhotas pancreáticas. Desta forma, o Ca^{+2} , assim como a VD, tem participação essencial na secreção de insulina induzida por glicose, considerando a necessidade deste mineral no meio intracelular para liberação dos grânulos de insulina das células- β pancreáticas e posterior exocitose (HENQUIN, 2000; HENQUIN, 2009). Embora o aumento do Ca^{+2} livre intracelular seja o gatilho primário para secreção de insulina, estudos indicam que a glicose possa estimular a secreção de insulina por vias independentes dos canais de K-ATP, sem elevação do Ca^{+2} (BRATNOVA-TOCHKOVA et al., 2002; ROCCA et al., 2008; MATHIAS; TORREZAN; GRASSIOLLI, 2009).

Uma vez liberada na corrente sanguínea, a insulina será responsável por ações diretas na captação de glicose em tecidos sensíveis à insulina, em especial o tecido adiposo e muscular; denominados dependentes de insulina (MAECHLER; WOLLHEIM, 2000). Adicionalmente, a insulina tem marcante ação hepática, controlando o armazenamento de glicose na forma de glicogênio hepático, ocasionando a glicogênese. Da mesma forma, a insulina determina a lipogênese no tecido adiposo branco e age sobre o controle da ingestão alimentar a nível hipotalâmico (SATIN et al., 2015). Em estado basal ou durante o jejum, as células- β pancreáticas secretam 0,25 a 1,5 unidades de insulina por hora, quantidade suficiente para permitir a entrada de glicose nas células. Este mecanismo impede a hidrólise descontrolada de triglicerídeos e limita a gliconeogênese, por manter normais as concentrações de glicose plasmática durante o estado não alimentado (CHEN; PORTE, 1976; THORENS, 2015). Deste modo, a adequada secreção e ação da insulina são primordiais na prevenção do rompimento da homeostase glicêmica e lipídica, contribuindo para o controle do peso corporal, evitando assim, a instalação de quadros patológicos como a SM e o DMT2.

A síntese e secreção de insulina desencadeadas pelos nutrientes, será modulada por agentes não-nutrientes, os quais são denominados de agentes potencializadores ou insulinoatrópicos (GILON; HENQUIN, 2001; MATHIAS; TORREZAN; GRASSIOLLI, 2009; LUBACZEUSKI et al., 2015). Dentre os diversos agentes potencializadores destacam-se os agentes neurais, em especial a acetilcolina (Ach), um neurotransmissor primário liberado pelo sistema nervo

parassimpático (SNP), um ramo do sistema nervoso autônomo (SNA) (THORENS, 2003; ASHCROFT, 2006; MATHIAS; TORREZAN; GRASSIOLLI, 2007).

O sistema nervoso autônomo no controle glicêmico

A participação do SNA na homeostase metabólica envolve o controle de diferentes funções viscerais, de modo que este sistema integra a entrada sensorial da região visceral, somática em centros neurais localizados principalmente no tronco encefálico e hipotálamo. Assim, o SNA opera através de reflexos viscerais cujos sinais sensoriais dos órgãos ativarão regiões centrais autonômicas que responderão de modo subconsciente aos órgãos para modular suas atividades ou funções (RODRIGUEZ-DIAZ et al., 2014).

A participação da regulação metabólica pelo SNA pode ser de forma direta ou indiretamente, de modo que na homeostase glicêmica, este sistema atua no controle da função do pâncreas endócrino, especialmente, na secreção de insulina (MATHIAS; TORREZAN; GRASSIOLLI, 2009). O SNA divide-se em dois ramos opostos, com ações antagônicas: SNA simpático e SNA parassimpático, por onde os sinais são transmitidos por todos os órgãos e tecidos. Entretanto, a inervação torácica e a da região abdominal são, em sua grande maioria, feitas por axônios do ramo parassimpático do nervo vago (RODRIGUEZ-DIAZ et al., 2014).

Sabe-se que a excitação vagal estimula a secreção pancreática de insulina. De tal modo que o sistema endócrino, particularmente as ilhotas pancreáticas, possui um complexo mecanismo que as torna capazes de detectar alterações na glicemia, e com isso, sintetizar e secretar o hormônio adequado (RODRIGUEZ-DIAZ et al., 2014). As ilhotas pancreáticas são amplamente inervadas por terminais parassimpáticos do nervo vago (AHREN, 2000), que auxilia no ajuste do equilíbrio glicêmico durante a ingestão alimentar ou estresse (TEFF, 2011). Desta forma, a função da célula- β é modulada por receptores da membrana celular, sendo estes ativados por neurotransmissores ou hormônios (AHREN, 2000; RIBEIRO et al., 2013). No entanto, esta secreção, corresponde à “fase cefálica”, ocorrendo previamente à ingestão, digestão ou absorção do alimento, sendo assim estimulada pelos sentidos, visão e/ou odor, caracterizando a fase pré-absortiva, de modo que são enviadas sinalizações do cérebro pouco antes de ocorrer a alteração

da glicemia. Os efeitos da Ach sobre a células- β pancreáticas depende da presença de receptores de membrana acoplados a proteína G subtipo q/o (PRTGq/o) denominados receptores muscarínicos. O principal subtipo de receptor muscarínico na célula- β pancreática é RM3, cujo acionamento promove via PRTGq/o a ativação da fosfolipase C (PLC), a qual gera dois segundos mensageiros intracelulares: o diacilglicerol (DAG) e ao inositol-3-fostato (IP3) (GODFREY; MATSCHINSKY, 1975; SCHUSDZIARRA, 1983), que posteriormente, ativarão a proteína C quinase (PKC), fosfolipase A2 (PLA2) e mobilizarão o Ca^{+2} da reserva intracelular, com posterior potencialização da secreção de insulina (AHREN, 2000; WILCOX, 2005; RIBEIRO et al., 2013). Destaca-se que a ação da VD através da sua união aos seus receptores VDR formará um complexo heterodimérico com o receptor-X-retinóide (RXR), podendo assim exercer *up* ou *douwn-regulation* nos genes alvo. Além disso, a VD exerce ações não-genômicas, que podem ser observadas, principalmente, na ativação de moléculas sinalizadoras, como a PLC, PLA2, fosfatidil-inositol-3-quinase (PI3K), p21ras, e a rápida geração de novos segundos mensageiros como Ca^{+2} , AMPc, ácidos graxos e 3-fosfoinositídeos, como fosfatidilinositol 3,4,5 trisfosfato, acompanhado pela ativação de proteínas quinases como PKA, src, proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK), PKC, e Ca^{+2} -calmodulina quinase II (FLEET, 2004). Em pesquisa realizada em camundongos C57BL/6, foi sugerido que a VD pode estar associada à regulação da expressão da enzima fosfodiesterase (PDE) nas ilhotas pancreáticas. Assim, a PDE irá exercer a importante função reguladora do AMPc, conseqüentemente da atividade da PKA no pâncreas endócrino (WOLDEN-KIRK et al., 2013; MIRANDA et al., 2014).

Adicionalmente, sabe-se que no estado pós-prandial, a ativação dos nervos eferentes do SNP aumenta a ação da insulina nos tecidos-alvo (MACEDO et al., 2014). Entretanto, a atividade dos neurônios hipotalâmicos sensíveis à glicose não apenas influencia a função do pâncreas endócrino, mas altera o metabolismo periférico da glicose e a produção de glicose hepática, favorecendo a homeostase glicêmica (RODRIGUEZ-DIAS, 2014).

Por outro lado, a subdivisão do sistema nervoso simpático (SNS) via catecolaminas (adrenalina e noradrenalina), promove redução da secreção de insulina induzida por glicose (TEFF, 2008); um efeito mediado primariamente pelos α -2-adrenoreceptores (WILCOX, 2005).

Além de promover potencialização da secreção de insulina induzida por glicose, a Ach regula a proliferação das células- β pancreáticas (IMAI et al., 2008). Neste sentido, a hipertonia do nervo vago e a elevação da liberação de Ach é um evento marcante durante o desenvolvimento da obesidade, causando proliferação das células- β no pâncreas endócrino e contribuindo para instalação da hiperinsulinemia. A hiperinsulinemia, por sua vez promove expansão exagerada do tecido adiposo e a longo prazo produz RI e morte das células- β pancreáticas (MARTINS et al., 2008); dois processos chaves na instalação definitiva do DM2T. A secreção de insulina é modulada pela atividade autonômica no pâncreas endócrino (GREEN; STEVENS; FELDMAN, 1999), um efeito que pode ser alterado pela VD (KUMAR et al., 2011; CHIH-CHIEN et al., 2012). Assim, foi demonstrado em coelhos diabéticos que a expressão do receptor muscarínico subtipo 3 (RM3) é elevada pela suplementação com VD. Conforme será descrito adiante, o RM3 é o principal receptor ativado pela acetilcolina (Ach) liberada pelos terminais vagais parassimpáticos, tendo importante efeito insulínico sobre as células- β pancreáticas (VERSPOHL et al., 1990; AHRÉN, 2000). Os autores também destacaram a melhora na secreção de insulina e a tolerância à glicose intravenosa, após suplementação com VD em coelhos que apresentavam hipovitaminose D (NYOMBA; BOUILLON; DE MOOR, 1984). Kumar e colaboradores (2011) constataram que a suplementação com VD desempenha um papel fundamental na regulação do receptor muscarínico RM3 através dos VDR presentes no pâncreas, revertendo a regulação colinérgica alterada e assim, melhorando a síntese e secreção de insulina.

Obesidade, resistência à insulina e síndrome metabólica

A obesidade é uma doença de caráter multifatorial, deste modo eventos ambientais e genéticas influenciam a magnitude do ganho de peso e a gravidade das enfermidades desenvolvidas em decorrência da obesidade. Todavia, conforme apontam diversos estudos, os bons hábitos alimentares e a prática de atividade física regular, são elementos centrais na atual epidemia mundial de obesidade (GRUNDY et al., 2005; LORENZO et al., 2007).

A obesidade é considerada um problema de saúde pública que alcança proporções alarmantes a cada ano em todas as regiões do mundo, sua prevalência em adultos quase dobrou desde 1980 até 2014 (WHO, 2014). Dados do Ministério da Saúde (2013) revelam que 51% da população brasileira está acima do peso, valor superior ao encontrado em 2006 (43%). Entre os sexos, observa-se que 54% dos homens encontram-se com sobrepeso, e entre as mulheres, o índice chega a 48% (IBGE, 2014). Além disso, na cidade de Curitiba/PR, o número de sobrepeso encontrado foi de 54,2% da população. Enquanto que em 10 anos, a incidência de obesidade aumentou 60%, sendo em 2006, 11,8%, alcançando 18,9% em 2016 (VIGITEL, 2016). Dados do último censo realizado pela Secretaria da Educação do Paraná, apontou que 8,5% dos alunos da rede estadual de ensino encontram-se obesos, e para os com sobrepeso o valor aumenta para 18% dos alunos (SESA/PR; 2016).

A obesidade é frequentemente caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal, a qual exerce efeitos deletérios para boa saúde e bem-estar dos indivíduos, culminando com redução da qualidade e expectativa de vida. O aumento do tecido adiposo ocorre de maneira simples, em virtude de um desequilíbrio entre a ingestão calórica e o gasto energético (SCHWARTZ; PORTE JR, 2005). A expansão do tecido adiposo é um notável processo caracterizado pelo aumento do tamanho dos adipócitos (hipertrofia), e pelo aumento do número destas células (hiperplasia). O tecido adiposo é um órgão endócrino ativo capaz de secretar hormônios, como leptina e adiponectina e citocinas pró-inflamatórias, tais como, o fator de necrose tumoral-alfa (TNF α) e interleucinas, que são conhecidos por contribuírem para inflamação vascular e sistêmica (ESPOSITO et al., 2003) e, cujos níveis, estão diretamente relacionados ao desenvolvimento de RI e da SM e, conseqüentemente, do DMT2. Deve ser salientado que durante a expansão do tecido adiposo, em particular aquele localizado na região abdominal, acentua-se o processo inflamatório e a RI, o que resulta na deposição ectópica de gordura, ou seja, ao acúmulo de gordura em outros tecidos, como muscular e hepático (GRUNDY et al., 2005). Isto pode ser explicado pelas diferentes características entre o tecido adiposo visceral e o subcutâneo. O tecido adiposo visceral é mais ativo do ponto de vista metabólico, no que diz respeito ao *turnover* de ácidos graxos livres, de modo que o aumento dos ácidos graxos livres irá promover RI em nível

celular e aumentará a produção hepática de VLDL. Enquanto a cetogênese permanece tipicamente reprimida pela hiperinsulinemia (GIORGINO; LAVIOLA; ERIKSSON, 2005). Deste modo, caracterizar o perfil de distribuição do tecido adiposo torna-se importante para entender a progressão da obesidade e suas comorbidades, tais como dislipidemia e hiperglicemia (GRUNDY et al., 2005; GUSTAFSON et al., 2015).

Obesidade, RI, intolerância à glicose, dislipidemia e alterações cardiovasculares caracterizam a Síndrome Metabólica (SM), um quadro que favorece a instalação de doenças relacionadas ao metabolismo, em especial aquelas que rompem a homeostase glicêmica, tal como o DMT2 (ALBERTI; ZIMMET; SHAW, 2005; CORNIER et al., 2008). Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2016) indicam que 8,1% da população brasileira pode ser classificada como portador de DMT2. Mundialmente são cerca de 387 milhões de pessoas com DMT2, e segundo estimativas até o ano de 2035, este número poderá alcançar 471 milhões de pessoas com a doença no mundo todo (KRAEGEN; COONEY; THOMPSON, 2001; SBD, 2015-2016). Mecanismos que causam a obesidade ainda não estão bem esclarecidos. Todavia, está claro que o excesso de tecido adiposo, por promover o aumento da liberação de citocinas pró-inflamatórias, favorece a RI, a qual exige adaptações secretórias e morfológicas sobre o pâncreas endócrino, culminando na hiperinsulinemia. A longo prazo, tais alterações irão promover a deterioração das funções das células- β pancreáticas, alterando a síntese e secreção de insulina, favorecendo o aparecimento do DMT2 (SHAW et al., 2005; HOSSEIN-NEZHAD; HOLICK, 2011).

De fato, a insulina apresenta papel fundamental na homeostase glicêmica. Além desta função primordial, apresenta ação anti-inflamatória, sendo que a RI é caracterizada pela reduzida utilização de glicose pelos tecidos insulino-sensíveis gerando hiperglicemia e o rompimento da homeostase glicêmica; situação que gera estresse oxidativo tecidual e eleva a inflamação local (MACHADO; SCHAAN; SERAPHIM, 2006). De acordo com a Secretaria de Estado de Saúde do Paraná (SESA-PR), houve um expressivo aumento no número de óbitos em decorrência do *diabetes mellitus* (DM) no estado, passando de 2.730 casos em 2008, atingindo 3.314 óbitos em 2014.

A importância do tecido adiposo para a RI e suas comorbidades pôde ser evidenciada por estudo mostrando que perdas modestas de tecido adiposo, correspondentes a 5% de massa corporal total, são suficientes para promover a diminuição do risco de desenvolvimento de doenças crônicas (ADA, 2002). Quando esta perda for superior a 5% da massa corporal e estiver associada a redução da circunferência da cintura, ocorre melhora da glicemia de jejum, do colesterol total e LDL-colesterol (ROCCA et al., 2008).

É fundamental a compreensão dos mecanismos que levam à insuficiência das células- β das ilhotas pancreáticas em humanos e roedores obesos, visto que alterações nas funções podem estar associadas a doenças, particularmente o DMT2. Considerando que esta insuficiência se desenvolva nas ilhotas pancreáticas e que estas estão passando por um processo de compensação secretória imposta pela RI em decorrência aos efeitos da obesidade, a massa celular de células- β sofrerá uma expansão, pelo aumento forçado da biossíntese de insulina na tentativa de corrigir a hiperglicemia (CNOP et al., 2005; PRENTKI; NOLAN, 2006). Embora a falha das células- β possa acontecer em uma ou em um pequeno número destas células, a disfunção destas poderá se instalar. Os prováveis mecanismos de morte prematura das células- β incluem disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, disfunção no ciclo dos triglicerídeos e ácidos graxos livres, e glicolipototoxicidade. Uma vez estabelecida a hiperglicemia, outros processos relacionados à glicolipototoxicidade, além da manifestação de um ambiente diabético podem ser desencadeados, tais como, inflamação das ilhotas pancreáticas, glicosilação, formação de depósitos amilóides, acelerando a morte de células- β , resultando em severas alterações fenotípicas nestas células e a perda de massa celular, principalmente por apoptose (GODSLAND; JEFFS; JOHNSTON, 2004; PRENTKI; NOLAN, 2006). Em modelos experimentais que apresentam RI ou DMT2, bem como em humanos com este quadro patológico, já foi observado que ambos apresentam massa celular de células- β pancreáticas reduzida, de modo que fatores humorais e endócrinos podem ser importantes na manutenção deste tecido (NIELSEN et al., 2001).

Acredita-se que a RI, na maioria dos casos em humanos, se manifeste em nível celular através de defeitos pós-receptor na sinalização da insulina. Possíveis mecanismos como *down-regulation*, deficiências ou polimorfismos

genéticos, na fosforilação da tirosina, no receptor de insulina; proteínas IRS ou PIP3-quinase, ou pode envolver anormalidades na função dos transportadores de glicose, GLUT-4 (WHEATCROFT et al., 2003). Os efeitos da RI são variáveis de acordo com o tecido/órgão em que se manifesta e seu grau de dependência de insulina para os processos metabólicos (REAVEN, 2004).

A SM, portanto, representa um importante problema de saúde pública, que se não receber adequadas intervenções, poderá sobrecarregar ainda mais o frágil sistema de saúde pública do país. Alterações qualitativas nos hábitos alimentares podem reduzir o impacto da obesidade sobre a RI, porém ainda é indispensável que se busquem ferramentas alternativas que possam oferecer resultados mais expressivos no controle do excesso de peso, assim, recuperar carências nutricionais, como por exemplo através da suplementação alimentar com VD. Paralelamente a isso, a preservação da massa celular pancreática e a funcionalidade do pâncreas endócrino, são essenciais para compreender a progressão de anormalidades no controle secretor de insulina, evitando ou atenuando os quadros de RI, intolerância à glicose e a instalação de DMT2.

Indução de obesidade hipotalâmica por glutamato monossódico

Modelos de obesidade experimental são propostos a fim de investigar características metabólicas e hormonais na instalação de quadros patológicos frequentes em indivíduos obesos, no intuito de desenvolver procedimentos mais efetivos para prevenção e tratamento de doenças e assim, promover a melhora na qualidade e expectativa de vida destes indivíduos (DIEMEN; TRINDADE; TRINDADE, 2006).

A obesidade hipotalâmica é a mais conhecida entre os modelos neurais (ELFERS; RALSTON; ROTH, 2011), podendo ser induzida pela administração neonatal de elevadas doses de glutamato monossódico (MSG). O MSG, é uma das formas do aminoácido dicarboxílico, L-glutamato, cujo uso é frequente na culinária, como condimento alimentar utilizado para realçar o sabor dos alimentos (BETRAN et al., 1992). Por ser o principal neurotransmissor excitatório do SNC, o MSG em excesso possui a capacidade de destruir áreas hipotalâmicas, afetando

primariamente o núcleo arqueado (ARQ) e eminência mediana (EM) (SCHWARTZ; PORTE JR, 2005).

Embora o maior número de pesquisas relacionando o MSG com a obesidade seja de cunho básico e experimental em roedores, o aumento do uso deste aditivo na indústria alimentar aumentou de 200 mil toneladas em 1969, para 800 mil toneladas por ano em 2001 (HERMANUSSEN et al., 2006). Além disso, o crescente consumo indiscriminado de alimentos industrializados (por humanos) está associado ao aumento da prevalência de obesidade em vários países (HERMANUSSEN et al., 2006; VON DIEMEN; TRINDADE, 2010). Autores acreditam que uma das hipóteses para a obesidade infantil seria a exposição das gestantes ao MSG, indicando consumo frequente deste aminoácido, o que poderia causar algum tipo de lesão hipotalâmica ainda enquanto no útero materno. Entretanto, há na literatura um consenso sobre a o controle pela barreira placentária materna que controla a passagem de MSG a partir do plasma materno, sendo metabolizado antes de atingir a circulação do feto (BEYREUTHER et al., 2007). Insawang e colaboradores (2012) observaram que o consumo via oral de MSG por humanos em doses superiores 5 g/dia está associado ao aumento dos valores de insulina plasmática com prevalência de resistência à insulina, além de maior risco para o desenvolvimento de SM. Adicionalmente, pesquisa conduzida em humanos por He e colaboradores (2011) apresentou que o consumo de alimentos com adição de MSG está associado à maior ingestão alimentar, visto o aumento da palatabilidade dos alimentos, e ainda à diminuição na sensibilidade à insulina ou levando à resistência à leptina, sendo ambos os fatores diretamente relacionados ao sobrepeso e obesidade.

Pesquisas com animais submetidos a elevadas doses de MSG durante o período neonatal mostram que estes desenvolvem ao longo da vida, intolerância à glicose, hiperinsulinemia, RI, dislipidemia e complicações cardiovasculares que estão associadas à maior quantidade de gordura corporal e mudanças no controle secretor de insulina pelo pâncreas endócrino (SCALFANI, 1984; BETRÁN et al., 1992; ANDREAZZI et al., 2009; LEITE et al., 2013; RIBEIRO et al., 2013). Além disso, é notório a redução no crescimento corporal, explicado pela desregulação do eixo hipófise-hipotálamo, reduzindo as concentrações do hormônio liberador do

crescimento (GHRH) e conseqüente diminuindo a concentração de GH circulante (MACHO et al., 2000; BALBO et al., 2007).

A expansão do tecido adiposo em ratos obesos-MSG está relacionada ao desequilíbrio entre as respostas lipolíticas, com aumento das atividades lipogênicas e síntese de ácidos graxos neste tecido (NASCIMENTO CURTI et al., 1991; DOLNIKOFF et al., 2001), que apresenta aumentada atividade da lipoproteína lipase – LPL no tecido adiposo dos depósitos retroperitoneal, epididimal e no fígado de ratos, ocorrendo ao mesmo tempo hipertrigliceridemia com aumento de ácidos graxos livres no plasma (ZHANG et al., 1994; MARMO et al., 1994; HIRATA et al., 2003).

A lesão hipotalâmica provocada pelo MSG resulta em desarranjo da atividade autonômica, caracterizada por elevada atividade parassimpática e reduzida atividade simpática, eventos diretamente relacionados ao comportamento hipoativo e ao menor gasto energético, com menor temperatura corporal e taxa metabólica basal (MOSS; MA; CAMERON, 1985; ELFERS; RALSTON; ROTH, 2011).

Em modelos experimentais de obesidade, uma das principais características encontradas é a hipersecreção de insulina (LEITE et al., 2013). Apesar de ainda não ser bem compreendida, a hiperinsulinemia de jejum observada em roedores obesos-MSG parece ocorrer pelo aumento da responsividade e trabalho compensatório destas células (KING; FROHMAN, 1982; MACHO et al., 2000; LEITE et al., 2013). Deste modo, quando a hipersecreção de insulina for corrigida em roedores obesos-MSG poderá ocorrer redução da obesidade, com melhora da RI e da tolerância a glicose. Poucos estudos exploram o controle secretor de insulina no pâncreas endócrino de roedores obesos-MSG. Em camundongos foi observado que a secreção de insulina induzida por glicose em ilhotas pancreáticas isoladas se manteve elevada, mesmo quando estimulada com baixas concentrações do secretagogo (BALBO et al., 2000). Ilhotas pancreáticas isoladas de roedores obesos-MSG apresentaram hipersecreção de insulina ao estímulo por doses excitatórias (8,3 e 16,7mM) de glicose, conforme encontrado por Leite et al. (2013). Em contrapartida, foi observado por Balbo et al. (2000), aumento global (14 vezes) na secreção de insulina em ilhotas isoladas de camundongos obesos-MSG quando estimuladas em diferentes concentrações de

glicose (5,6 e 16,7mM), enquanto o grupo controle apresentou aumento superior (28 vezes). Segundo os autores e demais pesquisas que obtiveram resultados similares, tal fato pode ser justificado pela hipertrofia ocorrida nas ilhotas pancreáticas dos animais submetidos ao MSG e, característica marcante no modelo experimental utilizado (ANDREAZZI et al., 2009; LEITE et al., 2013).

Em relação aos efeitos do MSG sobre o SNP de roedores, embora a secreção de insulina em resposta ao estímulo da glicose seja exacerbada nestes animais, Lubaczeuski e colaboradores (2015) observaram que a fração secretória realizada pelo estímulo colinérgico apresenta-se diminuída. Uma parcela deste resultado está relacionada, em parte, ao desequilíbrio da ação do SNA (SCOMPARIN et al., 2009).

Na tentativa de reduzir o estímulo vagal, foi observado que, após a vagotomia subdiafragmática em roedores obesos-MSG, a obesidade, intolerância à glicose e a hipersecreção de insulina induzida pela glicose puderam ser atenuadas ou evitadas, sugerindo participação do SNA no desenvolvimento dos distúrbios em roedores obesos-MSG (BALBO et al., 2002; BALBO et al., 2009).

Embora a hiperatividade vagal esteja bem estabelecida no modelo de obesidade MSG, seus efeitos sobre a expressão de receptores muscarínicos e vias intracelulares é contraditória. Por exemplo, estudo de Ribeiro e colaboradores (2013) mostrou que ilhotas pancreáticas de roedores obesos-MSG apresentam redução no conteúdo de RM3, associado a menor expressão da PKC e PKA. Segundo os autores, tal estado explica a diminuição da ação insulínica da ACh neste modelo e corrobora achados anteriores (BALBO et al, 2007) que sugerem que o desequilíbrio da ação do SNA em roedores obesos-MSG levaria à *down-regulation* do conteúdo de RM3 nestas células. Todavia, neste mesmo modelo experimental Miranda e colaboradores (2014), verificaram aumento na expressão dos receptores RM3 em ilhotas pancreáticas isoladas de roedores obesos-MSG. Para os autores, alterações na expressão ou atividade de outros subtipos de RM explicam a menor efeito colinérgico. Assim, fica evidente que, até o presente momento o estado funcional de ilhotas pancreáticas de roedores MSG não pode ser completamente explicado pelos achados moleculares.

Diversos estudos têm demonstrado que, apesar da lesão hipotalâmica, a obesidade MSG é responsiva a diferentes métodos de tratamentos de suas

anormalidades metabólicas (MARTIN et al., 2016; SANCHES et al., 2016). Por exemplo, a suplementação em roedores obesos-MSG com o extrato das folhas secas de *Syzygi cumumini* (fruta conhecida no Brasil como jambolão), rico em polifenóis, reduziu a obesidade, promovendo melhora da ação lipolítica, na hiperinsulinemia, na sensibilidade à insulina e na tolerância à glicose (SANCHES et al., 2016). Similarmente, ratas obesas-MSG, alimentadas com dieta rica em ácidos graxos poli-insaturados apresentaram melhora tolerância à glicose, bem como na secreção de insulina induzida pela glicose, sugerindo melhora na função das ilhotas pancreáticas; eventos associados à diminuição nas reservas de gordura (MARTIN et al., 2016).

Não há, na literatura, estudos avaliando as concentrações plasmáticas ou ações da VD em roedores MSG. Recentemente, Nandan et al. (2017) desenvolveram uma pesquisa na qual o MSG foi administrado via oral; na dose de 5g/Kg de peso corporal associado a suplementação com VD, também via oral, na dose de 0,2mcg/Kg de peso corporal durante 15 dias. Ao final do período foi observada redução no ganho de peso dos animais MSG cossuplementados com VD, bem como reduzido consumo alimentar e a ingestão de água, sugerindo efeito de VD sobre obesidade induzida pelo MSG. Adicionalmente, quando receptores renais de glutamato são ativados podem ocorrer redução da 1 alfa hidroxilase renal e consequente queda nas concentrações plasmáticas de VD.

Todavia, considerando os ratos adultos submetidos ao MSG na fase neonatal, não há dados que indiquem efeitos da VD neste modelo, em particular não existem estudos sobre o controle secretor de insulina em ratos MSG suplementados com VD ao longo da vida.

REFERÊNCIAS

ADA – American Dietetic Association. Position of the American Dietetic Association: Weight Management. **Journal of American Dietetics Association**, v.102, p. 1145 - 1155, 2002.

AHREN, B. Autonomic regulation of islet hormone secretion—implications for health and disease. **Diabetologia**, v. 43, n. 4, p. 393 – 140, 2000.

ALEJANDRO, E. U.; GREGG, B.; BLANDINO-ROSSANO, M.; CRAS-MENEUR, C.; BERNAL-MIZRACHI, E. Natural history of beta-cell adaptation and failure in type 2 diabetes. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 42, p. 19 – 41, 2015.

ALBERTI, K. G. M. M.; ZIMMET, P.; SHAW, J. Metabolic syndrome—a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation.. **Diabetic Medicine** v, 23, p. 469–480, 2006.

ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R.S. **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. SciELO Books [online]. FIOCRU: Rio de Janeiro, 2002, 388p. Disponível em: <<http://static.scielo.org/scielobooks/sfwjtj/pdf/andrade-9788575413869.pdf>>. Acesso em: 10 abr. 2017.

ANDREAZZI, A E.; SCOMPARIN, D. X.; MESQUITA, F. P.; BALBO, S.L.; GRAVENA, C.; DE OLIVEIRA, J. C.; RINALDI, W.; GARCIA, R. M. G.; GRASSIOLLI, S.; MATHIAS, P. C. F. Swimming exercise at weaning improves glycemic control and inhibits the onset of monosodium L-glutamate-obesity in mice. **The Journal of Endocrinology**, v. 201, n. 3, p. 351 - 9, jun. 2009. Disponível em: <<http://joe.endocrinology-journals.org/content/201/3/351.long>>. Acesso em: 30 jun. 2016.

AZEVEDO, F. R.; BRITO, B. C. Influência das variáveis nutricionais e da obesidade sobre a saúde e o metabolismo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 58, n. 6, 2012. Disponível em:<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42302012000600018>. Acesso em: 10 jun 2016.

BAHT, M.; NOOLU, B.; QADRI, S. S.; ISMAIL, A. Vitamin D deficiency decreases adiposity in rats and causes altered expression of uncoupling proteins and steroid receptor coactivator. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 144, p. 304 – 312, 2014.

BALBO, S. L.; GRAVENA, C.; BONFLEUR, M. L.; MATHIAS, P. C. F. Insulin Secretion and Acetylcholinesterase Activity in Monosodium L-Glutamate-Induced Obese Mice. **Hormone Research**, v. 54, p. 186 – 191, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11416236>>. Acesso em: 28 jun. 2016.

BALBO, S. L.; BONFLEUR, M. L.; CARNEIRO, EM. M.; AMARAL, E. M.; FILIPUTTI, E.; MATHIAS, P. C. Parasympathetic activity changes insulin response to glucose and neurotransmitters. **Diabetes and Metabolism**, v. 28, n. 3, p. 13 – 17, 2002.

BALBO, S. L.; GRASSIOLLI, S.; RIBEIRO, R. A.; BONFLEUR, M. L.; GRAVENA, C.; BRITO, M. N.; et al. Fat storage is partially dependent on vagal activity and insulin secretion of hypothalamic obese rat. **Endocrine**, v. 31, p. 142 – 148, 2007.

BANDEIRA, F.; GRIZ, L.; FREESE, E.; LIMA, D. C.; THÉ, A. C.; DINIZ, E. T. et al. Vitamin D deficiency and its relationship with bone mineral density among postmenopausal women living in the tropics. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 54, n. 2, p. 227 – 232, 2010.

BERNARDIS, L.L.; PATTERSON, B. D. Correlation between “Lee index” and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **Journal of Endocrinology**, v. 40, n. 4, p. 527 – 528, abr. 1968. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4868415>>. Acesso em: 10 set. 2016.

BÉTRAN, M.A.; ESTORNELL, E.; BARBER, T.; CABO, J. Nitrogen metabolism in obesity induced by monosodium L-glutamate in rats. **International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders**, v. 16, n. 8, p. 555 - 564, ago. 1994. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1326485>>. Acesso em: 30 ago. 2016.

BEYREUTHER, K. BIESALSKI, H. K.; FERNSTROM, J. D.; GRIMM, P.; HAMMES, W. P.; HEINEMANN, U.; KEMPSKI, O.; STEHLE, P.; STEINHART, H.; WALKER, R. Consensus meeting: monosodium glutamate - an update. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 61, n. 3, p 304 – 313, 2007.

BILOUS, R.; DONELLY, R. **Handbook of Diabetes: Normal Physiology of Insulin Secretion and Action**. 4. Ed. 2014.

BISCHOFF-FERRARI, H. A.; GIOVANNUCCI, E.; WILLETT, W. C.; DIETRICH, T.; DAWSON-HUGHES, B. Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 84, p. 18 – 28, 2006.

BOADA CARRERA, C. A.; MARTÍNEZ-MORENO, J. M. Pathophysiology of diabetes mellitus type 2: beyond the duo “insulin resistance-secretion déficit”. **Nutrición Hospitalaria**, v. 28, n. 2, p. 78 – 87, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23834050>>. Acesso em: 25 set. 2016.

BOUILLON, R.; CARMELIET, G.; VERLIDEN, L.; et al. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. **Endocrine Reviews**, v. 29, n. 6, p. 726 – 776, 2008.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248 – 254, 1976.

BOURLON, P. M.; BILLAUDEL, B.; FAURE-DUSSERT, A. Influence of vitamin D3 deficiency and 1,25dihydroxyvitamin D3 on de novo insulin biosynthesis in the islets of the rat endocrine pancreas. **Journal of Endocrinol**, v. 160, n. 1, p. 87 – 95.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Portal da Saúde**, 2014. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2013/08/obesidade-atinge-mais-da-metade-da-populacao-brasileira-aponta-estudo>>. Acesso em: 17 ago. 2016.

BRASIL. **Vigitel Brasil 2016**, Ministério da Saúde, Brasília, 2016. Disponível em: <<https://www.endocrino.org.br/media/uploads/PDFs/vigitel.pdf>>. Acesso em: 18 maio 2017.

BRATANOVA-TOCHKOVA, T. K.; CHENH, H.; DANIEL, S.; et al. Triggering and augmentation mechanisms, granule pools, and biphasic insulin secretion. **Diabetes**, v. 51, n. 1, p. 83 – 90, 2002.

CASTRO, L. C. G. O sistema endocrinológico vitamina D. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 55, n. 8, 2011.

CASTRO, A. V. B.; KOLKA, C. M.; KIM, S. P.; BERGMAN, R. N. Obesity, insulin resistance and comorbidities – Mechanisms of association. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 58, n. 6, p. 600 – 609, 2014. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abem/v58n6/0004-2730-abem-58-6-0600.pdf>>. Acesso em: 05 jul. 2016.

CHEN, M.; PORTE, D. JR. The effect of rate and dose of glucose infusion on the acute insulin response in man. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 42, p. 1168 – 1176, 1976.

CHIH-CHIEN, S.; MIN-TSER, L.; KUO-CHENG, L.; CHIA-CHAO, W. Role of Vitamin D in Insulin Resistance. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, p. 01 – 11, 2012.

CHIU, K. C.; CHU, A.; GO, V. L.; et al. Hypovitaminosis D is associated with insulin resistance and beta cell dysfunction. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, v. 5, p. 820 – 825, 2004.

CNOP, M.; WELSH, N.; JONAS, J. C.; JORNS, A.; LENZEN, S.; EIZIRIK, D. L. Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. **Diabetes**, v. 54, n. 2, p. 97 – 107, 2005.

CORNIER, M. A.; HERNANDEZ, T. L.; LINDSTROM, R. C.; STEIG, A. J.; STOB, N. R.; PELT, R. E. V.; WANG, H.; ECKEL, R. H. The metabolic syndrome. **Endocrine Reviews**, v. 29, n. 7, p. 777 – 822, 2008. Disponível em: <<http://press.endocrine.org/doi/pdf/10.1210/er.2008-0024>>. Acesso em: 14 jul. 2016.

COSTES, S.; LANGEN, R.; GURLO, T.; MATVEYENKO, A. V.; BUTLER, P. C. B-cell failure in type 2 Diabetes: A case of asking too much of too few? **Diabetes**, v. 62, p. 327 – 335, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3554362/>>. Acesso em 26 set. 2016.

DIEMEN, V. V.; TRINDADE, E. N.; TRINDADE, M. R. M. Experimental model to induce obesity in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, n. 6, p. 425 – 429, 2006.

DOLNIKOFF, M.S.; KATER, C.E.; EGAMI, M.; ANDRADE, I S.; MARMO, M R. Neonatal treatment with monosodium glutamate increases plasma corticosterone in the rats. **Neuroendocrinology**, v. 48, n. 6, p. 645 - 649, dez. 1988.

DOLNIKOFF, M.; MARTIN-HIDALGO, A.; MACHADO, U. F.; LIMA, F. B.; HERRERA, E. Decreased lipolysis and enhanced glycerol and glucose utilization by adipose tissue prior to development of obesity in monosodium glutamate (MSG) treated-rats. **International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders**, v. 25, n. 3, p. 426-433, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11319642>>. Acesso em: 11 jul. 2016.

EIZIRICK, D. L.; CNOP, M. ER stress in pancreatic beta cells: the thin red line between adaptation and failure. **Science Signaling**, v. 3, p. 1 – 4, 2010. DOI: 10.1126/scisignal.3110pe7. Disponível em: <<http://stke.sciencemag.org/content/3/110/pe7.long>>. Acesso em: 29 jun. 2016.

EIZIRIK, D. L.; CARDOZO, A. K.; CNOP, M. The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. **Endocrine Reviews**. v. 29, n. 1, p. 42 – 46, 2008.

ELFERS, C.; RALSTON, M.; ROTH, C. L. Studies of different female rat models of hypothalamic obesity, Studies of different female rat models of hypothalamic obesity. **Journal of Pediatric Endocrinology Metabolism**, v. 24, n. 3 – 4, p. 131 – 137, 2011. Disponível em: <<https://www.degruyter.com/view/j/jpem.2011.24.issue-3-4/jpem.2011.098/jpem.2011.098.xml>>. Acesso em: 10 set. 2016.

ESPOSITO, K.; PONTILLO, A.; DI PALO, C.; GIUGLIANO, G.; MASELLA, M.; MARFELLA, R.; GIUGLIANO, D. Effect of weight loss and lifestyle changes on vascular inflammatory markers in obese women: a randomized trial. **Journal of American Medical Association**, v. 289, n. 14, p. 1799 – 1804, 2003. Disponível em: <<http://pmmp.cnki.net/Resources/CDDPdf/evd%5C200801%5CJAMA%5C%E9%9A%8F%E6%9C%BA%E5%AF%B9%E7%85%A7%E8%AF%95%E9%AA%8C%5Cjama2003289041799.pdf>>. Acesso em 01 jul. 2016.

FÉLIX-MARTINEZ, G. J.; AZIPROZ-LEECHAN, J.; AVILA-POZOS, R.; GODINEZ FERNANDES, J. R. Effects of Impaired ATP Production and Glucose Sensitivity on Human β -Cell Function: A Simulation Study. **Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica**, v. 35, n. 2, p. 157 – 170.

FERRANNINI, E.; FERRANNINI, E.; CAMASTRA, S.; GASTALDELLI, A.; SIRONI, M.; MUSCELLI, E.; MINGRONE, G. B-cell function in obesity: effects of weight loss. **Diabetes**, v. 3, p. S26-33, 2004.

FLEET, J. C. Rapid membrane-initiated actions of 1,25 dihydroxyvitamin D: What are they and what do they mean? **Journal of Nutrition**, v. 134, p. 3215 – 3218, 2004.

FLOR, L. S.; CAMPOS, M. R.; OLIVEIRA, A. F.; SCHRAMM, J. M. A. Diabetes burden in Brazil: fraction attributable to overweight, obesity, and excess weight. **Revista de Saúde Pública**, v. 49, n. 29, 2015.

GALLAGHER, E. J.; LEROITH, D.; KARNIELI, E. Insulin resistance in obesity as the underlying cause for the metabolic syndrome. **Mont Sinai Journal of Medicine**, v. 77, n. 5, p. 511 – 523, 2010. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/msj.20212/abstract;jsessionid=88390D62C09C58C6073DE15D2257A6C2.f02t04>>. Acesso em 03 jul. 2016.

GILON, P.; HENQUIN, J. C. Mechanisms and physiological significance of the cholinergic control of pancreatic beta-cell function. **Endocrinology Reviews**, v. 22, p. 565 – 574, 2001. Disponível em: <<http://press.endocrine.org/doi/abs/10.1210/edrv.22.5.0440>>. Acesso em: 08 abril 2017.

GINDE, A. A.; LIU, M. C.; CAMARGO, C. A. JR. Demographic differences and trends of vitamin D insufficiency in the US population. **Archive International of Medicine**, v. 169, p. 626 – 632, 2009.

GIULETTI, A.; VAN ETTEN, E.; OVERBERGH, L.; STOFFELS, K.; BOUILON, R.; MATHIEU, C. Monocytes from type 2 diabetic patients have a proinflammatory profile. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) works as anti-inflammatory. **Diabetes Research Clinical Practice**, v. 77, p. 47 – 57, 2007.

GIORGINO, F.; LAVIOLA, L.; ERIKSSON, J. W. Regional differences of insulin action in adipose tissue: insights from in vivo and in vitro studies. **Acta Physiologica Scandinavian**, v. 183, p. 13 – 30, 2005.

GODFREY, D. A.; MATSCHINSKY, F. M. Enzymes of the cholinergic system in islets of Langerhans. **Journal of Histochemistry Cytochemistry**, v. 23, p. 645 – 651, 1975.

GODSLAND, I. F.; JEFFS, J. A.R.; JOHNSTON, D. G. Loss of beta cell function as fasting glucose increases in the non-diabetic range. **Diabetologia**, v. 47, p. 1157 – 1166, 2004. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00125-004-1454-z>>. Acesso em: 05 set. 2016.

GONZALEZ, L.; RAMOS-TRAUTMANN, G.; DIAZ-LUQUIS, G. M.; PEREZ, C. M.; PALACIOS, C. Vitamin D status is inversely associated with obesity in a clinic-based sample in Puerto Rico. **Nutrition research**, v. 35, p. 287 – 293, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25708459>>. Acesso em 25 jul. 2016.

GREENE, D. A.; STEVENS, M. J.; FELDMAN, E. L. Diabetic neuropathy: scope of the syndrome. **American Journal of Medicine**, v. 30, p. 2S – 8S, 1999.

GRUNDY, S. M.; CLEEMAN, J. I.; DANIELS, S. R.; DONATO, K. A.; ECKEL, R. H.; FRANKLIN, B. A.; GORDON, D. J.; KRAUSS, R. M.; SAVAGE, P. T.; SMITH, S. C.; SPERTUS, J. A.; COSTA, F. Diagnosis and Management of the Metabolic Syndrome An American Heart. **Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement**, p. 2735 – 2752, out. 2005. Disponível em: <<http://circ.ahajournals.org/content/112/17/2735>>. Acesso em: 15 jul. 2016.

GUSTAFSON, B.; HEDJAZIFAR, S.; GOGG, S.; HAMMARSTEDT, A.; SMITH, U. Insulin resistance and impaired adipogenesis. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 26, n. 4, p. 193-200, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043276015000107>>. Acesso em: 08 abr. 2017

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado De Fisiologia Médica**. 10. Ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2002, 875 p.

GYSEMANS, C. A.; CARDOZO, A. K.; CALLEWAERT, H.; et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 modulates expression of chemokines and cytokines in pancreatic islets: implications for prevention of diabetes in nonobese diabetic mice. **Endocrinology**, v. 146, n. 4, p. 1956 – 1964, 2005.

HARINARAYAN, C.; ARVIND, S.; JOSHI, S.; THENNARASU, K.; VEDAVYAS, V.; BAINDUR, V. Improvement in pancreatic B-cell function with vitamin D and calcium supplementation in vitamin D-deficient nondiabetic subjects. **Endocrine**, v. 20, n. 2, p. 129 – 138, 2014. DOI: 10.4158/EP13273.

HE, K.; DU, S.; XUN, P.; SHARMA, S.; WANG, H. ZHAI, F.; POPKIN, B. Consumption of monosodium glutamate in relation to incidence of overweight in Chinese adults: China Health and Nutrition Survey (CHNS)1–3. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 96, p. 1328 – 1336, 2011).

HERMANUSSEN, M.; GARCIA, A. P.; SUNDER, M.; VOIGT, M.; SALAZAR, V.; TRESGUERRES, J. A. Obesity, voracity, and short stature: the impact of glutamate on the regulation of appetite. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 60, n. 1, p. 25 – 31, 2006.

HENQUIN, J. C. Regulation of insulin secretion: a matter of phase control and amplitude modulation. **Diabetologia**, v. 52, p. 739 – 751, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19288076>>. Acesso em: 07 abr. 2017.

HENQUIN, J. C. Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. **Diabetes**, v. 49, p. 1751 – 1760, 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11078440>>. Acesso em: 03 jun. 2017.

HEWISON, M.; ZEHNDER, D.; BLAND, R.; STEWART, P. M. 1 α -Hydroxylase and the action of vitamin D. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 25, p. 141 – 148, 2000. Disponível em: <<http://jme.endocrinology-journals.org/content/25/2/141.long>>. Acesso em: 14 jul. 2016.

HIRATA, A. E.; ALVAREZ-ROJAS, F.; CARVALHEIRA, J. B.; CARVALHO, C. R.; DOLNIKOFF, M. S.; ABDALLA SAAD, M. J. Modulation of IR/PTP1B interaction and downstream signaling in insulin sensitive tissues of MSG-rats. **Life Science**, v. 73, 2003.

HOLICK, M. F. High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 81, p. 353 – 373, 2006.

HOLICK, M. F.; BINKLEY, N. C.; BISCHOFF-FERRARI, H. A.; GORDON, C. M.; HANLEY, D.A.; HEANEY, R. P.; et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an endocrine society clinical practice guideline. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 96, n. 7, p. 1911 – 1930, 2011.

HOSSEIN-NEZHAD, A.; HOLICK, M. F. Vitamin D for health: a global perspective. **Mayo Foundation for Medical Education and Research**, v. 88, n. 7, p. 720 – 755, jul. 2013. Disponível em: <<http://www.ahfmc.fr/wp-content/uploads/2015/03/vitamine-d-mayo-clin-proc-2013-v88-n7-p720-55.pdf>>. Acesso em: 30 jun. 2016.

IMAI, J.; KATAGIRI, H.; YAMADA, T.; ISHIGAKI, Y.; SUZUKI, T.; KUDO, H. et al. Regulation of pancreatic beta-cell mass by neuronal signals from the liver. **Science**, v. 322, p. 1250 – 1254, 2008. DOI: 10.1126/science.1163971

INSAWANG, T.; SELMI, C.; CHAON, U.; PETHLERT, S.; YONGVANIT, P.; AREEJITRANUSORN, P.; BOONSIRI, P.; KHAMPITAK, T.; TANGRASSAMEEPRASERT, R.; PINITSOONTORN, C.; PRASONGWATTANA, V.; GERSHWIN, M. E.; HAMMOCK, B. D. Monosodium glutamate (MSG) intake is

associated with the prevalence of metabolic syndrome in a rural Thai population. **Nutrition & Metabolism**, v. 9, n. 50, p. 1 – 6, 2012.

JAMKA, M.; WOZNIEWICZ, M.; JESZKAL, J.; MARDAS, M.; BOGDGANSKI, P.; STELMACH-MARDAS, M. The effect of vitamin D supplementation on insulin and glucose metabolism in overweight and obese individuals: systematic review with meta-analysis. **Nature Scientific Reports**, v. 5, p. 01 – 12, 2015. Doi: 10.1038/srep16142. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/srep16142>>. Acesso em: 15 jul. 2016.

KAHN, S. E.; HULL, R. L.; UTZSCHNEIDER, K. M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**, v. 444, p. 840 – 846, 2006.

KING, B. M.; FROHMAN, L. A. The role of vagally-mediated hyperinsulinemia in hypothalamic obesity. **Neuroscience Behavior**, v. 6, p. 205 – 214, 1982.

KRAEGEN, E. W.; COONEY, G. J.; YE, J.; THOMPSON, A. L. Triglycerides, fatty acids and insulin resistance-hyperinsulinemia. **Experimental and Clinical Endocrinology Diabetes**, v. 109, n. 4, p. S516 - S526, 2001.

KUMAR, P. T.; SHERIN, A.; MOHAN, S. N.; JAYANARAYANAN, S.; NAIJIL, G.; CHIRAMADATHIKUDIYIL, S. Vitamin D3 restores altered cholinergic and insulin receptor expression in the cerebral cortex and muscarinic M3 receptor expression in pancreatic islets of streptozotocin induced diabetic rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 22, p 418 – 425, 2011.

LAHBIB, A.; GHODBANE, S.; LOUCHAMI, K.; SENER, A.; SAKYL, M.; ABDELMELEK, H. Effects of vitamin D on insulin secretion and glucose transporter GLUT2 under static magnetic field in rat. **Environmental Science And Pollution Research**, v. 22, n. 22, p. 18011 – 18016, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26169817>>. Acesso em: 09 jul. 2016.

LEITE, N. C.; FERREIRA, T. R.; RICKLI, S.; BORCK, C.; MATHIAS, P. C. F.; EMILIO, H. R. O.; GRASSIOLLI, S. Glycolytic and Mitochondrial Metabolism in Pancreatic Islets from MSG-Treated Obese Rats Subjected to Swimming Training. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 31, p. 242 – 256, 2013. Disponível em: <<http://www.karger.com/Article/FullText/343365>>. Acesso em: 28 jun. 2016.

LORENZO, A.; DEL GOBBO, V.; PREMROV, M. G.; BIGIONI, M.; GALVANO, F.; DI RENZO, L. Normal – weight obese syndrome: early inflammation? **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 85, p. 40 – 45, 2007. Disponível em: <<http://ajcn.nutrition.org/content/85/1/40.long>>. Acesso em: 07 jul. 2016.

LUBACZEUSKI, C.; BALBO, S. L.; RIBEIRO, R. A.; VETTORAZZI, J. F.; SANTOS-SILVA, J. C.; CARNEIRO, E. M.; BONFLEUR, M. L. Vagotomy ameliorates islet morphofunction and body metabolic homeostasis in MSG-obese rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 5, p. 447 – 457, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25714886>>. Acesso em: 03 abr. 2017.

MA, Z. A.; ZHAO, Z.; TURK, J. Mitochondrial dysfunction and B-cell failure in type 2 diabetes mellitus. **Journal of Diabetes Research**, v. 2012, p. 1 – 11, 2012. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/jdr/2012/703538/>>. Acesso em: 25 set. 2016.

MACEDO, M. P.; LIMA, I. S.; GASPAR, J. M.; AFONSO, R. A.; PATARRAO, R. S.; KIM, Y. B. et al. Risk of postprandial insulin resistance: the liver/vagus rapport. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 15, p. 67 – 77, 2014. DOI: 10.1007/s11154-013-9281-5.

MACHADO, U. F. Transportadores de glicose. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 42, n. 6, dez, p. 413 – 421, 1998. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27301998000600003>. Acesso em: 01 ago. 2016.

MACHADO, U. F.; SCHAAN, B. D.; SERAPHIM, P. M. Transportadores de Glicose na Síndrome Metabólica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 50, n. 2, p. 177 – 189, abr. 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27302006000200004&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 29 jun. 2016.

MAECHLER, P.; WOLLHEIM, C. B. Mitochondrial signals in glucose-stimulated insulin secretion in the beta cell. **Journal of Physiology**, v. 529, n. 1, p. 49 – 56, 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2270172/pdf/tjp0529-0049.pdf>>. Acesso em 19 set. 2016.

MACHO, L.; FICKOVÁ, M.; JEZOVÁ, D.; ZORAD, S. Late effects os postnatal administration os monosodium gluatamate ons insulin action in adult rats. **Physiology Research**, v. 49, p. 79 – 85, 2000.

MAESTRO, B.; CAMPIÓN, J. DÁVILA, N.; CALLE, C. Stimulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3 of insulin receptor expression and insulin responsiveness for glucose transport in U-937 human promonocytic cells. **Endocrinology Journal**, v. 47, n. 4, p. 383 – 391, 2000. Disponível em: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/endocrj1993/47/4/47_4_383/_pdf>. Acesso em: 02 jul. 2016.

MARCOTORCHINO, J.; TOURNIAIRE, F.; ASTIER, J.; KARKENI, E.; CANAULT, M.; AMIOT, M. J.; BENDAHAN, D.; BERNARD, M.; MARTIN, J. C.; LANDRIER, J. F. Vitamin D protects against diet-induced obesity by enhancing fatty acid oxidation. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 25, p. 1077 – 1083, 2014.

MARMO, M.R.; DOLNIKOFF, M.S.; KETTELHUT, I.C.; MATSUSHITA, D M.; HELL, N.S.; LIMA, F.B. Neonatal monosodium glutamate treatment increases epididymal adipose tissue sensitivity to insulin in three-month old rats. **Brazilian Journal of Medicine and Biology Research**, v. 27, n. 5, p. 1249 - 1253, mai. 1994. In: SOUZA, F. **Indução de obesidade em ratos através do glutamato monossódico: Avaliação Biométrica**. Tese (Mestrado em Clínica Cirúrgica) - e Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, CURITIBA, 1999. Disponível em: <<http://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/28847/D%20-%20FERNANDO%20DE%20SOUZA.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 29 jun. 2016.

MARTIN, J. M.; MIRANDA, R. A.; BARELLA, L. F.; PALMA-RIGO, K.; ALVES, V. S.; FABRICIO, G. S.; PAVANELLO, A.; FRANCO, C. C. S.; RIBEIRO, T. S.; et al. Maternal diet supplementation with n-6/n-3 essential fatty acids in a 1.2:1.0 ratio attenuates metabolic dysfunction in MSG-induced obese mice. **Internatiol Journal of Endocrinology**, 2016.

MARTINS; A. G.; BRANCO, R. C. S.; CANDIDO, I. C.; DIAS, M. J.; RINALDI, W.; OLIVEIRA, J. C.; SCOMPARIN, D. X.; GOMES, R. M.; GRASSIOLLI, S.; MARQUE, A. S.; CAMARGO, R. L.; GRAVENA, C.; MATHIAS, P. C. F.; TORREZAN, R.; ANDREAZZI, A. E. Vagal activity influences glycemis homeostasis in rats. **Endocrinologia & Diabetes Clínica e Experimental**, v. 8, n. 4, p. 906 – 910, 2008.

MATHIAS, P. C. F.; TORREZAN, R.; GRASSIOLLI, S. Controle autonômico da secreção de insulina: saúde e doença. **Endocrinologia & Diabetes: Clínica e Experimental**, Curitiba, v. 9, n. 3, p. 1027-1032, 2009. Disponível em: <<http://www.revistaendocrino.com/page2.html>>. Acesso em: 30 jun. 2016

MATHIEU, C. GYSEMANS, C.; GIULIETTI, A.; BOUILLON, R. Vitamin D and diabetes. **Diabetologia**, v. 48, n.7, p. 1247 – 1257, 2006.

MIRANDA, R. A.; AGOSTINHO, A. R.; TEVENZOLI, I. H.; BARELLA, L. F.; FRANGO, C. C.; TROMBINI, A. B.; MALTA, A.; GRAVENA, C.; TORREZAN, R.; MATHIAS, P. C.; de OLIVEIRA, J. C. Insulin oversecretion in MSG-obese rats is related to alterations in cholinergic muscarinic receptor subtypes in pancreatic islets. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 33, n. 4, p. 1075 – 1086, 2014. DOI: 10.1159/000358677.

MOSS, D.; MA, A.; CAMERON, D. P. Defective thermoregulatory thermogenesis in monosodium glutamate – induced obesity in mice. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 34, n.7, p. 626 – 630, 1985. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/med/4010523>>. Acesso em: 03 jul. 2016.

NANDAN, P.; NAYANATARA, A. K.; POOJARY, R.; BHAGYALAKSHMI, K.; NIRUPAMA, M.; REKHA, M. D.; KINI, D. Protective Role of Co-administration of Vitamin D in Monosodium Glutamate Induced Obesity in Female Rats. **Journal of the National Medical Association**, p. 1 – 5, 2017.

NASCIMENTO CURI, C. M.; MARMO, M. R.; EGAMI, M.; RIBEIRO, E. B.; ANDRADE, I. S.; DOLNIKOFF, M. S. Effect of monosodium glutamate treatment during neonatal development on lipogenesis rate and lipoprotein lipase activity in adult rats. **Biochemistry International**, v. 24, n. 5, p. 927 - 935, 1991. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/med/1776958>>. Acesso em: 14 jul. 2016.

NIELSEN, J. H.; GALSGAARD, E. D.; MOLDRUP, A.; et al. Regulation of beta-cell mass by hormones and growth factors. **Diabetes**, v. 50, n. 1, p. 25 – 29, 2001.

NORMAN, A. W. From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 88, p. 491S – 499S, 2008.

NYOMBA, B. L.; AUWERX, J.; BORMANS, V.; PEETERS, T. L.; PELEMANS, W.; REYNAERT, J.; BOUILLON, R.; VANTRAPPEN, G.; DE MOOR, P.; et al. Pancreatic secretion in man with subclinical vitamin D deficiency. **Diabetologia**, v. 29, n.1, p. 34 – 38, 1986.

OLNEY, J.W. Brain lesions, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. **Science**, v. 164, n. 71, p. 9-721, 1969.

ORIÁ, B. R.; BRITO, G. A. C. **Sistema Digestório: Integração Básico-Clínica**. 3. Ed. Edgard Blucher Ltda: São Paulo, 2016, 836 p.

PALOMER, X.; GONZALEZ-CLEMENTE, J. M.; BLANCO-VACA, F. MAURÍCIO, D. Role of vitamin D in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. **Diabetes, Obesidade e Metabolismo**, v. 10, n. 3, p. 185 – 197, 2008.

PARANÁ - SESA/PR – Secretaria de Estado da Saúde do Paraná. Superintendência de Atenção à Saúde; **Linha Guia de Diabetes**, 2014.

PENALVA, D. Q. F. Síndrome metabólica: diagnóstico e tratamento. **Revista de Medicina**, v. 87, n. 4, p. 245 – 250, out./dez. 2008.

PERCEGONI, N.; CASTRO, J. M. A. Vitamina D, sobrepeso e obesidade – Uma revisão. **HU Revista: Juiz de Fora**, v. 40, n. 3 e 4, p. 209 - 219, jul./dez. 2014. Disponível em: <<https://hurevista.ufjf.emnuvens.com.br/hurevista/article/view/2456/799>>. Acesso em: 15 jul. 2016.

PITTAS, A. G.; LAU, J. HU, F. B.; DAWSON-HUGHES, B. The role of vitamin D and calcium in type 2 diabetes. A systematic review and meta-analysis. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolismo**, v. 92, n. 6, p. 2017 – 2029, 2007.

PREAMOR, M. O.; PALUDO, P.; MANICA, D.; PALUDO, A. P.; ROSSATTO, E. R.; SCALCO, R. et al. Hypovitaminosis D and secondary hyperparathyroidism in resident physicians of general hospital in Southern Brazil. **Journal of Endocrinology Investigation**, v. 31, n. 11, p. 991 – 995, 2008.

PREIS, S. R.; MASSARO, J. M.; ROBINS, S. J. HOFFMANN, U.; VASAN, R. S.; IRLBECK, T.; MEIGS, J. B.; SUTHERLAND, P.; D'AGOSTINHO, R. B. SR; O'DONNELL, C. J.; FOX, C. S. Abdominal subcutaneous and visceral adipose tissue and insulin resistance in the Framingham heart study. **Obesity**, v. 18, n. 11, p. 2191 – 2198, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20339361>>. Acesso em: 05 jul. 2016.

PRENTKI, M.; NOLAN, C. J. Islet b cell failure in type 2 diabetes. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 7, p. 1802 – 1812, jul. 2006. Doi:10.1172/JCI29103. Disponível em: <<https://www.jci.org/articles/view/29103/pdf>>. Acesso em: 04 jul. 2016.

REAVEN, G. The metabolic syndrome or the insulin resistance syndrome? Different names, different concepts, and different goals. **Endocrinology and Metabolism Clinics**, v. 33, p. 283 – 303, 2004.

RIACHY, R.; VANDEWALLE, B.; KERR, C. J.; et al. 1,25-dihydroxyvitamin D3 protects RINm5F and human islet cells against cytokine-induced apoptosis: implication of the antiapoptotic protein A20. **Endocrinology**, v. 143, n. 12, p. 4809 – 4819, 2002.

RIBEIRO, R. A.; BALBO, S. L.; ROMA, L. P.; CAMARGO, R. L.; BARELLA, L. F.; VANZELA, E. C.; MATHIAS, P. C. F.; CARNEIRO, E. M.; BOSCHERO, A. C.; BONFLEUR, M. L. Impaired muscarinic type 3 (M3) receptor/PKC and PKA pathways in islets from MSG-obese rats. **Molecular Biology Reports**, v. 40, p. 4521 – 4528, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23652999>>. Acesso em: 10 abr. 2017.

ROCCA, S. V. S.; TIRAPÉGUI, J.; MELO, C. M. RIBEIRO, S. M. L. Efeito do exercício físico nos fatores de risco de doenças crônicas em mulheres obesas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 2, p.185 – 192, abr. 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322008000200004>. Acesso em: 09 jul. 2016.

RODRIGUEZ-DIAZ; R.; CAICEDO, A. Neural control of the endocrine pancreas. **Clinical Endocrinology and Metabolism**, p. 1 – 13, 2014.

ROSS, R.; JANSSEN, I.; DAWSON, J.; KUNGL, A.M.; KUK, J.L.; WONG, S.L.; NGUYEN-DUY, T.B.; LEE, S.J.; KILPATRICK, K.; HUDSON, R. Exercise-induced reduction in obesity and insulin resistance in women: a randomized controlled trial. **Obesity Research**, v.12, p. 789 - 798, 2004. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1038/oby.2004.95/full>>. Acesso em: 05 jul. 2016.

RUTTER, G. A.; PULLEN, T. J.; HODSON, D. J.; MARTINEZ-SANCHEZ, A. Pancreatic β -cell identity, glucose sensing and the control of insulin secretion, v. 466, p. 203 – 218, mar. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25697093>>. Acesso em: 08 jul. 2016.

RUDNICKI, P. M.; MOLSTED-PEDERSEN, L. Effect of 1,25-dihydroxycholecalciferol on glucose metabolism in gestational diabetes mellitus. **Diabetologia**, v. 40, p. 40 – 44, 1997.

SATIN, L. S.; BULER, P. C.; HA, J.; SHERMAN, A. S. Pulsatile insulin secretion, impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 42, p. 61 – 77, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25637831>>. Acesso em: 25 jul. 2016.

SCALFANI, A. Animal models of obesity: classification and characterization.. **Journal of Obesity**, v. 8, p. 491-508, 1984. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/16800819_Animal_models_of_obesity_Classification_and_characterization>. Acesso em: 07 jul. 2016.

SCHUCH, N. J.; GARCIA, V. C.; MARTINI, L. A. Vitamina D e doenças endocrinometabólicas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 53, n. 5, p. 625 – 633, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abem/v53n5/15.pdf>>. Acesso em: 08 jul. 2016.

SCHUSDZIARRRA, V.; BENDER, H.; TORRES, A.; PFEIFFER, E. Cholinergic mechanisms in intestinal phase insulin secretion in rats. **Regul Pept**, v. 6, p. 81 – 88.

SCHWARTZ, M., W.; PORTE JR, D. Diabetes, Obesity, and the Brain. **Science**, v. 307, p. 376 – 379, 2005.

SCOMPARIN, D. X.; GOMES, R. M.; GRASSIOLLI, S.; RINALDI, W.; MARTINS, A. G.; DE OLIVEIRA, J. C.; et al. Autonomic activity and glycemic homeostasis are maintained by precocious and low intensity training exercises in MSG-programmed obese mice. **Endocrine**, v. 36, p. 510 – 517, 2009.

SHAW, D. I.; HALL, W. L.; WILLIAMS, C. M. Metabolic Syndrome: what is it and what are the implications? **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 64, p. 349 – 357, 2005. DOI: 10.1079/PNS2005442. Disponível em: <<https://www.cambridge.org/core/journals/proceedings-of-the-nutrition-society/article/metabolic-syndrome-what-is-it-and-what-are-the-implications/0D857ACED77BA4BC8CE62697E2288B8A>>. Acesso em: 20 de setembro de 2016.

SHILLS, M. E.; OLSON, J. A.; SHIKE, M.; ROSS, A. C. **Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença**. 9. Ed. Editora Manole: São Paulo, 2003, 2172 p.

SILVA, B. C. C.; CAMARGOS, B. M.; FUJII, J. B.; DIAS, E. P.; SOARES, M. M. S. Prevalência de deficiência e insuficiência de vitamina D e sua correlação com PTH, marcadores de remodelação óssea e densidade mineral óssea em pacientes ambulatoriais. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 52, n. 3, p. 482 – 488, 2008.

SNEVE, M.; FIGENSCHAU, Y.; JORDE, R. Supplementation with cholecalciferol does not result in weight reduction in overweight and obese subjects. **European Journal of Endocrinology**, v. 159, n. 6, p. 675 – 684, 2008. Disponível em: <<http://www.eje-online.org/content/159/6/675.long>>. Acesso em: 01 jul. 2016.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES – SBD. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes. **AC Farmacêutica Ltda**, Rio de Janeiro, 2015 – 2016.

SU, X.; ZEMEL, M. B. 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D and corticosteroid regulate adipocyte nuclear vitamin D receptor. **International Journal Obesity**, Knoxville, v. 32, n. 8, p. 1305-1311, agosto. 2008. Cited in: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18427562>.

SZOLLOSSI, A.; NENQUIN, M.; AGUILAR-BRYAN, L. Glucose stimulates Ca²⁺ influx and insulin secretion in 2-week-old beta-cells lacking ATP-sensitive K⁺ channels. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 1747–1756, 2007. Disponível em: << <http://www.jbc.org/content/282/3/1747.full.pdf?sid=d4ef92ed-25e9-4160-9b16-da382ff04717>>>.

TEFF, K., L. How neural mediation of anticipatory and compensatory insulin release helps us tolerate food. **Physiology Behavior**, v. 103, p. 44 – 50, 2011.

THORENS, B. Neural regulation of pancreatic islet cell mass and function. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 16, n. 1, p. 87 – 95, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25200301>>. Acesso em: 19 de Agosto de 2016.

THORENS, B. GLUT-2, glucose sensing and glucose homeostasis. **Diabetologia**, v. 58, p. 221 – 232, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25421524>>. Acesso em: 19 de agosto de 2016.

VANGOITSENHOVEN, R.; WOLDEN-KIRK, H.; LEMAIRE, K.; VERSTUYF, A.; VERLINDEN, L.; YAMAMOTO, Y.; KATO, S.; VAN LOMMEL, L.; SCHUIT, F.; VAN DER SCHUEREN, B.; MATHIEU, C.; OVERBERGH, L. Effect of a transcriptional inactive or absent vitamin D receptor on beta-cell function and glucose homeostasis in mice. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 16, fev. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26877201>>. Acesso em 15 ago. 2016.

VON DIEMEN, V.; TRINDADE, M. R. M. Effect of the oral administration of monosodium glutamate during pregnancy and breast-feeding in the offspring of pregnant Wistar rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 25, n. 1, p. 37 – 42, 2010.

VERSPHOL, E. J.; TACKE, E.; MUTSCHLER, E.; LAMBRECHT, H. Muscarinic receptor subtype in rat pancreatic islets: binding and functional studies. **European Journal of Pharmacology**, v. 178, p. 303 – 311, 1990.

WHEATCROFT, S. B.; WILLIAMS, I. L.; SHAH, A. M.; KEARNEY, M. T. Pathophysiological implications of insulin resistance on vascular endothelial function. **Diabetes Medicine**, v. 20, p. 255 – 268, 2003.

WHO. World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. **Global Strategy on Diet, Physical Activity and Health**, 2014. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>>. Acesso em: 17 ago. 2016.

WHO. World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. **Global Strategy on Diet, Physical Activity and Health**, 2016. Disponível em: <http://www.who.int/diabetes/country-profiles/bra_en.pdf?ua=1>. Acesso em: 17 set. 2016.

WILCOX, G. Insulin and Insulin Resistance. **The Clinical Biochemist Reviews**, v. 26, p. 19 – 39, mai. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1204764/>>. Acesso em: 25 jul. 2016.

WOLDEN-KIRK, H.; OVERBERGH, L.; GYSEMANS, S.; BRUSGAARD, K.; NAAMANE, N.; VAN LOMMEL, N. et al. Unraveling the effects of 1,25(OH)₂D₃ on global gene expression in pancreatic islets. **Journal of Steroid Biochemistry Molecular Biology**, v. 136, p. 68–79, 2013. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23137852>. Doi: 10.1016/j.jsbmb.2012.10.017

ZEITZ, U.; WEBER, K.; SOEGIARTO, D. W.; WOLF, E.; BALLING, R. ERBEN, R. G. Impaired insulin secretory capacity in mice lacking a functional vitamin D receptor. **Journal of Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 17, n. 3, p. 509 – 5011, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12551842>>. Acesso em: 05 jul. 2016.

ZHANG, X.; HU, E. A.; WU, H.; MALIK, V.; SUN, Q. Associations of leg fat accumulation with adiposity-related biological factors and risk of metabolic syndrome. **Obesity**, v. 21, n. 4, p. 824 – 830, 2013.

ZHANG, W.M.; KUCHÁR, S.; MOZES, S. Body fat and RNA content of the VMH cells in rats neonatally treated with monosodium glutamate. **Brain Research Bulletin**, v.35, n. 4, p. 383 - 385, 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7531599>>. Acesso em 30 jun. 2016.

ZIEROLD., C.; MINGS, J. A., DELUCA, H. F. Regulation of 25-hydroxyvitamin D3-24-hydroxylase mRNA by 1,25-dihydroxyvitamin D3 and parathyroid hormone. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 88, n. 2, p. 234 – 237, 2003.

ARTIGO CIENTÍFICO

THE EFFECT OF CHRONIC VITAMIN D SUPPLEMENTATION ON
HYPOTHALAMIC OBESITY AND INSULIN SECRETORY CONTROL

The effect of chronic oral vitamin D supplementation on adiposity and insulin secretion in hypothalamic obese rats

Authors: Zoé M. Gureschi^{1,3}, Ana C. Valcanaia^{1,3}, Vanessa M. Ceglarek^{1,3}, Pamela Hotz¹, Bruna K. Amaral¹, Domwesley Wendreo¹, Thainan Amadeu^{1,3}, Tarliza Nardelli¹, Thiago Rentz², Nayara C. Leite², Camila Lubackzeuski², Henriette R. de O. Emilio⁴, Sabrina Grassioli^{1,3}

¹Biologicals Science and Health Center, Laboratory of Endocrine and Metabolic Physiology, University of West Parana (UNIOESTE), Cascavel, PR, Brazil.

²Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biology, University of Campinas/UNICAMP, Campinas, SP, Brazil.

³Postgraduate program in Biosciences and Health, Laboratory of Endocrine and Metabolic Physiology, University of West Parana (UNIOESTE), Cascavel, PR, Brazil.

⁴Department of General Biology, Sector of Biological and Health Sciences, Ponta Grossa State University (UEPG), Ponta Grossa, PR, Brazil.

Corresponding author: Zoé Maria Guareschi. Address: das Torres Avenue, number 186, Terra Nova 1 Condominium – house 214, Santo Inácio; zip code: 85806-095; Cascavel-PR, Brazil; Telephone: +55 45 9 9920-0792; e-mail address: nutrizoemaria@gmail.com

Shortened version: Vitamin D supplementation and hypothalamic obesity

Abstract: Reduced plasma vitamin D (VD) levels appear to contribute to excessive white adipose tissue, insulin resistance and dyslipidemia in obesity. However, benefits of VD supplementation have not been confirmed in all studies. The present study evaluated the effect of chronic oral VD supplementation on adiposity and insulin secretion in glutamate monosodium (MSG)-treated rats. During their first five days of life, male neonate rats received subcutaneous injections of MSG (4g/Kg), while the control (CON) group received saline solution. After, weaning groups were randomly distributed into VD supplemented (12µg/Kg; 3 times/week) and non-supplemented (NS) rats, forming four experimental groups (n=15 rats/group): CON-NS; CON-VD; MSG-NS and MSG-VD. At 76 days of life, rats were submitted to an oral glucose tolerance test (OGTT; 2g/Kg) and, at 86 days of life, obesity, insulin resistance and plasma metabolic parameters were evaluated. Pancreatic islets

were isolated for glucose-induced insulin secretion (GIIS) and cholinergic insulinotropic response studies. Muscarinic 3 receptor (M3R), protein kinase C (PKC) and A (PKA) expressions were also evaluated in isolated pancreatic islets using histological analyses. VD supplementation decreased hyperinsulinemia (85.96%), hypertriglyceridemia (50.40%) and restored insulin sensibility (89.45%) in MSG-VD rats, without modifying adiposity, OGTT or GIIS, compared to rats from the MSG-NS group. Cholinergic insulinotropic action was reduced (57.30%) in islets from MSG-VD rats, without changing M3R, PKA and PKC expression. In conclusion, chronic oral VD supplementation in MSG-obese rats was able to prevent hiperinsulinemia and insulin resistance, improving triglyceridemia without modifying adiposity. A reduction in the cholinergic pancreatic effect, in response to VD, could be involved in the normalization of the plasma insulin level, an event that appears to be independent of the M3R and its downstream pathways.

Key Words: obesity, insulin, islets, vitamin D

Introduction

Vitamin D (VD) is an active circulating pre-hormone with a well-defined role in calcium and phosphorus homeostasis⁽¹⁾. While VD can be obtained from dietary sources⁽²⁾, subcutaneous skin production, via the action of ultraviolet B (UVB) irradiation, is the principal route of VD synthesis in the human body⁽³⁾. Independently of the source of VD, the addition of two hydroxyl (OH) groups is necessary to make VD biologically active. Thus, the consecutive action of two hydroxylases, 25- hydroxylase and 1-alpha-hydroxylase, present respectively in the liver and kidney, generate the main active metabolite of VD, denominated 1,25(OH)VD or calcitriol^(3,4). The biological action of 1,25(OH) VD is mediated through the VD receptors (VDR), which are widely expressed in human tissues, and appear to mediate the pleiotropic functions of VD^(3,4,5).

Several common conditions, such as low sunshine exposure, malabsorption and aging are related to VD deficiency⁽⁶⁾. However, in recent decades, reports that include large cohort studies have shown an association between excessive white adipose tissue (WAT) content and VD deficiency^(1,3). As such, it has long been shown that serum VD concentrations are inversely correlated to body mass index (BMI), affecting mainly individuals with severe obesity^(3,7,8). In addition to its association with obesity in general,

VD deficiency has also been linked to regional fat distribution⁽⁸⁾. Moreover, VD deficiency appears to be involved in several metabolic abnormalities present in obese conditions, in particular with the disruption of glucose and lipid homeostasis^(1, 2, 4, 9).

As is well known, obesity is an important component of metabolic syndrome (MS), defined as the association of insulin resistance (IR), glucose intolerance, dyslipidemia, hypertension and excessive WAT visceral content; events intimately related to low inflammatory state grade and frequently present in obese subjects⁽¹⁰⁾. Together, obesity and MS are the major causes of type 2 diabetes mellitus (T2DM) and cardiovascular diseases (CVD) worldwide^(7, 10, 11). Some studies in humans have demonstrated that VD supplementation could improve glucose tolerance, pancreatic β -cell function and insulin sensitivity^(7,12). Similarly, early animal studies showed that VD depletion impaired insulin secretion^(8,13), which was then improved with VD supplementation^(6,13). In epididymal adipocytes from rats with streptozotocin-induced diabetes, treatment with VD normalized the number of insulin receptors and improved the insulin response⁽¹⁴⁾. However, these beneficial effects of VD supplementation on metabolic abnormalities present in obesity have not been confirmed by all authors⁽¹⁵⁾. For example, clinical trials in healthy subjects, in subjects with impaired glucose tolerance and in T2DM, which have evaluated the effects of different regimens of VD supplementation on plasma glucose, insulin, and various measurements of IR, have shown inconsistent results^(16,17).

Despite contradictory results shown by studies of VD supplementation on IR or T2DM, the presence of VDRs and the expression of 1α -hydroxylase enzyme in the pancreatic β -cell is well established^(5, 14, 18). Accordingly, a significant reduction in glucose-induced insulin secretion (GIIS) is observed in VDR mutant mice^(5,18). Moreover, VD may influence insulin secretion indirectly through its role in the regulation of calcium (Ca^{2+}) flux, as well as by affecting the expression of calbindin, a Ca^{2+} -binding protein in pancreatic β -cells^(6,19). VD may also exert protective anti-inflammatory and anti-apoptotic actions in pancreatic β -cells⁽²⁰⁾. VD also appears to regulate differentiation and proliferation events in a mouse insulinoma cell line (MIN6)⁽¹⁹⁾. In addition, proliferative effects in β -cells can be modulated by acetylcholine (ACh) released by the pancreatic vagus nerve; an event dependent upon muscarinic receptor subtype 3 (MR3) and its downstream pathways, such as, protein kinase C (PKC) and protein kinase A (PKA)^(21,22). Interestingly, islets from diabetics rats treated with VD presented a reestablishment of their cholinergic response and increased MR3 expression⁽²³⁾.

Neonatal treatment of rodents with monosodium glutamate (MSG) provokes hypothalamic lesions, resulting in the development of obesity in adulthood⁽²⁴⁾. In addition to massive WAT accumulation, MSG-treated rats demonstrate several neuroendocrine abnormalities, such as hiperinsulinemia, glucose intolerance, IR, dyslipidemia, cardiovascular dysfunction and altered hypothalamus adrenal axis regulation^(24,25,26). Moreover, isolated pancreatic islets from MSG-treated rats show changes in glucose-induced insulin secretion and reduced cholinergic insulinotropic responsiveness^(27,28). Due to these metabolic disorders, MSG-treated rats have been used as a model to study obesity and its metabolic consequences, such as MS. In the present study, we evaluated the effect of chronic VD supplementation on the obesity induced by MSG treatment, particularly investigating the consequences of this supplementation on insulin secretion from isolated pancreatic islets.

Experimental Methods

Ethical aspects: All experimental procedures were conducted with male *Wistar* rats, where the number of animals used in each protocol was determined following other similar previous studies^(28,29). During lactation and growth, rats were maintained in adequate conditions according to the guidelines of the National Council for Control of Animal Experiments (CONCEA), following international norms for animal care and maintenance as recommended by The Arrive Guidelines⁽³⁰⁾. The rats were kept in plastic cages (n=3-4 rats/cage) with a stainless steel cover and housed in a controlled environment; with a 12 h light/cycle, constant temperature ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) and free access to food and water⁽³¹⁾. All experimental protocols were previously approved (attachment A) by the Ethics Committee on Animals Use (CEUA/November, 15/2015) of the Western Parana State University (UNIOESTE).

Hypothalamic obesity induction: At birth, the size of the offspring was adjusted to 6 male pups per dam to ensure adequate nutritional lactation^(31,32). From the second to sixth days of life, male *Wistar* (n=30) rats received daily subcutaneous injections of monosodium glutamate (MSG) in a dose of 4 g/Kg body weight (BW)^(28,29). In same period, the control (CON) rats (n=30) received subcutaneous injection of saline (1.25 g/Kg BW). At 30 days of life, the MSG and CON rats were weaned and randomly assigned to vitamin D (VD)-supplemented or non-supplemented (NS) groups, according to the protocol described in the next section. Thus, considering the obesity treatment and VD supplementation, four experimental groups were formed (n=15 rats/group): CON-NS: Control non-supplemented;

CON-VD: Control-VD supplemented; MSG-NS: MSG non-supplemented and MSG-VD: MSG VD supplemented.

Vitamin D supplementation: From 30 to 85 days of life, the VD supplemented groups received VD (SupraD®) at a dose of 12µg/Kg^(32,33) of BW dissolved in oil corn (vehicle). The VD dose was administered orally between 9:00-11:00h AM, three times per week, by gavage. To simulate the stress of oral supplementation, the NS groups also received the same volume of vehicle but without VD, for the same period and at the same frequency as for the VD supplemented groups.

Body weight, growth and food intake: From 30 to 85 days of live, body weight and food intake were monitored 3 times a week. Rats received a tail mark and their BWs were individually registered in grams (g) and food intake was expressed in relation to the BW of each rat (g/g BW). For this, the total of food offered was registered, and the amount of food remaining from the previous 48 h was weighted; this value was divided by the number of rats per cage and by BW. Standard chow diet was offered to the rodents (BIO BASE/SC), containing 1.1% calcium; 0.8% phosphorus and 4 IU/g VD. Food and tap water were offered *ad libitum*. The data obtained from food intake and BW were used to elaborate curves of food and BW evolution and the respective area under curve (AUC) was calculated for both parameters.

Oral glucose tolerance test (OGTT): At 76 days of life and after 12h of fasting, 6-9 rats from each experimental group were submitted to glucose load (2g/Kg BW) by oral gavage. The blood sample was collected by puncture of the caudal vein at time 0 (before glucose load) and at times 15, 30, 60 and 120 min after glucose load, and plasma glucose levels were measured using a glucometer (Accu-Chek Active®). The glucose concentration during the OGTT was used to calculate the area under curve (AUC).

Biometric parameters and white adipose tissue content: At 86 days of life and after 12h of fasting, the animals were euthanized by decapitation after previous desensitization with carbon dioxide (CO₂). Peripheral blood was immediately collected in heparinized tubes for the measurement of plasma biochemical parameters, as described in the next section. In order to analyse the different fat depots, retroperitoneal (visceral) and inguinal (subcutaneous) depots of WAT were removed and weighted. The BW and naso anal length (cm) were used to calculate the Lee Index^(34,35).

Blood biochemistry parameters and insulin resistance: The peripheral blood collected was centrifuged (3000rpm/min; 15min) and the plasma obtained was used to measure

glucose, triglycerides and total cholesterol using colorimetric enzymatic kits (Lab Test, BR; GPO-Trinder, BR, respectively) according to the manufacturer's instructions. The plasma insulin level was evaluated by radioimmunoassay technique (RIA). Plasma glucose (mM) and insulin ($\mu\text{U}/\text{mL}$) levels were used to calculate the Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance (HOMA-IR), as previously established by Matthews et al. ⁽³⁶⁾.

Pancreatic islet isolation and insulin secretion: Groups of 5 to 6 rats were used for pancreatic islet isolation by the collagenase technique, according to a protocol previously established by Lacy & Kostianovsky⁽³⁷⁾, with modifications⁽³⁸⁾. Briefly, the pancreatic duct was localized and perfused with Hanks buffer solution, pH 7.4, 0.1% of bovine serum albumin (BSA), containing collagenase type V (1 mg/mL). The perfused pancreas was then excised and digested at 37°C. The islets were manually collected, washed in Hanks solution and transferred to wells in culture plates containing 1 mL of Krebs buffer solutions, pH 7.4; 0.1% of BSA in the presence of 5.6mM glucose. During the pre-incubation phase, the isolated pancreatic islets (4islets/wells) were transferred to a culture chamber (95% CO₂) at 37°C for 60 min. After pre-incubation, the medium was changed and the isolated pancreatic islets received 1mL of Krebs solutions containing 5.6 or 8.3mM glucose to evaluate glucose-induced insulin secretion (GIIS). Other islet groups received 1mL of Krebs solution containing 8.3mM glucose in the presence of the muscarinic cholinergic agonist Carbachol (CCh; 10 μM). Aliquots for all islet experiments were used to measure insulin by radioimmunoassay (RIA). The insulin secreted in the presence of glucose was expressed as ng/mL/4 islets. The insulinotropic effect of CCh was expressed as percentage (%), considering the effect of 8.3mM glucose as 100%.

Histological analysis of pancreata: Four to six pancreata per group were removed, dissected, and placed in histological cassettes with histological fixation solution (ALFAC) for 24h, before storing in 70% alcohol. Dehydration was performed by passing the samples through ethanol solutions of increasing graduation (70, 80, 90 and 100%) and xylol, and were finally paraffin embedded. The tissues were sectioned at 5 μm on a Reichert Jung rotary microtome (Leica RM 2025 Microsystems Inc., Wetzlar, Germany) and hematoxylin and eosin (H&E) were used for staining. Microscopic analysis of stained preparations were carried out using an Olympus BX51 (Olympus microscope, Japan) and digital photographs were taken with a digital still 36-bit color camera, 1280x1024 pixels, with a DP71 Controller (Olympus). The Image J 1.42q software (Bethesda, MD, USA), available from the NIH site (<http://rsb.info.nih.gov/ij>, accessed on 15 June 2017), was employed for analyses of the

number and area of the pancreatic islets. Approximately 3 to 5 microscopic fields per section and three sections per animal (6 rats per group) were analyzed.

Western blotting: Islets from 4 to 6 rats for each group were solubilized in buffer containing 100mM Tris pH 7.5, 10mM/L sodium pyrophosphate, 100mM sodium fluoride, 10mM/L EDTA, 10mM sodium vanadate, 2mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and 2% Triton X-100, final pH 8.08. The protein concentration in the supernatants was assayed using the Bradford assay⁽³⁹⁾. For sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) gel electrophoresis and Western blot analysis, samples were treated with Laemmli buffer. After heating to 95°C for 5 min, the proteins were separated by electrophoresis (30µg/lane, 10% gel), and transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were blocked overnight at 4°C in Tris-buffered saline containing 5% skimmed milk. Subsequently, the membranes were incubated with a polyclonal antibody against Ach-M3R (1:200, cat.M6598, Sigma); for evaluating PKA α expression, the membranes were incubated with a polyclonal antibody against PKA α (1:200, cat.SC903, Sigma) and an anti-PKC antibody (Pkc α sc-8393, SCBT). After washing, the membranes were incubated for 2 h with a secondary antibody (1:10.000 – Invitrogen), followed by exposure to an ImageQuant LAS 4000 Mini (GE Healthcare Bio-Sciences - Uppsala–Sweden) to detect the chemiluminescence of the nitrocellulose membranes. After assaying the target protein, Western blotting was repeated using α -tubulin (1:1.000, cat.T6199, Sigma) antibody, as an internal control. Band intensities were quantified by optical densitometry using Image J® software (National Institute of Mental Health, USA). Data are expressed as the normalization of the Ach-M3R, PKA α and PKC α : α -tubulin ratio.

Statistical Analysis: Data are presented as means \pm standard error mean (SEM), and analyzed by Two-way ANOVA. When F values were significantly different ($p < 0.05$), the Tukey post-test was applied to evaluate the difference between groups CON-NS; CON-VD; MSG-NS; MSG-VD. The statistical analyses were conducted using Prism for Macintosh, version 5.0 (Graphpad Software, San Diego, CA, USA).

Results

The effects of chronic supplementation with VD on the biometric parameters of the rats are shown in the Table 1. At 86 days of life, body weight and naso-anal length were affected only by neonatal treatment with MSG ($F_{1,50} = 151.1$; $p < 0.0001$; $F_{1,80} = 193.0$; $p < 0.0001$) and no influence of VD supplementation was observed ($F_{1,50} = 0.252$; $p = 0.6156$;

$F_{1,80} = 2.664$; $p = 0.1066$), where body weight and naso-anal length were significantly lower in MSG-NS and MSG-VD rats, in relation to the CON-NS and CON-VD groups ($p < 0.05$). Neither MSG treatment nor VD supplementation affected the Lee index. MSG treatment also modulated subcutaneous ($F_{1,54} = 50.56$; $p < 0.0001$) and visceral ($F_{1,58} = 9.431$; $p = 0.0032$) fat depots, where MSG-NS and MSG-VD rats presented higher fat accumulation than the CON groups ($p < 0.05$).

Table 2 presents the effects of chronic VD supplementation on biochemical parameters in the plasma. MSG treatment ($F_{1,49} = 9.985$; $p = 0.0027$) significantly increased plasma glucose levels in the MSG-NS and MSG-VD rats, compared to levels in the CON-NS group ($p < 0.05$). The plasma level of insulin was affected by the interaction of MSG treatment and VD supplementation ($F_{1,44} = 20.41$; $p < 0.0001$), where MSG-NS rats presented higher plasma insulin levels compared to the CON-NS and MSG-VD groups ($p < 0.05$).

Plasma levels of triglycerides and total cholesterol were influenced by MSG treatment ($F_{1,33} = 3.796$; $p = 0.0599$; $F_{1,35} = 23.51$; $p < 0.0001$) and VD supplementation ($F_{1,33} = 18.35$; $p = 0.0001$; $F_{1,35} = 10.07$; $p = 0.0031$), as well as by the interaction between these factors ($F_{1,32} = 5.797$; $p = 0.220$; $F_{1,35} = 7.302$; $p = 0.0106$). MSG-NS rats demonstrated increased plasma triglycerides compared to levels in the CON-NS, CON-VD and MSG-VD groups ($p < 0.05$). In addition, plasma total cholesterol level was higher in MSG-VD rats in relation to the other groups ($p < 0.05$). Insulin sensibility also was influenced by MSG treatment ($F_{1,38} = 0.4787$; $p = 0.0349$) and VD supplementation ($F_{1,38} = 4.403$; $p = 0.0426$), as well as by the interaction between these factors ($F_{1,38} = 7.305$; $p = 0.0102$). Thus, HOMA-IR value was increased in MSG-NS animals, compared to the CON-NS, CON-VD and MSG-VD groups ($p < 0.05$).

Figure 1 presents the effects of chronic VD supplementation on growth (Figure 1.a and 1.b) and food intake (Figure 1.c and 1.d). Again, only an effect of MSG neonatal treatment was observed for both parameters ($F_{1,52} = 167.5$; $p < 0.0001$ and $F_{1,48} = 9.403$; $p = 0.0036$). From 40 to 86 days of age, MSG-NS and MSG-VD rats presented lower body weight than that of rats of the CON groups, resulting in reduced body weight AUC in the MSG animal groups, compared to the AUC of the CON rats ($p < 0.05$). MSG treatment alone affected food intake; however, the association of MSG and VD supplementation did not alter the AUC for food intake.

At 76 days of age, rats were submitted to the oral glucose tolerance test (OGTT; Figure 2.a). VD supplementation affected plasma glucose levels at 60 min ($F_{1,26} = 9.159$; $p =$

0.0055) and 120 min ($F_{1,26} = 6.419$; $p = 0.0177$) OGTT, where plasma glucose of CON-NS rats was lower than that of CON-VD rats at 60 min ($p < 0.05$). Neither VD nor MSG treatment significantly influenced glucose levels at other times during the OGTT. The AUC of the OGTT demonstrated an effect of VD supplementation ($F_{1,26} = 6.848$; $p = 0.0172$) (Figure 2.b).

The effects of chronic VD supplementation on GIIS, weight of the endocrine pancreas and histological analysis are shown in Figures 3.a and 3.b. The weight of the pancreas was affected by MSG treatment ($F_{1,47} = 5.284$; $p = 0.0260$); however, the mean pancreas weight did not differ between groups. Neither MSG treatment nor VD supplementation significantly affected pancreatic islet number (Figure 4.a) or size (Figure 4.b). However, islet size was affected by the interaction between VD and MSG treatment ($F_{1,19} = 6.201$; $p = 0.0222$).

The cholinergic agonist effect of CCh (10 μ M) on GIIS is shown in Figure 5.a. The insulinotropic action of CCh was influenced by the interaction between MSG treatment and VD supplementation ($F_{1,59} = 8.080$; $p = 0.0061$). Thus, in pancreatic islets from MSG-VD rats a reduced cholinergic effect was observed in relation to islets from the MSG-NS and CON-VD groups ($p < 0.05$). However, neither MSG treatment nor VD supplementation significantly affected M3R (Figure 5.b) or PKA (Figure 5.d) expression in isolated pancreatic islets. Nevertheless, an effect of the interaction between MSG treatment and VD supplementation was observed on PKC expression in isolated pancreatic islets ($F_{1,12} = 6.303$; $p = 0.0274$), where PKC protein expression was significantly higher in islets of rats from MSG-NS, when compared to islets from the CON-NS group ($p < 0.05$).

Discussion

Obesity is a condition associated with a network of metabolic abnormalities, such as glucose intolerance, insulin resistance, dyslipidaemia and hypertension; all disturbances that are intimately related to a low grade inflammatory state. Thus, excessive adipose tissue content predisposes to the development of MS, T2DM and cardiovascular diseases^(40,41). Over the last decades, multiple studies have shown an inverse relationship between circulating concentrations of VD and indices of body mass. In addition, low plasma levels of VD have been associated with obesity-related health complications, in particular with disruptions in glucose and lipid homeostasis^(18,19). Thus, VD supplementation has been indicated as a strategy to improve metabolic abnormalities associated with obesity^(1,2,3).

However, a positive effect of VD supplementation on obesity or T2DM has not been confirmed by all studies^(43,44,45,46).

In the present study, we explored the effects of chronic supplementation with VD on the hypothalamic obesity induced by MSG neonatal treatment. According to our results, MSG-treated rats presented higher adipose tissue accumulation; however, VD chronic supplementation (12µg/Kg during 55 days) did not affect visceral or subcutaneous adipose tissue content in MSG-VD rats. In contrast, Marcotorchino et al. (2014)⁽³⁾ demonstrated that VD supplementation (15,000 IU/Kg of food for 10 weeks) reduced obesity in high fat diet (HFD) obese mice. The VDR is present in white adipose tissue, and its activation by VD exerts regulatory effects on adipogenesis, lipid metabolism and inflammatory process^(14,43); however, inconsistent results regarding VD have been observed in several studies^(47,48). In 3T3/L1 pre-adipocytes, for example, VD inhibits adipogenesis⁽⁴⁹⁾, while enhanced lipid accumulation and increased expression of adipogenic marker genes are found in mesenchymal cells incubated with VD⁽⁴⁴⁾. In mice without VDR expression (VDR^{-/-}), reduced adipose tissue content is reported⁽⁴³⁾. On other hand, dietary supplementation of VD (0.05 mg/Kg of diet) in obese HFD mice reduces white adipose tissue accumulation⁽⁸⁾. Recently, Jin et al.⁽⁵⁰⁾ demonstrated that VD administered subcutaneously (1µg/Kg) in MSG-obese rats reduces adipose tissue content, as well as adipocyte area; an event that involves a reduction in inflammation. It is possible that the oral VD supplementation adopted in our experimental design influenced the level of VD available in the circulation. Moreover, since MSG-obese rats present elevated plasma levels of leptin, as recently demonstrated by Nobre and contributors (2018)⁽⁵¹⁾, hyperleptinemia could decrease VD sensitivity in adipocytes, contributing to increased adipogenesis. Further studies are needed to explore these questions in MSG-obese rats.

In our study, we did not find any effect of chronic VD supplementation on body weight gain or food intake in MSG VD animals. In contrast, VD supplementation has been shown to reduce food intake, weight gain and modulate the inflammatory response in the hippocampus and hypothalamus during HFD induced obesity⁽⁵²⁾. Moreover, in VDR^{-/-} mice, reduced body weight was observed, in association with normophagia⁽⁴³⁾. Again, contradictory effects of VD supplementation on food intake and body weight in different animal obese models have been observed. The arcuate nucleus (ARC) has an important role in the neural control of food intake and energetic metabolism⁽⁵³⁾. MSG-obese rats present damage in the ARC neurons⁽²⁴⁾, which would prevent a central hypothalamic action of VD.

In addition to the excessive white adipose tissue accumulation observed in our study, MSG-treated rats presented hyperglycaemia, hiperinsulinemia, dyslipidaemia and insulin resistance, as demonstrated by other studies^(27,29). Chronic VD supplementation in MSG rats effectively normalized triglycerides and plasma insulin levels, and improved insulin sensitivity. Similar results were recently reported by Jin et al.⁽⁵⁰⁾ using intraperitoneal VD administration in MSG-obese rats, where VD supplementation in MSG-obese rats restored inflammatory processes. VD supplementation also improved metabolism in HFD-obese mice and in Low-density lipoprotein (LDL) receptor knockout mice (LDLR^{-/-})⁽⁸⁾, corroborating several studies showing that insulin resistance in adults⁽⁴⁷⁾ and children⁽⁵⁴⁾ can be associated with low VD status. VD can modulate insulin receptors in the peripheral tissues, such as the skeletal muscle and adipocytes^(55,56), and hypovitaminosis D reportedly increases insulin resistance⁽⁵⁷⁾.

Normalization of plasma triglyceride levels was observed in MSG-VD supplemented rats. Similar results were obtained in LDLR^{-/-} mice supplemented with VD⁽⁸⁾, confirming humans studies showing that a high serum VD concentration is associated with a desirable lipid profile, particularly with low serum triglyceride concentrations⁽⁵⁸⁾. Similarly, a study by Jorde et al. 2010⁽⁵⁹⁾ found that an increase in serum VD over time is associated with a decrease in serum triglycerides. However, our study showed that MSG-VD rats also presented high plasma total cholesterol levels, possibly due to a different effect of VD on the LDL and HDL-cholesterol subfractions⁽⁵⁹⁾.

It is important to recognize that the VD exerts influence on multiple sites. Thus, VD may also influence the inflammatory reaction through several mechanisms, including modulation of the release of inflammatory cytokines such as tumour necrosis factor- α (TNF- α)⁽⁶⁰⁾. Moreover, VD supplementation can improve hepatic lipid metabolism⁽⁵⁰⁾. Here, we used HOMA-IR to evaluate insulin sensibility, as this index appears to be a better indicator of hepatic insulin resistance⁽¹⁹⁾. Thus, it is possible that VD supplementation improved hepatic function and/or reduced inflammatory events, contributing to better insulin responsiveness and, consequently, improving plasma triglyceride levels. Further studies exploring these questions in MSG-VD-supplemented rats are necessary.

Most previous studies have reported significant inverse associations of VD status with various continuous measurements of glycemia^(61,62,63), and higher basal levels of VD have been found to predict better β -cell function and lower glycaemia in subjects at risk for T2DM^(19,64). Studies have also shown that VD is more closely associated to glucose

metabolism and insulin resistance than obesity^(19,65). In our study, while VD supplementation improved insulin sensitivity, it did not alter either fasting plasma glucose levels or oral glucose tolerance. Similarly, the glucose tolerance did not change in VDR-/-⁽⁴³⁾ and VD deficient mice⁽⁵⁾. In contrast, Zeitz et al. 2003⁽⁵⁾ observed glucose intolerance in VDR-/. In a follow-up study in humans⁽⁶⁷⁾, a significant inverse association of basal VD status with oral glucose tolerance and fasting glucose was observed. In T2DM patients with VD deficiency, the daily intake of a VD-fortified yogurt drink increased serum VD levels and improved glycaemic status⁽⁶⁵⁾.

As MSG-VD rats presented a reduction in plasma insulin, in association with improved insulin sensitivity, we also investigated insulin secretion and morphology by the endocrine pancreas in VD-supplemented rats. In rats, VD deficiency impairs insulin release from the pancreas and reduces glucose tolerance, and these alterations are alleviated by VD supplementation⁽¹³⁾. Moreover, in humans at high risk of diabetes, cholecalciferol (2000 IU daily) supplementation for 16 weeks improved pancreatic β -cell function⁽⁴⁵⁾. In the present study, neither GIIS nor islet number or size were significantly affected by VD supplementation in the endocrine pancreas of MSG rats. Similarly, VDR-/- mice maintained in normocalcemia demonstrated no alterations in GIIS and islet morphology⁽⁵⁾. A recent study showed that a mouse insulinoma 6 cell line (MIN6) cultured in high glucose for longer periods of time demonstrated reduced VDR expression. In this study, the activation of VDR by VD did not significantly alter GIIS, either in MIN6 cells or in isolated pancreatic islets from db/db mice, but increases in insulin expression have been observed. In contrast, VD supplementation to T1DM rats was effective in increasing insulin secretion and VDR expression in isolated pancreatic islets^(33,5). However, we observed that the cholinergic insulinotropic effect was reduced in islets from MSG-VD rats, suggesting an effect of VD on the muscarinic response. The MR3 subtype and its downstream pathways, particularly the PKC protein, are mainly responsible for the cholinergic effect in pancreatic β -cells⁽²²⁾. However, in our study the protein expressions of MR3 and PKC in isolated pancreatic islets were not significantly altered by chronic VD supplementation. In contrast, Kumar et al. 2011⁽²³⁾ demonstrated that VD supplementation in the T1DM model restored MR3 in the endocrine pancreas. VD also appears to regulate the expression of phosphodiesterase (PDE) enzymes in pancreatic islets, as demonstrated by the in vitro treatment of young C57BL/6 mice islets with VD, which resulted in a significant decline in PDE10a mRNA expression⁽¹⁸⁾. PDEs are important regulators of AMPc and, consequently, PKA activity in pancreatic

β -cells⁽¹⁸⁾. However, in our study, we did not observe alterations in PKA expression in isolated pancreatic islets from MSG-VD supplemented rats. Thus, it appears that other intracellular pancreatic events could be mediating reduced the cholinergic responsiveness observed in islets from MSG-VD rats.

The current study has a number of potential limitations. Firstly, it is well established that the response to VD supplementation is dependent upon baseline VD concentrations⁽⁴⁾ and we did not measure plasma VD levels in MSG obese rats. However, given the decreased bioavailability of VD in obesity, we believe that MSG obese rats show a lower baseline value. This hypothesis is reinforced by data obtained by Parisi et al. 2010⁽⁶⁸⁾ demonstrating that an increase in renal glutamate levels could be involved in the decrease in renal 1α -hydroxylase activity and, therefore, the decrease in VD levels. Additionally, MSG-obese rats present a high plasma cortisol level, which could attenuate the action of VD. Finally, we used oral VD supplementation and the influence of MSG treatment on intestinal VD absorption should not be discounted.

In conclusion, our results indicate that chronic VD supplementation in MSG obese rats reduces hypertriglyceridemia, corrects hiperinsulinemia and improves insulin sensibility without changing white adipose tissue content or GIIS from isolated pancreatic islets. However, the reduced insulinotropic cholinergic effect found in the pancreatic islets of MSG-VD rats may contribute to lower plasma insulin levels, an effect that is not directly related to changes in MR3 expression or its downstream pathways.

Acknowledgments

This study forms part of the MSc thesis of Zoé Maria Guareschi, who received a scholarship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). We thank Unicamp for insulin dosage.

Financial Support

This study did not receive financial support.

Conflict of Interest

None.

Authorship

Zoé Maria Guareschi, Ana Valcanaia, Bruna Karla Amaral, Vanessa Ceglarek, Pamela Hotz, Domwesley Wendreo, Thainan Amadeu: acquisition, analysis and interpretation of data. Tarliza Nardelli and Henriette Rosa de Oliveira Emilio by western blotting techniques and interpretation of data. Sabrina Grassioli by study design, data analysis and interpretation, article writing, critical review of relevant intellectual content. All authors approved of submitted version.

References

Schuch NJ, Garcia VC, Martini LA. Vitamina D e doenças endocrinometabólicas. **Arq Bras Endocrinol Metab**. Published online: 26 April 2009. doi: 10.1590/S0004-27302009000500015.

2 Norman AW. From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. **Am J Clin Nutr**. Published online: 1 August 2008. doi: 10.1093/ajcn/88.2.491S.

3 Marcotorchino J, Tourniaire F, Astier J, et al. (2014) Vitamin D protects against diet-induced obesity by enhancing fatty acid oxidation. **J Nutr Biochem** 25(10): 1077-83.

4 Percegoni N, Castro JMA (2014) Vitamin D, overweight and obesity – a review. **HU Rev**, 40(3): 209-19.

5 Zeitz U, Weber K, Soegiarto DW, et al. (2003) Impaired insulin secretory capacity in mice lacking a functional vitamin D receptor. **FASEB J**, 17(3): 509-11.

6 Bourlon PM, Billaudel B, Faure-Dussert A (2009) Influence of vitamin D3 deficiency and 1,25dihydroxyvitamin D3 on de novo insulin biosynthesis in the islets of the rat endocrine pancreas. **J Endocrinol**, 160(1): 87-95.

7 Jamka M, Wozniwicz M, Jeszkal J, et al. (2015) The effect of vitamin D supplementation on insulin and glucose metabolism in overweight and obese individuals: systematic review with meta-analysis. **Sci Rep**, 6(5): 01-12.

8 Kheder R, Hobbirk J, Saeed Z, et al. (2017) Vitamin D3 supplementation of a high fat high sugar diet ameliorates prediabetic phenotype in female LDLR^{-/-} and LDLR^{+/+} mice. **Immun Inflamm Dis**, 5(2): 151-62.

9 Mathieu C, Gysemans C, Giulietti A, et al. (2005) Vitamin D and diabetes. **Diabetologia**, 48(7): 1247-57.

10 Wilcox G (2005) Insulin and Insulin Resistance. **Clin Biochem Rev** [Internet] [access in 2016 Jul 25]; 26: 19-39. Available in: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1204764/>.

- 11 Alejandro EU, Gregg B, Blandino-Rossano M, et al. (2015) Natural history of beta-cell adaptation and failure in type 2 diabetes. **Mol Aspects Med**, 45: 19-42. doi: 10.1016/j.mam.2014.12.002
- 12 Palomer X, Gonzalez-Clemente JM, Blanco-Vaca F, et al. (2008) Role of vitamin D in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. **Diabetes Obe Metab**, 10(3): 185-97.
- 13 Lahbib A, Ghodbane S, Louchami K, et al. (2015) Effects of vitamin D on insulin secretion and glucose transporter GLUT2 under static magnetic field in rat. **Environ Sci Pollut Res In**, 22(22): 18011-16.
- 14 Calle C, Maestro B & Garcia-Arencibia M (2008) Genomic actions of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on insulin receptor gene expression, insulin receptor number and insulin activity in the kidney, liver and adipose tissue of streptozotocin-induced diabetic rats. **BMC Mol Biol**, [Internet] [access in 2016 sep 10]; 9(65). Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2533347/>
- 15 Pittas AG, Harris SS, Stark PC, et al. (2007) The effects of calcium and vitamin D supplementation on blood glucose and markers of inflammation in non-diabetic adults. **Diabetes Care**, [Internet] [access in 2016 may 17]; 30(4): 980–86. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17277040>
- 16 Pourshahidi LK (2015) Vitamin D and obesity: current perspectives and future directions. **Proc Nutr Soc**, [Internet] [access in 2016 dec 14]; 74(2): 115-24. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25359323>
- 17 de Boer I, Tinker LF, Connelly S, et al. (2008) Calcium plus vitamin D supplementation and the risk of incident diabetes mellitus in the Women’s Health Initiative. **Diabetes Care**, 31(4): 701–707.
- 18 Vangoitsenhoven R, Wolden-Kirk H, Lemaire Km, et al. (2016) Effect of a transcriptional inactive or absent vitamin D receptor on beta-cell function and glucose homeostasis in mice. **J Steroid Biochem Mol Biol**. [Internet] [access in 2016 ago 15]; 164: 309-17. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26877201>
- 19 Neelankal JA, Jiang FX (2018) An overview of type 2 diabetes and importance of vitamin D3-vitamin D receptor interaction in pancreatic β -cells. **J Diabetes Complications**, [Internet] [access in 2018 feb 20]. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29422234>. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2017.12.002
- 20 Gysemans CA, Cardozo AK, Callewaert H, et al. (2005) 1,25-Dihydroxyvitamin D3 modulates expression of chemokines and cytokines in pancreatic islets: implications for prevention of diabetes in nonobese diabetic mice. **Endocrinology**, 146(4): 1956-64.
- 21 Gilon P, Henquin JC (2017) Mechanisms and physiological significance of the cholinergic control of pancreatic beta-cell function. **Nat Rev Endocrinol**, 22(5): 565-74.

22 Miranda RA, Agostinho AR, Trevenzoli IH, et al. (2014) Insulin Oversecretion in MSG-Obese Rats is Related to Alterations in Cholinergic Muscarinic Receptor Subtypes in Pancreatic Islets. **Cell Physiol Biochem**, 33: 1075-86. doi: <https://doi.org/10.1159/000358677>

23 Kumar PT, Sherin A, Mohan SN, et al. (2011) Vitamin D3 restores altered cholinergic and insulin receptor expression in the cerebral cortex and muscarinic M3 receptor expression in pancreatic islets of streptozotocin induced diabetic rats. **J Nutr Biochem** [Internet] [access in 2017 jun 8]; 22(5): 418-25. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20655720>.

24 Olney JW (1969) Brain lesions, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. **Science**, 164(71): 719-21.

25 Macho L, Fickova M, Jezova D, et al. (2000) Late effects os postnatal administration os monossodium gluatamate on insulin action in adult rats. **Physiol Res**, 2000; 49: 79 – 85.

26 Diemen VV, Trindade EN, Trindade MRM (2006) Experimental model to induce obesity in rats. **Acta Cir Bras**, 21(6): 425-29.

27 Balbo SL, Gravena C, Bonfleur ML, et al. (2000) Insulin Secretion and Acetylcholinesterase Activity in Monosodium L-Glutamate-Induced Obese Mice. **Horm Res**. [Internet], [access in 2016 jun 28]; 54(4) 186-91. Available in: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11416236>.

28 Lubaczeuski C, Balbo SL, Ribeiro RA, et al. (2015) Vagotomy ameliorates islet morphofunction and body metabolic homeostasis in MSG-obese rats. **Braz J Med Biol Res** [Internet] [access in 2017 April 3]; 48(5): 447-57. Available in: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25714886>

29 Leite NS, Ferreira TR, Rickli S, et al. (2013) Glycolytic and Mitochondrial Metabolism in Pancreatic Islets from MSG-Treated Obese Rats Subjected to Swimming Training. **Cell Physiol Biochem** [Internet] [access in 2016 April 21]; 31(2-3): 242 – 56. Available in: <http://www.karger.com/Article/FullText/343365>.

30 The ARRIVE Guidelines: Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments. Originally published in **PLOS Biology**, June 2010. Available in: <https://www.nc3rs.org.uk/sites/default/files/documents/Guidelines/ARRIVE%20in%20portuguese%20%28Brazilian%29.pdf>

32 Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS (2002) Animais de Laboratório: criação e experimentação. **SciELO Books** [online]. FIOCRUZ: Rio de Janeiro [access in 2017 April 10]; 388p. Available in: <http://books.scielo.org/id/sfwjtj/pdf/andrade-9788575413869.pdf>

31 Mattaraial VGM, Moura ASAMT (2012) Productivity of Wistar rats in different mating systems. **Ciênc Rural** [Internet] [access in 2017 April 15]; 42(8): 1490-96. Available in: <http://www.scielo.br/pdf/cr/v42n8/a21312cr5598.pdf>.

- 32 SANTOS, R. E.; VIANNA, L. M. Effect of cholecalciferol supplementation on blood glucose in an experimental model of type 2 diabetes mellitus in spontaneously hypertensive rats and Wistar rats. **Clin Chim Acta**, v. 358, p. 146 – 150, 2005. doi: 10.1016/j.cccn.2005.02.020
- 33 Kadry M. Sadek & Hazem Shaheen (2014) Biochemical efficacy of vitamin D in ameliorating endocrine and metabolic disorders in diabetic rats, **Pharma Biol**, 52:5, 591-596, doi: 10.3109/13880209.2013.854812
- 34 Rogers P, Webb JP (1980) Estimation of body fat in normal and obese mice. **Br J Nutr**, 43(1): 83-6.
- 35 Bernardis LL, Patterson BD. Correlation between “Lee index” and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamis lesions (1968) **J Endocrinol**. [Internet] [access in 2016 sep 10]; 40(4): 527-28. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4868415>.
- 36 Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Treacher DF, Turner RC (1985). Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. **Diabetologia**, 28: 412-419.
- 37 Lacy PE, Kostianovsky M (1967). Method for the Isolation of Intact Islets of Langerhans from the Rat Pancreas. *Diabetes*, 16(1): 35-39. doi: <https://doi.org/10.2337/diab.16.1.35>
- 38 Hara Y, Taniguchi H, Yamashiro Y, et al (1988) An improved method for the isolation of islets from the rat pancreas. **Exp clin endocrinol**, 91(2): 171-75.
- 39 Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, 72(1-2): 248-54. doi: /10.1016/0003-2697(76)90527-3
- 40 Alberti KG, Zimmet P, Shaw J (2007) International Diabetes Federation: a consensus on Type 2 diabetes prevention. **Diabet Med**, 24(4): 451-63. doi: 10.1111/j.1464-5491.2007.02157.x
- 41 Cornier MA, Hernandez TL, Lindstrom RC, et al. (2008) The metabolic syndrome. **Endocr Rev** [Internet] [access in 2016 jul 14]; 29(7): 777-822. Available in: <http://press.endocrine.org/doi/pdf/10.1210/er.2008-002>.
- 42 El-Fakhri N, McDevitta H, Shaikh MG, et al. (2014) Vitamin D and Its Effects on Glucose Homeostasis, Cardiovascular Function and Immune Function. **Horm Res Paediatr**. [Internet] [access in 2016 jun 22]; 81(6): 363–78. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24776698>. doi: 10.1159/000357731
- 43 Wong KE, Szeto FL, Zhang W, et al. (2009) Involvement of the vitamin D receptor in energy metabolism: regulation of uncoupling proteins. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. [Internet] [access in 2016 jun 25]; 296: E820-28. Available in: <http://www.physiology.org/doi/pdf/10.1152/ajpendo.90763.2008>. doi: 10.1152/ajpendo.90763.2008.

- 44 Mahajan A, Stahl CH (2009) Dihydroxy-cholecalciferol stimulates adipocytic differentiation of porcine mesenchymal stem cells. **J Nutr Biochem**, 20(7): 512-20. doi:10.1016/j.jnutbio.2008.05.010
- 45 Mitri J, Dawson-Hughes B, Hu FB, et al (2011) Effects of vitamin D and calcium supplementation on pancreatic beta cell function, insulin sensitivity, and glycemia in adults at high risk of diabetes: the Calcium and Vitamin D for Diabetes Mellitus (CaDDM) randomized controlled trial. **Am J Clin Nutr** [Internet] [access in 2017 may 20]; 94(2): 486–94. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21715514>
- 46 Wolden-Kirk H, Overbergh L, Gysemans C, et al. (2013) Unraveling the effects of 1,25(OH)2D3 on global gene expression in pancreatic islets. **J. Steroid Biochem Mol Biol** [Internet] [access in 2017 jun 15]: 136: 68–79. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23137852>. doi: 10.1016/j.jsbmb.2012.10.017
- 47 Parikh SJ, Edelman M, Uwaifo GI, et al. (2004) The relationship between obesity and serum 1,25dihydroxi vitamin D concentrations in healthy adults. **J Clin Endocrinol Metab**, 89(3): 1196-9. doi: 10.1210/jc.2003-031398
- 48 Blum M, Dolnikowski G, Seyoum E, et al (2008) Vitamin D(3) in fat tissue. **Endocrine** [Internet] [access in 2018 jan 05]; 33(1): 90–94. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18338271>. doi: 10.1007/s12020-008-9051-4.
- 49 Kong J & Li YC (2006) Molecular mechanism of 1,25-dihydroxyvitamin D3 inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 cells. **Am J Physiol Endocrinol Metab** [Internet] [access in 2016 oct 10]; 290: E916–24. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16368784>. doi: 10.1152/ajpendo.00410.2005.
- 50 Jin W, Cuia B, Lia P et al. (2018) 1,25-Dihydroxyvitamin D3 protects obese rats from metabolic syndrome via promoting regulatory T cell-mediated resolution of inflammation. **Acta Pharma Sin**, 8(2):178–187. doi: 10.1016/j.apsb.2018.01.001
- 51 Nobre JL, Lisboa PC, Carvalho JC, et al. (2018) Leptin blocks the inhibitory effect of vitamin D on adipogenesis and cell proliferation in 3T3-L1 adipocytes. **Gen Comp Endocrinol** [Internet] [access 2018 feb 15]. doi: 10.1016/j.ygcen.2018.01.014
- 52 Farhangi MA, Nameni G, Mesgari-Abbasi M (2017) Cardiac tissue oxidative stress and inflammation after vitamin D administrations in high fat- diet induced obese rats. **Cadiovasc Disord**, 17: 161. doi: 10.1186/s12872-017-0597-z
- 53 Gilon P, Ravier MA, Jonas JC, et al. (2002) Control Mechanisms of the Oscillations of Insulin Secretion In Vitro and In Vivo. **Diabetes**, 51(1): 141-51. doi: 10.2337/diabetes.51.2007.S14
- 54 Olson ML, Maalouf NM, Oden JD, et al (2012) Vitamin D deficiency in obese children and its relationship to glucose homeostasis. **J Clin Endocrinol Metab** [Internet] [access in 2016 dec 14]; 97(1): 279–285. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22072738>

- 55 Hotamisligil GS (2000) Molecular mechanisms of insulin resistance and the role of the adipocyte. **Int J Obes Relat Metab Disord** [Internet] [access in 2016 sep 23]; 24(4): S23–S27. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11126235>
- 56 Boucher BJ, Mannan N, Noonan K, et al (1995) Glucose intolerance and impairment of insulin secretion in relation to vitamin D deficiency in East London Asians. **Diabetologia** [Internet] [access in 2016 aug 15]; 38(10): 1239–45. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8690178>
- 57 Chiu KC, Chuang LM, Yoon C (2001) The vitamin D receptor polymorphism in the translation initiation codon is a risk factor for insulin resistance in glucose tolerant Caucasians. **BMC Med Genet** [Internet] [access in 2017 jan 07]; 2(2). Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC29095/>. doi: 10.1186/1471-2350-2-2
- 58 Lee DM, Rutter MK, O’Neill TW et al. (2009) European Male Ageing Study Group. Vitamin D, parathyroid hormone and the metabolic syndrome in middle-aged and older European men. **Eur J Endocrinol** [Internet] [access in 2016 mar 14]; 161(6): 947–954. doi: 10.1530/EJE-09-0496
- 59 Jorde R, Sneve M, Emaus N, et al. (2010). Cross-sectional and longitudinal relation between serum 25-hydroxyvitamin D and body mass index: the Tromso study. **Eur J Nutr** [Internet] [access in 2016 jul 14]; 49(7): 401–407. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20204652>. doi: 10.1007/s00394-010-0098-7.
- 60 Sadeghi K, Wessner B, Laggner U et al. (2006) Vitamin D3 down-regulates monocyte TLR expression and triggers hyporesponsiveness to pathogen-associated molecular patterns. **Eur J Immunol**, 36(2): 361–370. doi: 10.1002/eji.200425995
- 61 Schneider LE, Schedl HP, McCain T, et al. (1977). Experimental diabetes reduces circulating 1,25-dihydroxyvitamin D in rat. **Science**, 196(4297): 1452-52. doi 10.1126/science.141098
- 62 Scragg R, Holdaway I, Singh V, et al. (1995) Serum 25-hydroxyvitamin D3 levels decreased in impaired glucose-tolerance and diabetes-mellitus. **Diabetes Res Clin Pract**, 27(3): 181–188. doi: 10.1016/0168-8227(95)01040-K
- 63 El-Fakhri N, McDevitta H, Shaikh MG et al. (2014) Vitamin D and Its Effects on Glucose Homeostasis, Cardiovascular Function and Immune Function. **Horm Res Paediatr**. [Internet] [access in 2016 jun 22]; 81(6): 363–78. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24776698>. doi: 10.1159/000357731
- 64 Sollid ST, Hutchinson MYS, Fuskevag OM et al. (2016) Large Individual Differences in Serum 25-Hydroxyvitamin D Response to Vitamin D Supplementation: Effects of Genetic Factors, Body Mass Index, and Baseline Concentration. Results from a Randomized Controlled Trial. **Horm Metab Res** [Internet] [access in 2017 jun 18]; 48(1): 27–34. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25702786>.
- 65 Nikooyeh B, Neyestani TR, Farvid M, et al (2011) Daily consumption of vitamin D 2 or vitamin D þ calcium-fortified yogurt drink improved glycemic control in patients with type

2 diabetes: a randomized clinical trial. **Am J Clin Nutr** [Internet] [access in 2017 jun 16]; 93(4): 764-71. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21289226>

66 Ayesha, I., and Raghuramulu, N (2000) Oral glucose tolerance is unaltered in vitamin D deficient rat. **J Nutr Sci Vitaminol** [Internet] [access in 2016 jul 12]; 46(3): 115–118. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10955276>

67 Forouhi NG, Luan JJ, Cooper A et al. (2008) Baseline Serum 25-Hydroxy Vitamin D Is Predictive of Future Glycemic Status and Insulin Resistance The Medical Research Council Ely Prospective Study 1990–2000. **Diabetes**, 57(10): 2619-65. doi: 10.2337/db08-0593

68 Parisi E, Bozic M, Ibarz M et al. (2010) Sustained activation of renal N-methyl-D-aspartate receptors decreases vitamin D synthesis: a possible role for glutamate on the onset of secondary HPT. **Am J Physiol Endocrinol Metab** [Internet] [access in 2018 jan 15]; 299(5). Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20823451>

Table Legends

Table 1. Effects of chronic supplementation with VD on biometric parameters.

CON-NS, non-supplemented control; SEM, standard error mean; CON-VD: control supplemented with Vitamin D; MSG-NS: non-supplemented monosodium glutamate; MSG-VD: monosodium glutamate supplemented with Vitamin D. Data are mean (SEM); n=10-15 rats per group. * Letters above numbers show statistical differences between groups by two-way Anova with *Tukey* post-test ($p < 0.05$). (a) CON-NS; (b) CON-VD; (c) MSG-NS and (d) MSG-VD.

Table 2. Effects of chronic supplementation with VD on biochemical plasma parameters and insulin resistance.

CON-NS, non-supplemented control; SEM, standard error mean; CON-VD: control supplemented with Vitamin D; MSG-NS: non-supplemented monosodium glutamate; MSG-VD: monosodium glutamate supplemented with Vitamin D. HOMA-IR: Homeostatic model assessment. Data are mean (SEM); n=10-15 rats per group. * Letters above numbers show statistical differences between groups by two-way Anova with *Tukey* post-test ($p < 0.05$). (a) CON-NS; (b) CON-VD; (c) MSG-NS and (d) MSG-VD.

Figure Legends

Figure 1: Effect of neonatal treatment with MSG and VD supplementation on body weight and food intake. Body weight (1.a) and food intake (1.c) were evaluated from 30 to 86 days and the respective area under the curve calculated (1.b and 1.d). The arrow in Figure 1.a indicates the beginning of statistical difference ($p < 0.05$) between rats from the MSG and CON groups. CON-NS, non-supplemented control; CON-VD: control supplemented with Vitamin D; MSG-NS: monosodium glutamate, non-supplemented; MSG-VD: monosodium glutamate supplemented with Vitamin D. AUC: area under the curve. Data are mean (SEM); $n=10-15$ rats per group. Letters above bars show statistical differences between groups by two-way Anova with *Tukey* post-test ($p < 0.05$). (a) CON-NS; (b) CON-VD; (c) MSG-NS and (d) MSG-VD.

Figure 2: Effect of neonatal treatment with MSG and chronic VD supplementation on oral glucose tolerance test. Glycemic curve after glucose load (2g/Kg BW) (2.a) and AUC (2.b). CON-NS, non-supplemented control; CON-VD: control supplemented with Vitamin D; MSG-NS: monosodium glutamate, non-supplemented; MSG-VD: monosodium glutamate supplemented with Vitamin D; AUC: area under the curve. Data are mean (SEM); $n=10-15$ rats per group. Letters above connecting lines and bars show statistical differences between groups by two-way Anova with *Tukey* post-test ($p < 0.05$). (a) CON-NS; (b) CON-VD; (c) MSG-NS and (d) MSG-VD.

Figure 3: Effect of neonatal treatment with MSG and chronic VD supplementation in endocrine pancreas. Pancreas weight is shown (3.a) and glucose-induced insulin secretion from isolated pancreatic islets at different glucose concentrations (5.6 and 8.3mM of glucose) (3.b). CON-NS, control, non-supplemented; CON-VD: control, supplemented with Vitamin D; MSG-NS: monosodium glutamate, non-supplemented; MSG-VD: monosodium glutamate supplemented with Vitamin D; AUC: area under the curve. Data are mean (SEM); $n=10-15$ rats per group. Letters above bars show statistical differences between groups by two-way Anova with *Tukey* post-test ($p < 0.05$). (a) CON-NS; (b) CON-VD; (c) MSG-NS and (d) MSG-VD.

Figure 4: Effect of neonatal treatment with MSG and chronic VD supplementation on the endocrine pancreas. Mean size and number of pancreatic islets are represented in 4.a and 4.b, respectively. Islet sizes were calculated by normalization to the CON-NS group. Representative photomicrography of pancreatic islets with Hematoxylin and Eosin stain; 10x magnification, for Figures 4.c; 4.d; 4.e; 4.f. Black arrows indicate pancreatic islets. CON-NS, control, non-supplemented; CON-VD: control, supplemented with Vitamin D; MSG-NS: monosodium glutamate, non-supplemented; MSG-VD: monosodium glutamate, supplemented with Vitamin D. Data are mean (SEM) calculated through two-way Anova with *Tukey* post-test ($p < 0.05$).

Figure 5: Effect of neonatal chronic VD supplementation on cholinergic response and protein expression in isolated pancreatic islets. The effect of CCh (10 μ M) on glucose-induced insulin secretion (8.3mM) is shown (5.a). The mAChR3 (5.b), PKC α (5.c) and PKA α (5.d) protein expressions were obtained from isolated pancreatic islets. CCh – carbachol; results are expressed by the raw data obtained from the ratio of the quantification of the protein of interest by the quantification of tubulin. CON-NS, control, non-supplemented; CON-VD: control, supplemented with Vitamin D; MSG-NS: monosodium glutamate, non-supplemented; MSG-VD: monosodium glutamate supplemented with Vitamin D. Data are mean (SEM); n=4-6 rats per group. Letters above bars show statistical differences between groups by two-way Anova with *Tukey* post-test ($p < 0.05$). (a) CON-NS; (b) CON-VD; (c) MSG-NS and (d) MSG-VD.

Table 1. Effects of chronic supplementation with VD on biometric parameters.

	CON-NS Mean	SEM	CON-VD Mean	SEM	MSG-NS Mean	SEM	MSG-VD Mean	SEM	p-value MSG	p-value VD	p-value interaction
Body Weight (g)	351.62 ^{c,d}	8.04	363.92 ^{c,d}	6.76	268.54 ^{a,b}	11.35	248.54 ^{a,b}	6.00	<0.0001	0.615	0.048
Naso-anal length (cm)	22.40 ^{c,d}	0.19	22.78 ^{c,d}	0.13	19.47 ^{a,b}	0.26	19.79 ^{a,b}	0.26	<0.0001	0.106	0.871
Lee Index	312.80	4.41	315.20	3.03	333.30	9.53	322.20	8.47	0.044	0.517	0.312
Inguinal Fat (g/100g)	0.18 ^{c,d} _{uvv}	0.02	0.16 ^{c,d} _{uvv}	0.01	0.62 ^{a,b} _{uvv}	0.08	0.46 ^{a,b} _{uvv}	0.05	<0.0001	0.071	0.201
Perirenal Fat (g/100g)	0.22 ^{c,d}	0.02	0.29	0.02	0.36 ^a	0.04	0.36 ^a	0.03	0.0032	0.3522	0.3095

CON-NS, control, non-supplemented; SEM, standard error mean; CON-VD: control, supplemented with Vitamin D; MSG-NS: monosodium glutamate, non-supplemented; MSG-VD: monosodium glutamate, supplemented with Vitamin D. Data are mean (SEM); n=10-15 rats per group.* Letters above numbers show statistical differences between groups by two-way Anova with Tukey post-test ($p < 0.05$). (a) CON-NS; (b) CON-VD; (c) MSG-NS and (d) MSG-VD.

Table 2. Effects of chronic supplementation with VD on biochemical plasma parameters and insulin resistance.

	CON-NS Mean	SEM	CON-VD Mean	SEM	MSG-NS Mean	SEM	MSG-VD Mean	SEM	p-value MSG	p-value VD	p-value interaction
Glycemia (mg/dL)	105.90 ^c	9.39	107.70 ^c	9.08	153.60 ^{a,b} ^{uvv}	14.78	128.20 ^a	10.48	0.0027	0.2792	0.2138
Insulinemia (ng/mL)	0.42 ^c	0.09	1.22 ^c	0.34	3.92 ^{a,b,d}	0.93	0.55 ^c	0.13	0.0020	0.0046	0.0007
Triglycerides (mg/dL)	84.98 ^c	8.26	69.98 ^c	7.94	127.60 ^{a,b,d} ^{uvv}	11.97	63.28 ^c	8.64	0.0599	0.0001	0.0126
Total Cholesterol mg/dL)	105.60 ^d	4.50	108.80 ^d	5.19	120.30 ^d	10.50	160.70 ^{a,b,c}	5.12	< 0.0001	0.0031	0.0106
HOMA-IR	3.12 ^c	0.79	7.63 ^c	2.03	49.04 ^{a,b,d}	14.52	5.17 ^c	0.58	0.0349	0.0426	0.0102

CON-NS, control, not-supplemented; SEM, standard error mean; CON-VD: control, supplemented with Vitamin D; MSG-NS: monosodium glutamate, not-supplemented; MSG-VD: monosodium glutamate, supplemented with Vitamin D; HOMA-IR: Homeostatic model assessment. Data are mean(SEM); n=10-15 rats per group. * Letters above numbers show statistical differences between groups by two-way **Anova** with **Tukey** post-test ($p < 0.05$). (a) CON-NS; (b) CON-VD; (c) MSG-NS and (d) MSG-VD.

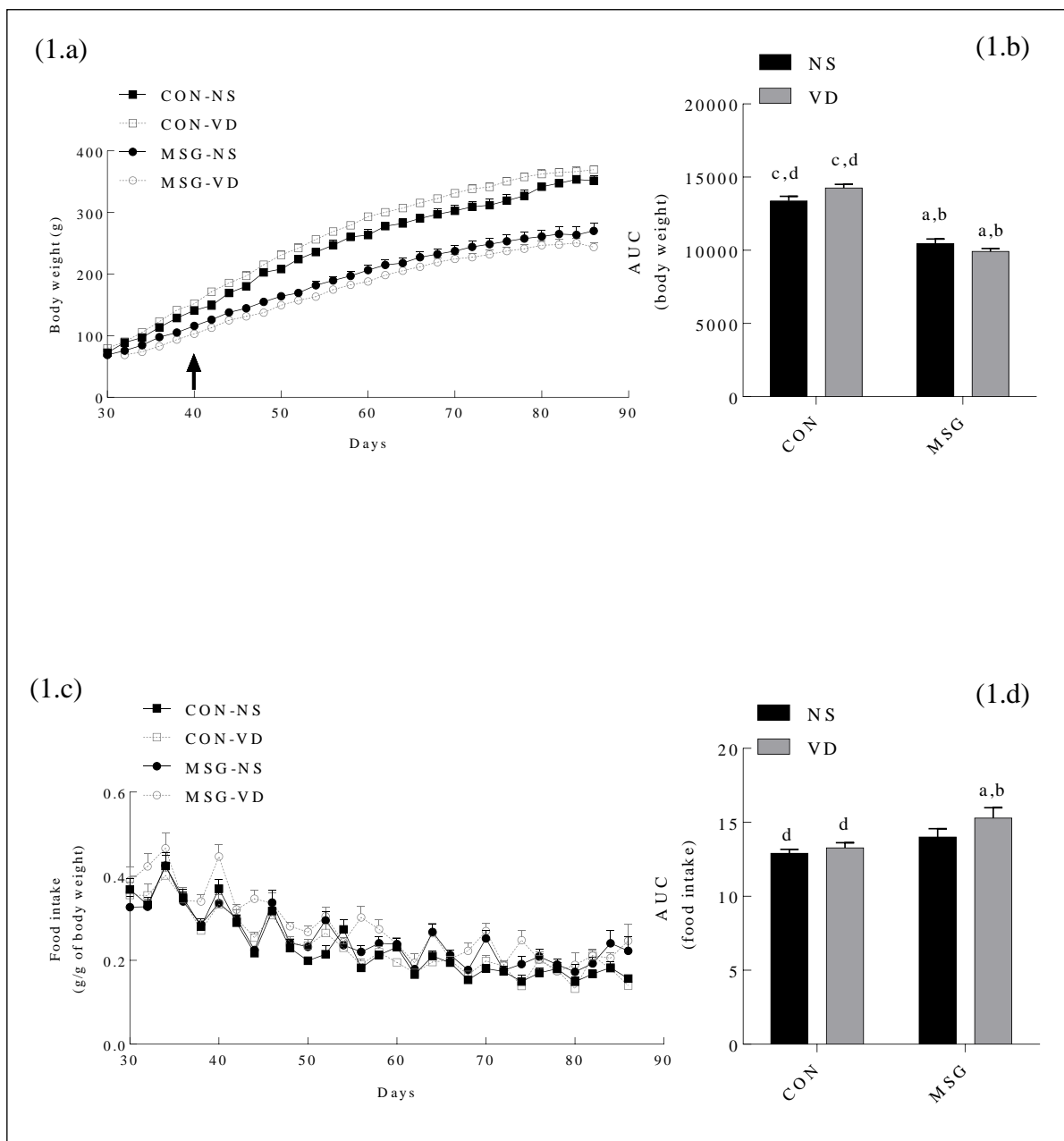


Figure 1: Effect of neonatal treatment with MSG and VD supplementation on body weight and food intake. Body weight (1.a) and food intake (1.c) were evaluated from 30 to 86 days and the respective area under the curve calculated (1.b and 1.d). The arrow in Figure 1.a indicates the beginning of statistical difference ($p < 0.05$) between rats from the MSG and CON groups. CON-NS, non-supplemented control; CON-VD: control supplemented with Vitamin D; MSG-NS: monosodium glutamate, non-supplemented; MSG-VD: monosodium glutamate supplemented with Vitamin D. AUC: area under the curve. Data are mean (SEM); $n=10-15$ rats per group. Letters above bars show statistical differences between groups by two-way Anova with *Tukey* post-test ($p < 0.05$). (a) CON-NS; (b) CON-VD; (c) MSG-NS and (d) MSG-VD.

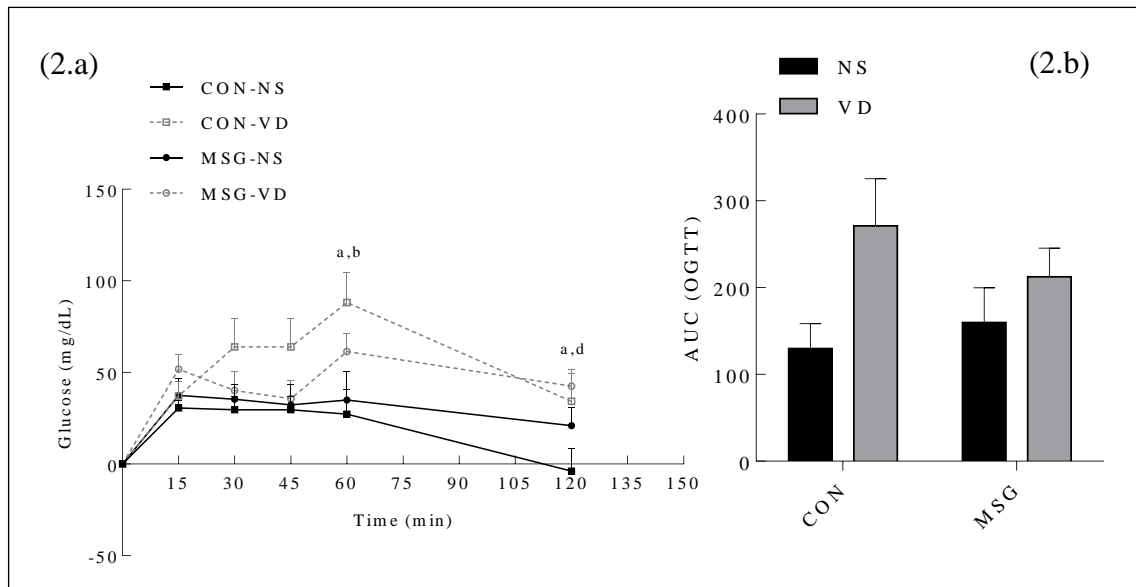


Figure 2: Effect of neonatal treatment with MSG and chronic VD supplementation on oral glucose tolerance test. Glycemic curve after glucose load (2g/Kg BW) (2.a) and AUC (2.b). CON-NS, non-supplemented control; CON-VD: control supplemented with Vitamin D; MSG-NS: monosodium glutamate, non-supplemented; MSG-VD: monosodium glutamate supplemented with Vitamin D; AUC: area under the curve. Data are mean (SEM); n=10-15 rats per group. Letters above connecting lines and bars show statistical differences between groups by two-way Anova with *Tukey* post-test ($p < 0.05$). (a) CON-NS; (b) CON-VD; (c) MSG-NS and (d) MSG-VD.

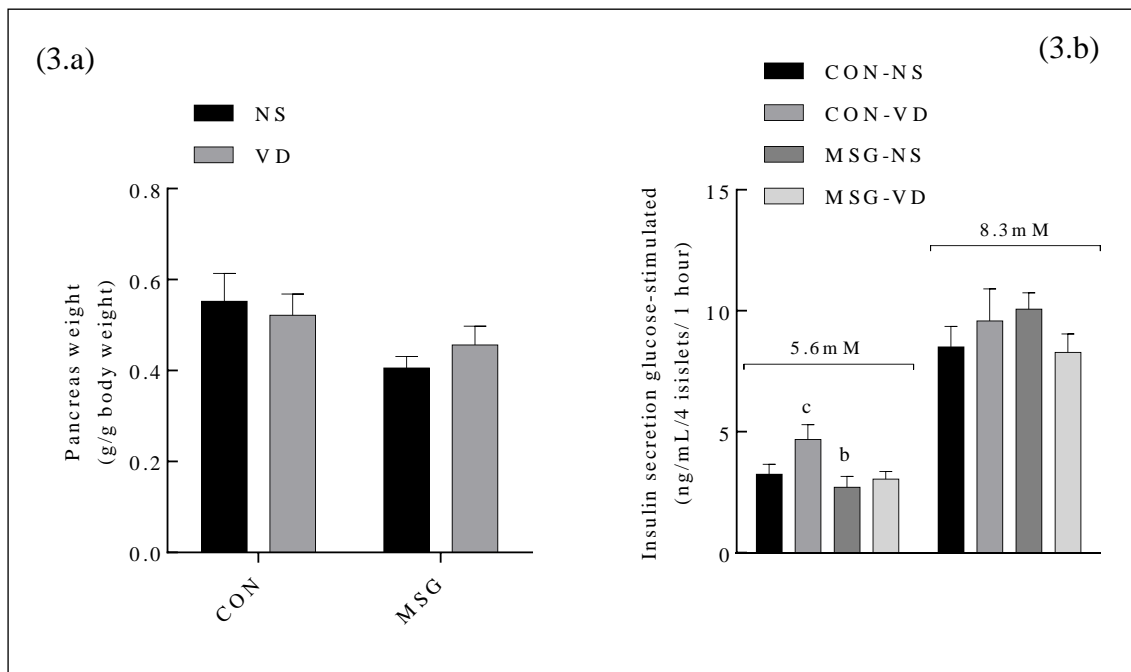


Figure 3: Effect of neonatal treatment with MSG and chronic VD supplementation in endocrine pancreas. Pancreas weight is shown (3.a) and glucose-induced insulin secretion from isolated pancreatic islets at different glucose concentrations (5.6 and 8.3mM of glucose) (3.b). CON-NS, control, non-supplemented; CON-VD: control, supplemented with Vitamin D; MSG-NS: monosodium glutamate, non-supplemented; MSG-VD: monosodium glutamate supplemented with Vitamin D; AUC: area under the curve. Data are mean (SEM); n=10-15 rats per group. Letters above bars show statistical differences between groups by two-way Anova with *Tukey* post-test ($p < 0.05$). (a) CON-NS; (b) CON-VD; (c) MSG-NS and (d) MSG-VD.

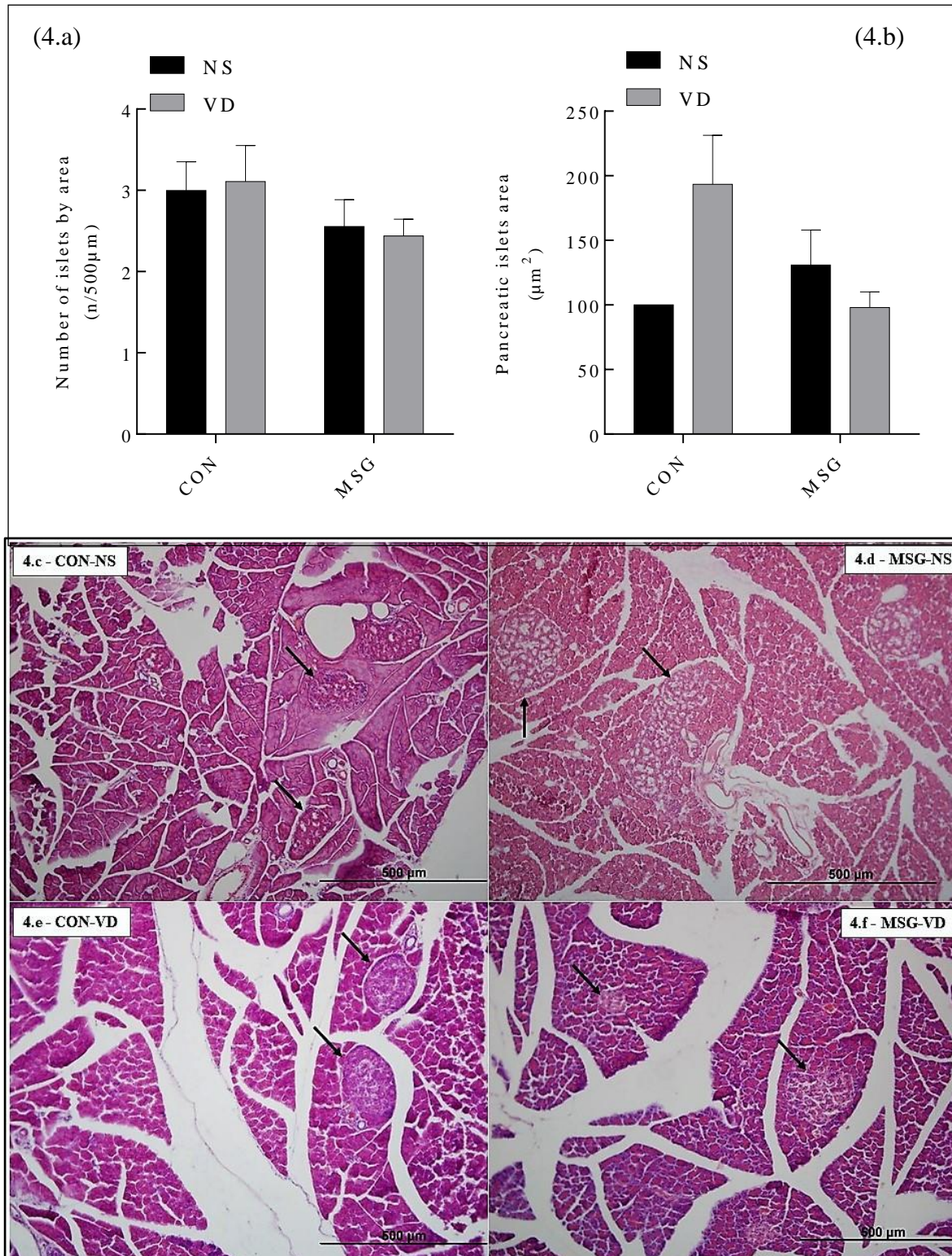


Figure 4: Effect of neonatal treatment with MSG and chronic VD supplementation on the endocrine pancreas. Mean size and number of pancreatic islets are represented in 4.a and 4.b, respectively. Islet sizes were calculated by normalization to the CON-NS group. Representative photomicrography of pancreatic islets with Hematoxylin and Eosin stain; 10x magnification, for Figures 4.c; 4.d; 4.e; 4.f. Black arrows indicate pancreatic islets. CON-

NS, control, non-supplemented; CON-VD: control, supplemented with Vitamin D; MSG-NS: monosodium glutamate, non-supplemented; MSG-VD: monosodium glutamate (5.b) supplemented with Vitamin D. Data are mean (SEM) calculated through two-way Anova with *Tukey* post-test ($p < 0.05$).

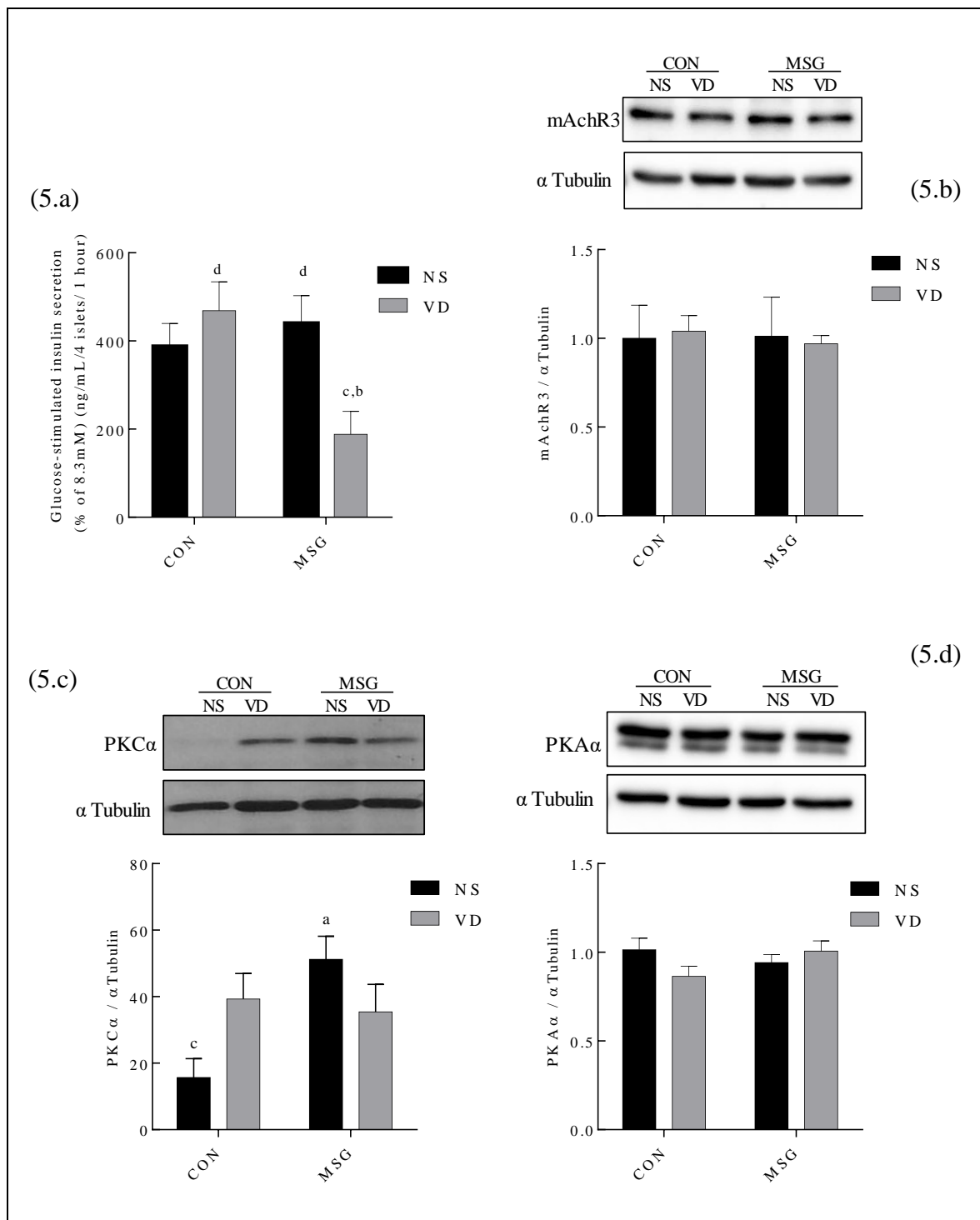


Figure 5: Effect of neonatal chronic VD supplementation on cholinergic response and

protein expression in isolated pancreatic islets. The effect of CCh (10 μ M) on glucose-induced insulin secretion (8.3mM) is shown (5.a). The mAChR3 (5.b), PKC α (5.c) and PKA α (5.d) protein expressions were obtained from isolated pancreatic islets. CCh – carbachol; results are expressed by the raw data obtained from the ratio of the quantification of the protein of interest by the quantification of tubulin. CON-NS, control, non-supplemented; CON-VD: control, supplemented with Vitamin D; MSG-NS: monosodium glutamate, non-supplemented; MSG-VD: monosodium glutamate supplemented with Vitamin D. Data are mean (SEM); n=4-6 rats per group. Letters above bars show statistical differences between groups by two-way Anova with *Tukey* post-test ($p < 0.05$). (a) CON-NS; (b) CON-VD; (c) MSG-NS and (d) MSG-VD.

APÊNDICE:

ANEXO A:

Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais da
Universidade Estadual do Oeste do Paraná



Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA

PARECER DE PROTOCOLO

O protocolo intitulado "A administração de vitamina D potencializa os efeitos do exercício físico sobre a obesidade hipotalâmica?", sob vossa coordenação, foi avaliado pelo CEUA como **APROVADO** para execução.

ATENÇÃO!

O Certificado Experimental deste Protocolo, somente será emitido após o encerramento das atividades previstas e após o encaminhamento do Relatório Final ao CEUA. Este Parecer **NÃO** tem valor como Certificado Experimental.

Cascavel, 13/11/2015

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'L. Fariña', written over a circular stamp or watermark.

Profa. Dra. Luciana Oliveira de Fariña
Coordenadora do CEUA
Portaria nº 2729/2014 - GRE

ANEXO B:

Normas da revista científica

British Journal of Nutrition

INSTRUCTIONS FOR CONTRIBUTORS

British Journal of Nutrition (BJN) is an international peer-reviewed journal that publishes original papers and review articles in all branches of nutritional science. The journal welcomes submission of manuscripts that in which the primary aim is to develop nutritional concepts.

SUBMISSION

This journal uses ScholarOne Manuscripts for online submission and peer review. Complete guidelines for preparing and submitting your manuscript to this journal are provided below.

SCOPE

BJN encompasses the full spectrum of nutritional science and submission of manuscripts that report studies in the following areas is strongly encouraged:

Epidemiology, dietary surveys, nutritional requirements and behaviour, metabolic studies, body composition, energetics, appetite, obesity, ageing, endocrinology, immunology, neuroscience, microbiology, genetics, and molecular and cell biology. The focus of all manuscripts submitted to the journal should be to increase knowledge in nutritional science.

The articles published in BJN are expected to be directly relevant to human or animal nutrition. Please ensure that studies which involve the following experimental designs should meet the following criteria:

In vivo and in vitro models

Studies involving animal models of human nutrition and health or disease **will only be considered for publication** if the amount of a nutrient or combination of nutrients used could reasonably be expected to be achieved in the human population.

Studies involving in vitro models **will be considered for publication** if the amount of a nutrient or combination of nutrients is demonstrated to be within the range that could reasonably be expected to be encountered in vivo, and that the molecular form of the nutrient or nutrients is the same as that to which the cell type used in the model would encounter in vivo.

Manuscripts reporting studies on the following topics are discouraged: Pilot studies; case studies; papers on food technology, food science or food chemistry; studies of primarily local interest; studies on herbs, spices or other flavouring agents, pharmaceutical agents or that compare the effects of nutrients to those of medicines, traditional medicines, complementary medicines or other substances that are considered to be primarily medicinal agents; studies in which a nutrient or extract is not administered by the oral route (unless the specific aim of the study is to investigate parenteral nutrition); studies using non-physiological amounts of nutrients (unless the specific aim of the study is to investigate toxic effects); caffeine, food contaminants.

REVIEW PROCESS

BJN uses a single blind review process.

As part of the online submission process, authors are asked to affirm that the submission represents original work that has not been published previously, and that it is not currently being considered by another journal. Authors must also confirm that each author has seen and approved the contents of the submitted manuscript. Finally, authors should confirm that permission for all appropriate uses has been obtained from the copyright holder for any figures or other material not in his/her copyright, and that the appropriate acknowledgement has been made to the original source. At submission, authors are asked to nominate at least four potential referees who may then be asked by the Editorial Board to help review the work. Manuscripts are normally reviewed by two external peer reviewers and a member of the Editorial Board. When substantial revisions are required to manuscripts after review, authors are normally given the opportunity to do this once only; the need for any further changes should at most reflect only minor issues. If a paper requiring revision is not resubmitted within 2 months, it may, on resubmission, be deemed a new paper and the date of receipt altered accordingly.

PUBLISHING ETHICS

BJN considers all manuscripts on the strict condition that:

- The manuscript is your own original work, and does not duplicate any other previously published work;

- The manuscript has been submitted only to the journal - it is not under consideration or peer review or accepted for publication or in press or published elsewhere;
- All listed authors know of and agree to the manuscript being submitted to the journal; and
- The manuscript contains nothing that is abusive, defamatory, fraudulent, illegal, libellous, or obscene.

The Journal adheres to the Committee on Publication Ethics (COPE) guidelines on research and publications ethics.

Text taken directly or closely paraphrased from earlier published work that has not been acknowledged or referenced will be considered plagiarism. Submitted manuscripts in which such text is identified will be withdrawn from the editorial process. If a concern is raised about possible plagiarism in an article submitted to or published in BJN, this will be investigated fully and dealt with in accordance with the COPE guidelines.

ARTICLE TYPES

BJN publishes the following: Research Articles, Review Articles, Systematic Reviews, Horizons in Nutritional Science, Workshop Reports, Invited Commentaries, Letters to the Editor, Obituaries, and Editorials.

Research Articles, Reviews, Systematic Reviews, Horizons Articles, Letters to the Editor and Workshop Reports should be submitted to <http://mc.manuscriptcentral.com/bjn>. Please contact the Editorial Office on bjn.edoffice@cambridge.org regarding any other types of

DETAILED MANUSCRIPT PREPARATION INSTRUCTIONS

Language

Papers submitted for publication must be written in English and should be as concise as possible. We recommend that authors for whom English is not their first language have their manuscript checked by someone whose first language is English before submission, to ensure that submissions are judged at peer review exclusively on academic merit. Please see the Author Language Services section below for more information. Spelling should generally be that of the ***Concise Oxford Dictionary*** (1995), 9th ed. Oxford: Clarendon Press. Authors are advised to consult a current issue in order to make themselves familiar with BJN as to

typographical and other conventions, layout of tables etc. Sufficient information should be given to permit repetition of the published work by any competent reader of BJN.

Published examples of BJN article types can be found below:

- Research Article
- Review Article
- Horizons Article
- Letter to the Editor

Authorship

The Journal conforms to the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) definition of authorship, as described by P.C. Calder (*Br J Nutr* (2009) 101, 775). Authorship credit should be based on:

1. Substantial contributions to conception and design, data acquisition, analysis and/or interpretation;
2. Drafting the article or revising it critically for important intellectual content; and
3. Final approval of the version to be published.

The contribution of individuals who were involved in the study but do not meet these criteria should be described in the Acknowledgments section.

Ethical standards

The required standards for reporting studies involving humans and experimental animals are detailed in an Editorial by G.C. Burdge (*Br J Nutr* (2014) 112).

Experiments involving the use of other vertebrate animals

Papers that report studies involving vertebrate animals must conform to the 'ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research' detailed in Kilkenney et al. (*J Pharmacol Pharmacother* (2010) 1, 94-99) and summarised at www.nc3rs.org.uk. Authors MUST ensure that their manuscript conforms to the checklist that is available from the nc3Rs website (the completed check list should be uploaded as a separate document during submission of the manuscript). The attention of authors is drawn particularly to the ARRIVE guidelines point 3b ('Explain how and why the animal species and model being used can address the scientific objectives and, where appropriate, the study's relevance to human biology', point 9c ('Welfare-related assessments and interventions that were carried out prior to, during, or after the experiment') and point 17a ('Give details of all important adverse

events in each experimental group'). The Editors will not accept papers reporting work carried out involving procedures that cause or are considered likely to cause distress or suffering which would confound the outcomes of the experiments, or experiments that have not been reviewed and approved by an animal experimentation ethics committee or regulatory organisation.

Required disclosures: Where a paper reports studies involving vertebrate animals, authors must state in the Experimental Methods section the institutional and national guidelines for the care and use of animals that were followed and that all experimental procedures involving animals were approved by the [insert name of the ethics committee or other approving body; wherever possible authors should also insert a specific ethics/approval number].

Manuscript Format

The requirements of BJN are in accordance with the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals produced by the ICMJE.

Typescripts should be prepared with 1.5 line spacing and wide margins (2 cm), the preferred font being Times New Roman size 12. At the ends of lines, words should not be hyphenated unless hyphens are to be printed. **Line numbering and page numbering are required.**

MANUSCRIPTS SHOULD BE ORGANISED AS FOLLOWS:

Cover letter

Papers should be accompanied by a cover letter including a brief summary of the work and a short explanation of the novelty of the study and how it advances nutritional science. The text for the cover letter should be entered in the appropriate box as part of the online submission process.

Title Page

The title page should include:

1. The title of the article;
2. Authors' names;
3. Name and address of department(s) and institution(s) to which the work should be attributed for each author;
4. Name, mailing address, email address, telephone and fax numbers of the author responsible for correspondence about the manuscript;

5. A shortened version of the title, not exceeding 45 characters (including letters and spaces) in length;

6. At least four keywords or phrases (each containing up to three words).

Authors' names should be given without titles or degrees and one forename may be given in full. Identify each author's institution by a superscript number (e.g. A.B. Smith¹) and list the institutions underneath and after the final author.

Abstract

Each paper must open with an unstructured abstract of **not more than 250 words**. The abstract should be a single paragraph of continuous text without subheadings outlining the aims of the work, the experimental approach taken, the principal results (including effect size and the results of statistical analysis) and the conclusions and their relevance to nutritional science.

Introduction

It is not necessary to introduce a paper with a full account of the relevant literature, but the introduction should indicate briefly the nature of the question asked and the reasons for asking it. It should be **no longer than two manuscript pages**.

Experimental methods

The methods section must include a subsection that describes the methods used for statistical analysis (see the section on statistical analysis in the [Appendix](#)) and the sample size must be justified by the results of appropriate calculations and related to the study outcomes.

Justification of sample size: All manuscripts that report primary research must contain a statistical justification of sample size that is stated explicitly in the Statistics sub-section of the Methods. Manuscripts that do not contain this information will be returned to the authors for correction before peer review. The amended versions will be treated as new submissions. The information required must include, but not be restricted to, the following:-

- Hypothesised effect size with appropriate justification.
- A statement regarding statistical power (typically 80%) and the two-sided significance level (typically 0.05).

- An explanation of how the statistical power was calculated.
- If sample size is determined by the feasibility of recruitment minimally detectable effect sizes should be provided instead of power analysis.

The only exceptions are:-

- Meta-analyses.
- Exploratory or secondary analysis of observational studies based on large sample sizes

For studies involving humans subjects or experimental animals, the Methods section must include a subsection that reports the appropriate ethical approvals for the study (see Ethical Standards above).

All analytical procedures must be accompanied by a statement of within and between assay precision.

Diets: The nutrient composition of diets used in studies published in BJN must be described in detail, preferably in a table(s). Experimentally relevant differences in composition between diets are essential. For instance, studies of fat nutrition should always include fatty acid compositions of all diets.

PCR analysis: Where experiments involve measurement of mRNA including microarray analysis, for analysis of individual genes, mRNA should be measured by quantitative RTPCR. A statement about the quality and integrity of the RNA must be provided together with the results of electrophoretic analysis of the purity of the PCR products. Unless published elsewhere, full details of the oligonucleotide primers and of the PCR protocol must be stated either in the text or in Supplementary Material. The stability of reference genes used for normalisation of PCR data must be reported for the experimental conditions described. Where possible, analysis of mRNA levels should be accompanied by assessment of either protein levels or activities.

Microarray analysis: Studies involving microarray analysis of mRNA must conform to the "Minimum Information about a Microarray Experiment" (MIAME) guidelines including deposition of the raw data in an appropriate repository (the Access Code must be stated in the Methods). All microarray experiments must be accompanied by appropriate validation by quantitative RTPCR.

Results

These should be given as concisely as possible, using figures or tables as appropriate. Data must not be duplicated in tables and figures.

Discussion

While it is generally desirable that the presentation of the results and the discussion of their significance should be presented separately, there may be occasions when combining these sections may be beneficial. Authors may also find that additional or alternative sections such as 'conclusions' may be useful. The discussion should be **no longer than five manuscript pages**.

Acknowledgments

Here you may acknowledge individuals or organizations that provided advice and/or support (non-financial). Formal financial support and funding should be listed in the following section.

Financial Support

Please provide details of the sources of financial support for all authors, including grant numbers. For example, "This work was supported by the Medical research Council (grant number XXXXXX)". Multiple grant numbers should be separated by a comma and space, and where research was funded by more than one agency the different agencies should be separated by a semi-colon, with "and" before the final funder. Grants held by different authors should be identified as belonging to individual authors by the authors' initials. For example, "This work was supported by the Wellcome Trust (A.B., grant numbers XXXX, YYYY), (C.D., grant number ZZZZ); the Natural Environment Research Council (E.F., grant number FFFF); and the National Institutes of Health (A.B., grant number GGGG), (E.F., grant number HHHH)". This disclosure is particularly important in the case of research that is supported by industry. Support from industry not only includes direct financial support for the study but also support in kind such as provision of medications, equipment, kits or reagents without charge or at reduced cost and provision of services such as statistical analysis; all such support must be disclosed here and if no such support was received this must be stated. Where no specific funding has

been provided for research, please provide the following statement: "This research received no specific grant from any funding agency, commercial or not-for-profit sectors." In addition to the source of financial support, please state whether the funder contributed to the study design, conduct of the study, analysis of samples or data, interpretation of findings or the preparation of the manuscript. If the funder made no such contribution, please provide the following statement: "[Funder's name] had no role in the design, analysis or writing of this article."

Conflict of Interest

Please provide details of all known financial, professional and personal relationships with the potential to bias the work. Where no known conflicts of interest exist, please include the following statement: "None."

For more information on what constitutes a conflict of interest, please see the [International Committee of Medical Journal Editors \(ICMJE\) guidelines](#).

Authorship

Please provide a very brief description of the contribution of each author to the research. Their roles in formulating the research question(s), designing the study, carrying it out, analysing the data and writing the article should be made plain.

References

References should be numbered consecutively in the order in which they first appear in the text using superscript Arabic numerals in parentheses, e.g. 'The conceptual difficulty of this approach has recently been highlighted^(1,2)'. If a reference is cited more than once, the same number should be used each time. References cited only in tables and figure legends should be numbered in sequence from the last number used in the text and in the order of mention of the individual tables and figures in the text. Names and initials of authors of unpublished work should be given in the text as 'unpublished results' and not included in the References. References that have been published online only but not yet in an issue should include the online publication date and the Digital Object Identifier (doi) reference, as per the example below.

At the end of the paper, on a page(s) separate from the text, references should be listed in numerical order using the Vancouver system. When an article

has more than three authors only the names of the first three authors should be given followed by '*et al.*' The issue number should be omitted if there is continuous pagination throughout a volume. Titles of journals should appear in their abbreviated form using the [NCBI LinkOut page](#). References to books and monographs should include the town of publication and the number of the edition to which reference is made. References to material available on websites should follow a similar style, with the full URL included at the end of the reference, as well as the date of the version cited and the date of access.

Examples of correct forms of references are given below.

Journal articles

1. Rebello SA, Koh H, Chen C *et al.* (2014) Amount, type, and sources of carbohydrates in relation to ischemic heart disease mortality in a Chinese population: a prospective cohort study. *Am J Clin Nutr* **100**, 53-64.
2. Villar J, Ismail LC, Victora CG *et al.* (2014) International standards for newborn weight, length, and head circumference by gestational age and sex: the Newborn Cross-Sectional Study of the INTERGROWTH-21st Project. *Lancet* **384**, 857-868.
3. Alonso VR & Guarner F (2013) Linking the gut microbiota to human health. *Br J Nutr* **109**, Suppl. 2, S21–S26.
4. Bauserman M, Lokangaka A, Gado J et al. A cluster-randomized trial determining the efficacy of caterpillar cereal as a locally available and sustainable complementary food to prevent stunting and anaemia. *Public Health Nutr.* Published online: 29 January 2015. doi: 10.1017/S1368980014003334.

Books and monographs

1. Bradbury J (2002) Dietary intervention in edentulous patients. PhD Thesis, University of Newcastle.
2. Ailhaud G & Hauner H (2004) Development of white adipose tissue. In *Handbook of Obesity. Etiology and Pathophysiology*, 2nd ed., pp. 481–514 [GA Bray and C Bouchard, editors]. New York: Marcel Dekker.
3. Bruinsma J (editor) (2003) *World Agriculture towards 2015/2030: An FAO Perspective*. London: Earthscan Publications.

4. World Health Organization (2003) ***Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases***. Joint WHO/FAO Expert Consultation. WHO Technical Report Series no. 916. Geneva: WHO.
5. Keiding L (1997) ***Astma, Allergi og Anden Overfølsomhed i Danmark – Og Udviklingen 1987–1991 (Asthma, Allergy and Other Hypersensitivities in Denmark, 1987–1991)***. Copenhagen, Denmark: Dansk Institut for Klinisk Epidemiologi.

Sources from the internet

1. Nationmaster (2005) HIV AIDS – Adult prevalence rate. http://www.nationmaster.com/graph-T/hea_hiv_aid_ad... (accessed June 2013).

Figures

Figures should be supplied as separate electronic files. Figure legends should be grouped in a section at the end of the manuscript text. Each figure should be clearly marked with its number and separate panels within figures should be clearly marked (a), (b), (c) etc. so that they are easily identifiable when the article and figure files are merged for review. Each figure, with its legend, should be comprehensible without reference to the text and should include definitions of abbreviations. The nature of the information displayed in the figures (e.g. mean (SEM)) and the statistical test used must be stated. We recommend that only TIFF, EPS or PDF formats are used for electronic artwork. Other non-preferred but usable formats are JPG, PPT and GIF files and images created in Microsoft Word. Note that these non-preferred formats are generally NOT suitable for conversion to print reproduction. For further information about how to prepare your figures, including sizing and resolution requirements, please see our [artwork guide](#).

In curves presenting experimental results the determined points should be clearly shown, the symbols used being, in order of preference, ○, ●, Δ, ▲, □, ■, ×, +. Curves and symbols should not extend beyond the experimental points. Scale-marks on the axes should be on the inner side of each axis and should extend beyond the last experimental point. Ensure that lines and symbols used in graphs and shading used in histograms are large enough to be easily identified when the figure size is reduced to fit the printed page. Statistically significant effects should be indicated with symbols or letters.

Colour figures will be published online free of charge, and there is a fee of £350 per figure for colour figures in the printed version. If you request colour figures in the printed version, you will be contacted by CCC-Rightslink who are acting on our behalf to collect colour charges. Please follow their instructions in order to avoid any delay in the publication of your article. Images submitted with a manuscript should be minimally processed; some image processing is acceptable (and may be unavoidable), but the final image must accurately represent the original data. Grouping or cropping of images must be identified in the legend and indicated by clear demarcation. Please refer to the [Office of Research Integrity guidelines](#) on image processing in scientific publication. Authors should provide sufficient detail of image-gathering procedures and process manipulation in the Methods sections to enable the accuracy of image presentation to be assessed. Authors should retain their original data, as Editors may request them for comparison during manuscript review.

Tables

Tables should be placed in the main manuscript file at the end of the document, not within the main text. Please **do not** supply tables as images (e.g. in TIFF or JPG format). Be sure that each table is cited in the text. Tables should carry headings describing their content and should be comprehensible without reference to the text. The dimensions of the values, e.g. mg/kg, should be given at the top of each column. Separate columns should be used for measures of variance (SD, SE etc.), the \pm sign should not be used. The number of decimal places used should be standardized; for whole numbers 1.0, 2.0 etc. should be used. Shortened forms of the words weight (wt) height (ht) and experiment (Expt) may be used to save space in tables, but only Expt (when referring to a specified experiment, e.g. Expt 1) is acceptable in the heading. Footnotes are given in the following order: (1) abbreviations, (2) superscript letters, (3) symbols. Abbreviations are given in the format: RS, resistant starch. Abbreviations in tables must be defined in footnotes in the order that they appear in the table (reading from left to right across the table, then down each column). Symbols for footnotes should be used in the sequence: *†‡§||¶, then ** etc. (omit * or †, or both, from the sequence if they are used to indicate levels of significance).

For indicating statistical significance, superscript letters or symbols may be used. Superscript letters are useful where comparisons are within a row or column and the level of significance is uniform, e.g. ^{a,b,c}Mean values within a column with unlike superscript letters were significantly different ($P < 0.05$). Symbols are useful for indicating significant differences between rows or columns, especially where different levels of significance are found, e.g. 'Mean values were significantly different from those of the control group: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ '. The symbols used for P values in the tables must be consistent.

Supplementary material

Additional data (e.g. data sets, large tables) relevant to the paper can be submitted for publication online only, where they are made available via a link from the paper. The paper should stand alone without these data. Supplementary Material must be cited in a relevant place in the text of the paper.

Although Supplementary Material is peer reviewed, it is not checked, copyedited or typeset after acceptance and it is loaded onto the journal's website exactly as supplied. You should check your Supplementary Material carefully to ensure that it adheres to journal styles. Corrections cannot be made to the Supplementary Material after acceptance of the manuscript. Please bear this in mind when deciding what content to include as Supplementary Material.

ANEXO C:**Tampão para Isolamento de Ilhotas - Solução de HANKS (Ph 7,4)**

Reagentes	1 Litro de solução
NaCl	8g
KCl	0,4g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2g
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	0,121g
KH ₂ PO ₄	0,06g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,185g
Gaseificar por 10 minutos em carbogênio, após gasear:	
NaHCO ₃	0,35g
No momento em que a solução for utilizada, acrescentar:	
Glicose	1g
Albumina	1g

Quadro 3: Solução de Hanks.**Tampão para Isolamento de Ilhotas - Solução de KREBES**

Solução 1 25% + Solução 2 25% + Solução 3 25% + H₂O 25%

Sal	g/L	mM
NaCl	6,7	115,0
NaHCO ₃	2,0	24,0
KCl	0,4	5,0
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,2	1,0
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,4	2,5

Solução	Sal	g/L
1	NaCl	26,8
2	KCl	1,6
	MgCl ₂ .6H ₂ O	0,8
Para solução 2, no momento do uso adicionar: NaHCO ₃ : 840mg/L Hepes: 3,57g/L		
3	CaCl ₂ .2H ₂ O	1,6

Quadro 4: Solução de Krebs.

ANEXO D:**Solução Tampão para Extração Protéica**

Soluto	20ml de Solução
EDTA	500 μ L
Uréia	8,41g
Tiouréia	3,05g
NaF (100mM)	84mg
Pirofosfato (100mM)	90mg
Completar para 20 mL com água miliQ.	

Quadro 5: Solução tampão para Western Blottin, primeira parte.

Fazer alíquotas de 1mL (congelar) e acrescentar no dia do experimento em uma alíquota:

Soluto	Quantidade
Ortovanadato (10mM)	37,8mg diluir em 200 μ L de água miliQ e acrescentar 10 μ L em 1mL de tampão.
PMSF	9mg em 1000 μ L de etanol e acrescentar 50 μ L em 1 mL de tampão.
Aprotinina	1 μ L da solução concentrada
Triton (1%)	100 μ L do triton 10%

Quadro 6: Solução tampão para Western Blottin, segunda parte.

ANEXO E:**Solução de fixação:****1. Em tecidos para análise histológica**

Reagente	100ml de ALFAC
Álcool 80%	85ml
Formol 40%	10ml
Ácido acético	5ml

Quadro 7: Solução de ALFAC.**2. Fixação do tecido à lâmina - microtomia****Albumina estoque**

50ml de clara de ovo

50ml de glicerina ou glicerol

Liquidificar durante 2 minutos, parar. Liquidificar durante 3 minutos e desligar. Filtrar com gaze. Estocar em frasco de vidro com tampa sob refrigeração.

Solução de uso:

50ml de água destilada

10 gotas da solução estoque

3. Silanização de lâminas

Solução de Silano:

98mL de acetona pura

2mL de silano

Mergulhar as lâminas durante 20 segundos na solução de Silano; Banhar 4 vezes com acetona pura durante 1 minuto cada banho.