

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

**CAMILA LUBACZEUSKI**

**PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA NERVOSO  
PARASSIMPÁTICO NO METABOLISMO ENERGÉTICO E NA  
PROLIFERAÇÃO CELULAR EM ILHOTAS PANCREÁTICAS  
DE RATOS OBESOS-MSG**

CASCAVEL-PR  
(agosto/2013)

**CAMILA LUBACZEUSKI**

**PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA NERVOSO  
PARASSIMPÁTICO NO METABOLISMO ENERGÉTICO E NA  
PROLIFERAÇÃO CELULAR EM ILHOTAS PANCREÁTICAS  
DE RATOS OBESOS-MSG**

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: Biologia, processo saúde-doença e políticas de saúde.

ORIENTADORA: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Lúcia Bonfleur

CASCAVEL-PR  
(agosto/2013)

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**  
**Biblioteca Central do Campus de Cascavel – Unioeste**  
**Ficha catalográfica elaborada por Jeanine da Silva Barros CRB-9/1362**

L961p Lubaczeuski, Camila  
Participação do sistema nervoso parassimpático no metabolismo energético e na proliferação celular em ilhotas pancreáticas de ratos obesos-MSG / Camila Lubaczeuski.— Cascavel, PR: UNIOESTE, 2013.  
72 f. ; 30 cm

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lúcia Bonfleur  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná.  
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Biociências e Saúde, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde.  
Bibliografia.

1. Obesidade. 2. Sistema nervoso parassimpático. 3. Proliferação de células  $\beta$ . I. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. II. Título.

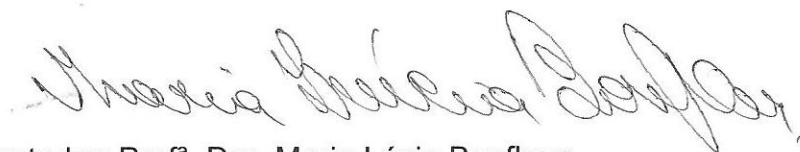
CDD 21.ed. 616.462

FOLHA DE APROVAÇÃO

CAMILA LUBACZEUSKI

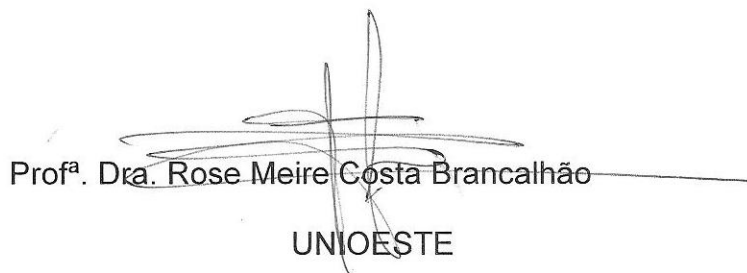
**PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA NERVOSO PARASSIMPÁTICO NA  
PROLIFERAÇÃO CELULAR EM ILHOTAS PANCREÁTICAS DE  
RATOS OBESOS-MSG**

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.



Orientador: Profª. Dra. Maria Lúcia Bonfleur

UNIOESTE



Profª. Dra. Rose Meire Costa Brancalhão

UNIOESTE



Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro

UNICAMP

CASCADEL-PR

(agosto/2013)

## **AGRADECIMENTOS**

À professora Maria Lúcia Bonfleur, pelas orientações, paciência e dedicação à pesquisa.

À Professora Sandra Lucinei Balbo, pela sinceridade e conselhos que contribuíram muito para meu amadurecimento e aprendizado.

Aos professores Everardo Magalhães Carneiro e Antônio Carlos Boschero, pela gentileza e prontidão em ceder o laboratório de Pâncreas Endócrino e Metabolismo para realização dos experimentos.

Aos pesquisadores do Laboratório de Pâncreas Endócrino e Metabolismo da UNICAMP, em especial a Tarlliza, o Jean, a Patrícia e a Junia, por todos os ensinamentos, ajuda e dedicação, vocês foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos e pesquisadores do Laboratório de Fisiologia Endócrina e Metabolismo da UNIOESTE, por toda ajuda.

À Rosane, pela amizade e contribuição científica e intelectual.

Às minhas amigas e amigos, pelo companheirismo e acima de tudo pela amizade.

Aos professores e colegas do Mestrado em Biociências e Saúde, por compartilhar conhecimentos e pela contribuição durante essa caminhada.

Ao Leandro pela motivação e carinho.

Aos meus pais e ao meu irmão, por todo amor, carinho e dedicação, por estarem ao meu lado todos os dias.

Muito obrigada!!

## RESUMO

O crescente número de pessoas com sobrepeso e obesidade tem levado ao aumento no número de pacientes com resistência à insulina (RI) e portadores do Diabetes *mellitus* tipo 2. Ratos obesos MSG são intolerantes à glicose (Gli), RI e suas ilhotas pancreáticas secretam mais insulina em resposta à concentrações de Gli. A vagotomia subdiafragmática altera a responsividade das ilhotas à Gli e melhora a homeostase glicêmica nestes animais, sugerindo um desbalanço do sistema nervoso autonômico, com aumento do tônus parassimpático e redução do simpático. Estudos demonstram que o sistema nervoso parassimpático (SNP) possui efeito na proliferação das células  $\beta$ -pancreáticas. Desta forma, investigamos a participação do SNP, através da vagotomia subdiafragmática, no metabolismo energético e na proliferação das ilhotas e de células  $\beta$ -pancreáticas de ratos obesos-MSG. Para isto, ratos *Wistar* machos receberam durante os cinco primeiros dias de vida glutamato monossódico (grupo MSG) ou salina (grupo CTL). A vagotomia subdiafragmática foi realizada aos 30 dias de vida formando os grupos MVAG e CVAG. Aos 90 dias, verificamos a secreção estática de insulina, homeostase glicêmica e lipídica, morfometria do pâncreas e conteúdo proteico da ERK nas ilhotas. Ratos MSG apresentaram redução do peso corporal e comprimento nasoanal, aumento do índice de Lee e acúmulo de gordura, normoglicêmia, hiperinsulinemia, dislipidemia, intolerância à Gli e RI comparados aos CTL. A vagotomia realizada aos 30 dias de vida preveniu obesidade, acúmulo de gordura no fígado e melhorou a tolerância à Gli e a sensibilidade à insulina em ratos MVAG adultos em relação aos ratos MSG. As ilhotas dos animais MSG secretaram mais insulina quando estimulada pela Gli, em relação aos animais CTL. As análises histológicas mostram que as ilhotas pancreáticas dos animais MSG são menores com redução da área das células  $\beta$  sem alteração nas células  $\alpha$  em relação aos CTL. O grupo MSG apresenta um aumento do número das ilhotas por  $\text{mm}^2$ , que pode estar contribuindo com o aumento da massa relativa das ilhotas e das células  $\beta$ . Esse efeito está associado ao aumento da proliferação no grupo MSG. O número de ilhotas foi menor nos MVAG em relação aos MSG. A vagotomia realizada aos 30 dias de vida reduziu a área das ilhotas e das células  $\beta$  aos 90 dias de vida nos animais CVAG. Finalmente, a massa relativa das ilhotas e da células  $\beta$  no MVAG e CVAG foram similares ao CTL. Verificamos se a ERK estava envolvida na proliferação das células  $\beta$  nos ratos MSG, porém não apresentaram alterações desta proteína. Pela primeira vez demonstramos que ratos MSG apresentam aumento da proliferação das células  $\beta$  que contribui com o aumento da secreção de insulina em resposta à Gli. O nervo vago é o principal fator envolvido neste processo, visto que a vagotomia realizada aos 30 dias de vida preveniu as alterações morfológicas das ilhotas nos ratos MVAG adultos.

**Palavras-chave:** obesidade MSG; nervo vago; sistema nervoso parassimpático; proliferação das células  $\beta$ .

## ABSTRACT

The growing number of overweight and obesity has led to an increase in the number of patients with insulin resistance and diabetes mellitus type 2. MSG obese rats were glucose intolerant, insulin resistant and their pancreatic islets secrete more insulin in response to glucose. Subdiaphragmatic vagotomy changes the response of islets to glucose and improves glucose homeostasis, supporting the hypothesis that an unbalance of autonomic nervous system with increased parasympathetic nervous system (PNS) action but a decreased sympathetic nervous system function. Studies showed that the PNS is also involved in  $\beta$ -cell proliferation. Therefore, we investigated of PNS participation, using a subdiaphragmatic vagal denervation, upon pancreatic  $\beta$ -cell function and mass regulation, and the body glucose control disruption in MSG-obese rats. For this, Male Wistar rats received during the first five days of life monosodium glutamate (MSG) or saline. Subdiaphragmatic vagotomy was performed at 30 days of life. At 90 days of age, we verified static insulin secretion, pancreas morphometric, ERK expression in islets, glucose homeostasis and lipidis. The MSG treatment caused obesity at 90 days of life. MSG rats presented lower body weight and nasoanal length, increased Lee index and fat depots, normoglycemia, hyperinsulinemia, dyslipidemia, glucose intolerance and insulin resistance when compared to CTL. Vagotomy performed at 30-days of age prevented obesity, fat deposition in the liver and ameliorated glucose tolerance and insulin sensitivity in adult MVAG rats in relation to MSG rats. Islets from MSG rats secreted more insulin at stimulatory glucose concentrations than CTL islets. Histological analysis showed that pancreatic islets from MSG rats were lower with a reduction in  $\beta$ -cell area without modification in  $\alpha$ -cell content when compared with CTL. Also, MSG group presented an increased number of pancreatic islets per  $\text{mm}^2$ , with higher number of islets, which may contributes to the higher islet and  $\beta$ -cell relative mass in the MSG pancreas. These effects were associated with enhanced proliferation in MSG group. The number of MVAG pancreatic islet were less than MSG. Vagotomy performed at 30-days of age, reduced islet and  $\beta$ -cell area in the pancreas from 90-days old CVAG rats. Finally, the relative islet and  $\beta$ -cell mass in MVAG and CVAG rats was similar to CTL. Here we verified if ERK was involved in  $\beta$ -cell replication in MSG rats, but presented no alteration. We demonstrate for the first time that adult MSG rats showed enhanced pancreatic  $\beta$ -cell proliferation which contributes to the higher islet insulin secretion in response to glucose. The vagus nerve is the main factor involved in such a process, since vagotomy performed at 30 days of age prevented islet morphological alterations in adult MVAG rats. Possibly this increase PNS activity in MSG endocrine pancreas is responsible to hyperinsulinemia that enhanced fat storage, damaged glucose homeostasis and insulin action in MSG obesity.

**Keywords:** MSG-obesity; vagus nerve; parasympathetic nervous system;  $\beta$ -cell proliferation.

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>4</b>
<b>RESUMO GERAL</b> .....	<b>5</b>
<b>GENERAL ABSTRACT</b> .....	<b>6</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>8</b>
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>1</b>
<b>REVISÃO GERAL DE LITERATURA</b> .....	<b>5</b>
A Obesidade e DM tipo II.....	5
Secreção e ação da insulina.....	8
Envolvimento do SNA na secreção de insulina.....	10
Proliferação das Células $\beta$ .....	12
Modelos Animais de Obesidade.....	15
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>17</b>
<b>ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	<b>27</b>
INVOLVEMENT OF THE VAGUS NERVE IN $\beta$ -CELL PROLIFERATION AND WHOLE-BODY GLUCOSE CONTROL DISRUPTION IN MSG-OBESE RATS.....	27
<b>ANEXO A</b> .....	<b>62</b>
Certificado do Comitê de Ética.....	62
<b>ANEXO B</b> .....	<b>64</b>
Normas do periódico <i>American Journal of Physiology - Endocrinology and     Metabolism</i> .....	64



## LISTA DE ABREVIATURAS

AC - adenilato ciclase	IGF-1 - fator de crescimento semelhante à insulina
Ach - acetilcolina	INCA - Instituto Nacional do Câncer
Akt - proteína serina/treonina quinase	IP3 - inositol-1,4,5-trifosfato
AMPc - adenosina monofosfato cíclico	IR - receptor de insulina
ARC - núcleo arqueado	IRS - substratos do IR
CCh - carbacol	K <sup>+</sup> ATP - Canal de K <sup>+</sup> sensível ao ATP
CTL - grupo controle	LH - hipotálamo lateral
CVAG - grupo controle + vagotomia	MSG - glutamato monossódico
DAG - diacilglicerol	MVAG- grupo MSG + vagotomia
DM - Diabetes <i>Mellitus</i>	NE - norepinefrina
DM1 - Diabetes <i>Mellitus</i> tipo 1	NPY - neuropeptídeo Y
DM2 - Diabetes <i>Mellitus</i> tipo 2	PACAP - polipeptídeo pituitário ativador da 4 adenilato ciclase
E - epinefrina	PDK1 - proteína quinase dependente de PI
EM - eminência mediana	PI - fosfatidilinositol
EPAC - <i>Exchange protein directly activated by AMPc</i>	PI3-K - fosfatidilinositol-3-quinase
ERK1/2 - <i>Extracellular signal-regulated kinases 1/2</i>	PKA - proteína quinase A
GH - hormônio do crescimento	PKC - proteína quinase C
GHRH - hormônio liberador do hormônio de crescimento	PLC - fosfolipase C
Gli - glicose	RI - resistência à insulina
GLP-1 - peptídeo semelhante ao glucagon 1	SNA - sistema nervoso autonômico
GRP - peptídeo liberador da gastrina	SNC - sistema nervoso central
HGF - fator de crescimento do hepatócito	SNP - sistema nervoso parassimpático
IDF - Federação Internacional de Diabetes	SNS - sistema nervoso simpático
	UKPDS - estudo de prospecção do diabetes no Reino Unido
	VIP - peptídeo inibitório vasoativo
	VMH - hipotálamo ventro-medial

## INTRODUÇÃO GERAL

Nas últimas décadas a obesidade alcançou proporções alarmantes, principalmente em países desenvolvidos e em desenvolvimento, atingindo indivíduos de todas as idades. Em 2011, 49% da população brasileira estavam acima do peso e 16% apresentavam obesidade (BRASIL, 2011). A obesidade é um problema de saúde pública, pois reduz a qualidade de vida, causando problemas psicológicos, sociais, locomotores entre outros. Sobrepeso e obesidade são importantes fatores de risco para doenças cardiovasculares e condições associadas. Essas desordens incluem intolerância à glicose (Gli), Diabetes *Mellitus* tipo 2 (DM2), hipertensão arterial, dislipidemia (SOWERS, 1989) e hipercolesterolemia (REYNOLDS *et al.*, 2007).

O Diabetes *Mellitus* (DM) configura-se como uma epidemia mundial, traduzindo-se em grande desafio para os sistemas de saúde de todo o mundo. Segundo a Federação Internacional de Diabetes (IDF), a doença afeta 246 milhões de pessoas no planeta e estima-se que até 2025 afete 380 milhões (IDF, 2010). No Brasil, em 2011, cerca de 6% da população foram diagnosticados com DM (BRASIL, 2011).

Em relação à fisiopatologia do DM, observa-se que esta doença compreende um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos, envolvendo todos os substratos energéticos (carboidratos, proteínas e gorduras), caracterizado principalmente pela hiperglicemia crônica (UKPDS 33, 1998). O DM2 é o mais comum, perfazendo cerca de 90% dos casos de DM. É uma doença epidêmica, que afeta mais de 150 milhões de pessoas em todo o mundo e com previsão de duplicar nas primeiras décadas desse milênio (NARAYAN *et al.*, 2000). Desse total, cerca de 80% estão acima do peso ou são obesos (BRAY, 1990), sendo o principal fator preditor da ocorrência de DM em uma população.

Existem pelo menos dois mecanismos que contribuem para a etiopatogenia do DM2: alteração na secreção de insulina e/ou resistência à insulina (RI). A RI é uma condição genética e/ou adquirida, na qual concentrações fisiológicas de insulina provocam uma resposta subnormal na captação de Gli pelas células, especialmente no músculo esquelético e tecido adiposo. Em consequência da hiperglicemia, as

células  $\beta$ -pancreáticas sintetizam e secretam mais insulina, aumentando a concentração circulante deste hormônio. Assim, a RI é acompanhada de hiperinsulinemia (PRENTKI; NOLAN, 2006).

A capacidade das ilhotas pancreáticas em responder às elevações na concentração plasmática de Gli, com aumento na secreção de insulina, é o evento principal na preservação da homeostase glicêmica e prevenção da instalação do quadro de DM2. A secreção de insulina depende de uma fina regulação na maquinaria secretória das células  $\beta$ . A secreção é ajustada, continuamente, de acordo com as flutuações dos níveis de nutrientes circulantes, em especial, a Gli (BOSCHERO, 1996). A secreção de insulina também é modulada, direta ou indiretamente, por hormônios, agentes farmacológicos e neurotransmissores.

O sistema nervoso autonômico (SNA) modula a secreção de insulina pelas células  $\beta$ -pancreáticas (PÉNICAUD *et al.*, 1996). A estimulação do sistema nervoso parassimpático (SNP) causa aumento da liberação de acetilcolina (Ach) que se liga ao receptor muscarínico nas células  $\beta$ -pancreáticas, potencializando a secreção de insulina. Já o sistema nervoso simpático (SNS) libera o neurotransmissor norepinefrina (NE), a qual liga-se a receptores  $\alpha$ -adrenérgicos nas células  $\beta$ -pancreáticas inibindo a secreção de insulina (SCHEURINK; STTEFENS; GAYJEMA, 1990). Entretanto, a NE, quando liga-se a receptores  $\beta$ -adrenérgicos, estimula a secreção de insulina (AHREN; LUNDQUIST I, 1981). Além de estimular a secreção de insulina, o SNP também está envolvido na manutenção normal da massa de células  $\beta$ , bem como, em condições patológicas (EDVELL; LINDSTRÖM, 1998; IMAI *et al.*, 2008; KIBA *et al.*, 1996; LAUSIER *et al.*, 2010; MEDINA *et al.*, 2013; SUZUKI *et al.*, 2011; YOSHIMURA *et al.*, 2006).

O pâncreas endócrino está sujeito a mudanças em resposta às variações na demanda de insulina. As células  $\beta$  são reguladas para manter a euglicemia (BONNER-WEIR, 1994) e são constantemente mantidas sob um balanço delicado por meio da formação de novas células, morte celular e mudanças no volume de células individuais (SWENNE, 1992).

Uma série de sinais extras e intracelulares que afetam a maquinaria do ciclo celular regulam a proliferação das células  $\beta$ -pancreáticas. Entre esses sinais, encontram-se a Gli (BONNER-WEIR *et al.*, 1989), fatores de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) (RABINOVITCH *et al.*, 1982), insulina (LEFFERT *et al.*, 1979), hormônio do crescimento (GH) e lactogênios placentários (PARSONS *et*

*al.*, 1983; PARSONS; BRELJE; SORENSON, 1992). Em cultura de células pancreáticas, INS1 e Min6, a Gli e outros nutrientes ativam a via de sinalização da *Extracellular signal-regulated kinases 1/2* (ERK1/2), a qual induz e potencializa a secreção de insulina, além de estar envolvida na proliferação celular (FRÖDIN *et al.*, 1995, KHOO; COBB, 1997).

Fatores neurais também podem induzir a proliferação celular (EDVELL; LINDSTROM, 1998; YAMAGUCHI *et al.*, 1973). Kiba *et al.* (1991) demonstraram que a hiperatividade vagal, em ratos com lesão no hipotálamo ventro-medial (VMH), resulta em proliferação das células  $\beta$  pancreáticas. A vagotomia em camundongos *ob/ob* promove diminuição da proliferação das células  $\beta$  pancreáticas (EDVELL; LINDSTROM, 1998; YAMAGUCHI *et al.*, 1973). Estudos recentes demonstram que o ramo pancreático do nervo vago, ativado por aferentes hepáticos do nervo esplâncnico, exerce efeito sobre a massa de células  $\beta$  (IMAI *et al.*, 2008).

Devido à relação entre o DM2 e a obesidade, e a necessidade de investigar os possíveis fatores fisiopatológicos envolvidos, são utilizados diferentes modelos de obesidade animal. O tratamento neonatal com glutamato monossódico (MSG), promove lesões químicas em regiões hipotalâmicas específicas, levando ao desenvolvimento da obesidade (OLNEY; SHARPE, 1969; OLNEY, 1969). Este modelo animal mimetiza a obesidade hipotalâmica em humanos, a qual pode ser desencadeada por tumores, cirurgias e radioterapias (BRAY, 1984; LUSTIG, 2002).

Camundongos e ratos obesos MSG adultos (90 dias de vida) apresentam hiperinsulinemia e moderada hiperglicemia de jejum (LUCINEI BALBO *et al.*, 2000; NARDELLI *et al.*, 2012). As ilhotas pancreáticas isoladas desses animais secretam o dobro de insulina quando comparadas com o controle na presença de concentrações basais de Gli (5,6 mM), porém quando estas ilhotas são estimuladas com concentrações supra-fisiológicas de Gli (16,7 mM), apresentam uma resposta significativamente menor em relação aos controles, indicando desregulação da secreção de insulina (LUCINEI BALBO *et al.*, 2000). O modelo MSG também apresenta evidências de um desarranjo no SNA (SCOMPARIN *et al.*, 2009). A atividade colinesterásica do cérebro total, hipotálamo, tálamo e córtex de ratos obesos-MSG é maior quando comparada aos animais controles (BONFLEUR *et al.*, 2000). Camundongos obesos-MSG jovens (30 dias de vida) apresentam aumento da atividade acetilcolinesterásica no pâncreas e fígado, a qual persiste aos 60 e 90 dias (LUCINEI BALBO *et al.* 2000). Ilhotas pancreáticas de ratos obesos MSG secretam

altos níveis de insulina quando incubadas com Gli, e apresentam baixa sensibilidade ao carbacol (CCh). A vagotomia subdiafragmática precoce bloqueia parcialmente o acúmulo de gordura no modelo MSG, impede as alterações na responsividade das ilhotas pancreáticas, e a instalação da RI, reforçando a hipótese do desarranjo autonômico (BALBO *et al.*, 2000).

Desta forma, considerando que o DM2 relaciona-se com a obesidade; que em pacientes diabéticos as células  $\beta$ -pancreáticas tendem a progredir para um estado de falência parcial ou total ao longo dos anos; a necessidade de pesquisas básicas que busquem desvendar os mecanismos fisiológicos envolvidos na manutenção das células  $\beta$ -pancreáticas; que ratos obesos-MSG são um excelente modelo para se estudar a relação do DM e obesidade; que ratos obesos-MSG apresentam um desarranjo do SNA e que suas ilhotas isoladas apresentam maior responsividade à Gli; que estudos demonstram que o SNP possui papel na proliferação das células  $\beta$ -pancreáticas; e que não há dados na literatura que demonstram o efeito deste sistema nervoso sobre a proliferação das ilhotas de ratos obesos-MSG; investigamos neste trabalho o efeito do SNP, através da vagotomia subdiafragmática realizada aos 30 dias, sobre a proliferação das ilhotas e de células  $\beta$ -pancreáticas em ratos obesos-MSG com 90 dias de vida, bem como, sobre o metabolismo energético.

## REVISÃO GERAL DE LITERATURA

### ***A Obesidade e DM tipo II***

Desde a pré-história a obesidade esteve presente nos seres humanos, porém era vista como símbolo de beleza e fertilidade. No período neolítico (aproximadamente 10.000 anos a.C.) as “deusas” eram cultuadas por seus quadris, coxas e mamas volumosas. Nesta mesma época, Hipócrates, médico greco-romano, já alertava em seus manuscritos para os perigos que a obesidade oferecia para a saúde, afirmando que indivíduos com excesso de peso apresentavam maior chance de morte súbita que indivíduos magros. Galeno afirmava que a obesidade era consequência da falta de disciplina do indivíduo, e classificou a obesidade em: obesidade natural ou moderada e obesidade mórbida ou exagerada (CUNHA; NETO; JUNIOR, 2006).

Atualmente, a obesidade é considerada uma epidemia mundial, presente tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento (POPKIN; DOAK, 1998) e afeta indivíduos cada vez mais jovens (BRAY; CHAMPAGNE, 2005), tem como consequência aumento da frequência e gravidade de suas comorbidades, como hipertensão arterial e DM. Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) os custos com o excesso de peso para os sistemas de saúde são altos, envolvem gastos com o tratamento da obesidade e suas consequências e a perda de renda pela redução da produtividade e do absenteísmo devido à doença ou incapacidade ou ainda devido às mortes prematuras (INCA, 2004).

O estudo da obesidade mediante a análise e avaliação dos aspectos interdisciplinares inerentes ao tema é considerado relevante. Os programas para redução do peso corporal devem focar as bases do comportamento alimentar e desenvolver, efetivamente, ações interdisciplinares que permitam obter resultados eficazes no tratamento da obesidade. A realização de simpósios e encontros acadêmicos deve discutir o tema levando em consideração os múltiplos aspectos interdisciplinares que envolvem esta síndrome, discutindo o conceito contemporâneo de obesidade do ponto de vista molecular e genético; a relação da obesidade entre a fisiologia e fisiopatologia do sistema endócrino e cardiovascular; os aspectos psicológicos, as sequelas do sedentarismo sobre os sistemas orgânicos; as

alternativas farmacológicas e os procedimentos cirúrgicos existentes para o controle e tratamento da obesidade; a importância dos alimentos e das práticas alimentares para preservação da saúde e da qualidade de vida e os vários benefícios físicos, psicológicos e sociais na prevenção e no tratamento do excesso de peso e da obesidade (BARROSO, 2012).

Na obesidade ocorrem alterações no equilíbrio energético do organismo, onde a obtenção de energia excede seu gasto e o excesso é armazenado na forma de gordura no tecido adiposo (ROHNER-JEANRENAUD; JEANRENAUD, 1987). A obesidade resulta de uma combinação de fatores genéticos, ambientais, neurais entre outros. Entre os fatores neurais observa-se que o hipotálamo é o principal centro regulador do apetite e do peso (ELMQUIST; ELIAS; SAPER, 1999; HETHERINGTON; RANSON, 1940). Tumores ou lesões em diferentes regiões hipotalâmicas podem levar ao desenvolvimento da obesidade (BRAY; GALLAGHER, 1975; BRAY, 1984). Estudos em ratos mostraram que lesões no VMH, no núcleo paraventricular e eminência mediana (EM) dorsal causam hiperfagia e obesidade (HETHERINGTON; RANSON, 1940), enquanto, lesões no hipotálamo lateral (LH) induz hipofagia (ANAND; BROBECK, 1951). Além dos fatores neurais, fatores ambientais tais como disponibilidade ilimitada e baixo custo de alimentos altamente calóricos, juntamente com o sedentarismo crescente, têm desempenhado um importante papel na pandemia de obesidade no adulto (WALLEY; BLAKEMORE; FROGUEL, 2006).

Indivíduos obesos apresentam maior risco para o desenvolvimento de doenças cardíacas, respiratórias, problemas psicológicos (SAMANIC *et al.*, 2006) e doenças metabólicas como dislipidemia e DM. Estudos demonstram que quatro milhões de mortes por ano estão associadas ao DM e suas complicações, o que representa 9% da mortalidade mundial total. O grande impacto econômico ocorre notadamente nos serviços de saúde, como consequência dos crescentes custos do tratamento da doença e, sobretudo das complicações relacionadas com o DM. O maior custo, entretanto, recai sobre os portadores e suas famílias reduzindo a expectativa e a qualidade de vida. Atualmente, o DM é uma das doenças crônicas mais onerosas para os sistemas de saúde, e sua prevalência vem aumentando em proporções epidêmicas (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2002). Nesse contexto, as medidas de prevenção tornam-se as únicas estratégias de redução da morbimortalidade causada por essa doença. Para Paiva, Bersusa e Escuder (2006),

o controle metabólico rigoroso associado a medidas preventivas e curativas relativamente simples são capazes de prevenir ou retardar o aparecimento das complicações crônicas do DM, resultando em melhor qualidade de vida ao indivíduo diabético. A atuação da equipe interdisciplinar de forma contínua, persistente, e em conjunto com o paciente e familiares pode minimizar o surgimento das complicações advindas da falta de cuidado e no manejo do paciente ao longo do tempo (HASHIMOTO, 2006).

O DM é uma doença que necessita de mudanças que duram toda a vida e seu tratamento exige uma terapia médico nutricional, medicações diárias, exercícios físicos programados, automonitorização da glicemia, cuidados com o corpo, educação permanente e modificação comportamental. Desse modo, torna-se necessário uma ação educativa para instruir e conscientizar o diabético da importância do seu conhecimento sobre a DM como parte integral do cuidado, proporcionando um melhor convívio com a doença, tornando-o protagonista de seu tratamento (BIRAL; CARDOSO; GRUSPAN, 2005).

O DM compreende um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos, envolvendo todos os substratos energéticos (carboidratos, proteínas e gorduras), sendo caracterizado principalmente pela hiperglicemia crônica, a qual pode causar danos microvasculares, macrovasculares e neuropáticos. A hiperglicemia se manifesta por sintomas como poliúria, polidipsia, perda de peso, polifagia e visão turva ou por complicações agudas, tais como a cetoacidose diabética e a síndrome hiperosmolar hiperglicêmica não cetótica, que causam riscos à vida (UKPDS 33, 1998).

As formas mais frequentes do DM são: a) DM insulino-dependente ou tipo 1 (DM1) e b) DM não-insulino-dependente ou tipo 2 (DM2) (KUMAR, 2002). No DM1 ocorre destruição das células  $\beta$ -pancreáticas, usualmente por processo auto-imune (tipo 1A) ou, menos comum, de causa desconhecida (forma idiopática, tipo 1B) (ATKINSON; MACLAREN, 1994). Na forma auto-imune há um processo de insulite e estão presentes auto-anticorpos circulantes (anticorpos anti-descarboxilase do ácido glutâmico, anti-ilhotas, anti-insulina etc.). De forma geral, a instalação do quadro de DM1 auto-imune é relativamente abrupta e muitas vezes o indivíduo pode identificar a data de início dos sintomas. O DM2 é mais comum, perfazendo cerca de 90% dos casos de DM. É uma doença epidêmica, afetando mais de 150 milhões de pessoas em todo o mundo e com expectativa de duplicação nas primeiras décadas desse



milênio (NARAYAN *et al.*, 2000). Desse total, cerca de 80% estão acima do peso ou são obesos (BRAY, 1990) sendo o principal fator preditor da ocorrência do DM em uma população.

Existem pelo menos dois mecanismos que contribuem para a etiopatogenia do DM2: alteração na secreção de insulina e/ou a RI. Acredita-se que na fase inicial há predomínio da resistência, com hiperinsulinemia compensatória, com o intuito de manter a normoglicemia. Em uma fase posterior, ocorre a falência das células  $\beta$ , com diminuição da secreção de insulina (“exaustão”), resultando em hiperglicemia. O paciente pode também apresentar RI e hiperinsulinemia, sem falência das células  $\beta$ , dessa forma, continuar com valores glicêmicos normais (PRATLEY; WEYER, 2001).

### **Secreção e ação da insulina**

O pâncreas é formado por dois tecidos principais: os ácinos, responsáveis pelas secreções de enzimas digestivas, e as ilhotas pancreáticas, que secretam principalmente, os hormônios insulina e glucagon. A insulina, sintetizada nas células  $\beta$ , desempenha papel importante no armazenamento de energia, agindo, principalmente, nos músculos, fígado e tecido adiposo ( BOSCHERO, 1995).

A secreção de insulina pelas células  $\beta$  é controlada continuamente de acordo com as flutuações da concentração de nutrientes circulantes, em especial, a Gli (HIRIART; AGUILAR-BRYAN, 2008; STRAUB; SHARP, 2002). Os mecanismos responsáveis pela secreção de insulina estimulada pela Gli iniciam-se com o transporte deste açúcar pelas células  $\beta$ -pancreáticas, através de um transportador específico denominado de GLUT 2; a Gli é fosforilada à Gli-6-fosfato pela enzima glicocinase e metabolizada gerando ATP. O resultado é o aumento da relação ATP/ADP, que provoca o fechamento de um canal de  $K^+$  sensível ao ATP ( $K^+$ ATP), presente na membrana da célula  $\beta$ . A redução do efluxo de  $K^+$  das células leva à despolarização da membrana que, por sua vez, provoca a abertura de canais de  $Ca^{2+}$  sensíveis à voltagem e influxo deste cátion (HIRIART; AGUILAR-BRYAN, 2008; YANG; BERGGREN, 2006), culminando com a exocitose dos grânulos que contêm insulina.

A metabolização da Gli nas células  $\beta$  e a subsequente elevação da concentração intracelular de  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]_i$ ) podem ativar enzimas que produzirão

outros mensageiros intracelulares que contribuem para a amplificação do sinal iniciado pela Gli. Uma destas enzimas é a adenilato ciclase (AC) que, ao clivar o ATP, produz adenosina monofosfato cíclico (AMPc) que, por sua vez, ativa a proteína quinase A (PKA) (DELMEIRE *et al.*, 2003; DYACHOK *et al.*, 2008). Além disso, a metabolização da Gli e o aumento da  $[Ca^{2+}]_i$  também estimulam a hidrólise de fosfoinosítídeos de membrana através da ativação da fosfolipase C (PLC) (THORE *et al.*, 2005; THORE; WUTTKE; TENGHOLM, 2007), resultando na formação do inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG), que induz a liberação de  $Ca^{2+}$  de estoques intracelulares e ativa a proteína quinase C (PKC), respectivamente. Portanto, aumento da  $[Ca^{2+}]_i$  e ativação da PKA, PLC e PKC culminam com a exocitose dos grânulos de insulina (NESHER *et al.*, 2002; SEINO; SHIBASAKI, 2005; TENGHOLM; GYLFE, 2009). A secreção de insulina também é regulada por outros nutrientes circulantes, tais como aminoácidos, arginina e leucina, bem como pelo SNA. O SNP potencializa a secreção de insulina, via nervo vago, através de receptores muscarínicos na célula  $\beta$ , enquanto o SNS por meio de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos, inibe a secreção de insulina (AHRÉN, 1999).

A elevação da concentração de insulina em resposta ao aumento da concentração de nutrientes no plasma estimula processos anabólicos e inibe os catabólicos. A insulina age principalmente no músculo e tecido adiposo estimulando a captação da Gli, e no fígado promovendo o armazenamento e inibindo a produção desta hexose (WHITEMAN; CHO; BIRNBAUM, 2002; YOUNGREN, 2007).

As ações da insulina nos tecidos alvos ocorrem por meio da sua ligação com a subunidade alfa do receptor de insulina (IR), que é membro da família de receptores de tirosina quinases. O resultado da interação entre o hormônio e o IR, é uma mudança conformacional, que induz a autofosforilação de vários resíduos tirosina nas subunidades  $\beta$  do IR, e a fosforilação em tirosina dos substratos do IR (IRS), os quais servem de ancoragem para proteínas que possuem um sítio específico para o acoplamento com outros sinalizadores proteicos que apresentam o domínio SH2 (assim denominados devido à homologia com o produto do oncogene src). A ligação dos domínios SH2 da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3-K) aos resíduos fosfotirosinas do IRS-1 ativa esta enzima, que produz fosfolipídeos de fosfatidilinositol (PI), dentre eles o PI (3,4,5)P3, que ativa a proteína quinase dependente de PI (PDK1), e subsequentemente a proteína serina/treonina quinase (Akt). Esta proteína fosforila várias proteínas, dentre as quais estão às relacionadas

à translocação de GLUT4 para a membrana plasmática, como por exemplo, a AS160 (proteína substrato da Akt de 160 kDa); modula a atividade dos componentes da tradução, contribuindo para a síntese protéica; fosforila e inativa a enzima glicogênio sintase quinase 3; e estimula a transcrição de enzimas relacionadas com a lipogênese, e, em contrapartida inibe a lipólise por ativar fosfodiesterases e desta forma inibe a lipase hormônio sensível (SALTIEL; KAHN, 2001; WHITEMAN; CHO; BIRNBAUM, 2002; YOUNGREN, 2007).

### ***Envolvimento do SNA na secreção de insulina***

O SNA é um sistema involuntário que controla a maior parte das funções viscerais do corpo e é subdividido em SNS e SNP (TEFF, 2008). O SNA possui um papel importante na modulação da secreção de insulina. As ilhotas pancreáticas são inervadas por terminações do SNP derivadas do nervo vago, cujas fibras pré-ganglionares originam no núcleo motor dorsal do vago (LUISTEIN *et al.*, 1986) e estão sob controle do hipotálamo. As fibras pós-ganglionares são encontradas na periferia e próximas a todos os tipos celulares da ilhota (LOVE; SZE BENI, 1999; VAN DER ZEE *et al.*, 1992) e liberam Ach, peptídeo inibitório vasoativo (VIP), peptídeo liberador da gastrina (GRP), óxido nítrico, polipeptídeo pituitário ativador da 4 adenilato ciclase (PACAP), etc (AHRÉN, 2000). Para a secreção de insulina, os efeitos da Ach são preponderantes. A Ach estimula a secreção de insulina via ligação a receptores muscarínicos presentes nas células  $\beta$ . Dentro da família de receptores muscarínicos (M1 – M5), os subtipos M1 e M3 são expressos em ilhotas pancreáticas (BOSCHERO *et al.*, 1995; DUTTAROY *et al.*, 2004), mas somente o M3 tem relevância sobre a secreção de insulina (GAUTAM *et al.*, 2007). A ligação da Ach ao receptor ativa a PLC que como já descrito produz  $IP_3$  e DAG que contribuem para o aumento da  $[Ca^{2+}]_i$  e fosforilação de elementos da maquinaria excitatória, respectivamente, mecanismos que amplificam a secreção de insulina iniciada pela Gli e outros nutrientes (GILON; HENQUIN, 2001). A ativação do ramo pancreático do nervo vago não exerce somente efeito sobre o processo secretório da insulina, mas, também, regula a massa de células  $\beta$ , sendo observado que aferentes do ramo esplâncnico ativam eferentes do ramo pancreático do nervo vago e controlam a proliferação da massa insular, sendo um dos fatores importantes para a manutenção da função pancreática endócrina no DM (IMAI *et al.*, 2008). Além do efeito sobre a

secreção de insulina, o SNP também tem papel regulador sobre a homeostase glicêmica. Camundongos deficientes do receptor M3 em todos os tecidos apresentam redução do peso corporal, glicemia e insulinemia, além de apresentarem maior tolerância à Gli (DUTTAROY *et al.*, 2004).

A inervação simpática do pâncreas origina-se de fibras pré-ganglionares localizadas em segmentos torácicos e nos primeiros segmentos lombares da medula espinhal (FURUZAWA; OHMORI; WATANABE, 1996). As fibras pós-ganglionares estão em íntima proximidade com as células das ilhotas e liberam NE, galanina e neuropeptídeo Y (NPY) (GILON; HENQUIN, 2001). A estimulação do nervo esplâncnico reduz a secreção de insulina via liberação de NE pelas fibras do SNS próximas às células  $\beta$  juntamente com o aumento de catecolaminas pela medula da adrenal (KRONENBERG *et al.*, 2008). A ação da epinefrina (E) e NE sobre as células  $\beta$  ocorre via receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos, que levam à redução da  $[AMP_c]_i$  por inibir a AC, efeito que abre canais de  $K^+$ , promove repolarização da membrana e diminui a  $[Ca^{2+}]_i$ . Por outro lado, um aumento na secreção de insulina pode ser evidenciado via ativação de receptores  $\beta$ -adrenérgicos que ativam a AC e aumentam a  $[AMP_c]_i$  nas células  $\beta$  (AHRÉN; LUNDQUIST, 1981; SHARP, 1996).

Sabe-se que a NE e E diminuem a captação de Gli nos tecidos periféricos por meio da inibição da secreção de insulina, estimulação da glicogenólise, aumento da oxidação de substratos no músculo esquelético e da lipólise no tecido adiposo (KRONENBERG *et al.*, 2008). Contudo, dados da literatura demonstram que as catecolaminas desempenham papel importante no metabolismo proteico do músculo esquelético. Agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos como o clenbuterol e cimaterol induzem hipertrofia do músculo esquelético em diferentes situações catabólicas como: câncer atrofia induzida por desnervação, sepse, distrofia muscular, hipertiroidismo e DM (LYNCH, 2008; LYNCH; RYALL, 2008; NAVEGANTES; MIGLIORINI; DO CARMO KETTELHUT, 2002). Este efeito parece ser devido a inibição da proteólise e estimulação da síntese proteica em um efeito que depende da produção de AMPc, ativação de *Exchange protein directly activated by AMPc* (EPAC) e da via PI3K/Akt (BAVIERA *et al.*, 2010), uma vez que o EPAC potencializa a fosforilação da Akt e p70S6k estimulada pela insulina em músculo sóleo de ratos (BRENNESVIK *et al.*, 2005). Ainda, o transporte de Gli e a atividade da glicogênio-sintase apresentam-se elevados no músculo sóleo de ratos que receberam infusão de E por um dia. Este efeito é devido à ação sinérgica entre a E e a insulina (JENSEN *et al.*, 2007). De fato

correlação entre administração de E e NE e de agonistas  $\alpha_2$ -adrenérgicos melhoram a tolerância à Gli e sensibilidade à insulina em diferentes modelos experimentais (BUDOHOSKI *et al.*, 1987; JACOB *et al.*, 1999; LUPIEN; HIRSHMAN; HORTON, 1990; PAN *et al.*, 2001).

### **Proliferação das Células $\beta$**

A plasticidade do pâncreas endócrino está sujeito a mudanças dinâmicas em resposta às variações na demanda de insulina. A massa de células  $\beta$ , bem como as ilhotas pancreáticas, é regulada para manter a euglicemia (BONNER-WEIR, 1994). Em um contexto clínico, a capacidade reduzida de produção de insulina leva ao DM, e um inapropriado aumento na massa da célula  $\beta$  causa hipoglicemia (HELLERSTROM; SJOHOLM; SWENNE, 1991).

A população de células  $\beta$  é mantida sob um balanço delicado por meio da formação de células  $\beta$  (por neogênese ou proliferação), morte celular (por senescência, apoptose e necrose) e mudanças no volume de células individuais (atrofia e hipertrofia). Estas alterações ocorrem durante todo período de desenvolvimento, crescimento, são necessárias durante a gravidez, em situações de mudanças fisiológicas (PARSONS *et al.*, 1992; RIECK *et al.*, 2009; SONE; KAGAWA, 2005), altas concentrações de açúcar no sangue (ALONSO *et al.*, 2007) e RI (BRÜNING *et al.*, 1997; KULKARNI *et al.*, 2004; MICHAEL *et al.*, 2000; PICK *et al.*, 1998). A proliferação é considerada o principal meio de expansão das células  $\beta$  após o nascimento. Tanto *in vivo* quanto *in vitro*, ilhotas neonatais e adultas sofrem replicação e respondem a diversos estímulos. A regulação da replicação e crescimento da célula  $\beta$  tem sido alvo de grande interesse por muitas décadas (BONNER-WEIR, 1994).

Pictet e Rutter (1972) e Rutter *et al.*, (1978) descreveram o desenvolvimento embrionário do pâncreas e poucas informações foram adicionadas nos últimos anos. Primeiramente, ocorre uma evaginação de dois botões pancreáticos do intestino primitivo, uma elaboração do ducto epitelial com ramificações dentro do ducto terminal. Então ocorre uma diferenciação dos botões terminais em células exócrinas e endócrinas. Todos os tipos diferenciados de células pancreáticas originam-se do mesmo ducto epitelial, todavia não está claro se eles derivam da mesma população de células precursoras. Algumas vezes o ducto epitelial pancreático adulto pode ser

induzido a mudanças morfogênicas e formar novas células  $\beta$  por meio da neogênese (PICTET; RUTTER, 1972).

A proliferação celular nas células  $\beta$  pancreáticas, assim como em outros tipos de células é regulada por uma série de sinais extras e intracelulares que afetam a maquinaria do ciclo celular. O ciclo celular é dividido em fases, processo de divisão nuclear, conhecido como mitose é chamado de fase M. O período entre uma fase M e outra é chamada de interfase. Durante essa etapa ocorre replicação do DNA, chamada de fase S. O espaço entre a mitose e começo da síntese de DNA é chamado de fase  $G_1$ , e o intervalo entre o final da síntese de DNA e o início da mitose é a fase  $G_2$ .  $G_1$  e  $G_2$  propiciam um tempo adicional para o crescimento celular, se a interfase durasse somente o tempo suficiente para a replicação de DNA, a célula não teria tempo para duplicar sua massa antes de se dividir. Durante a progressão através da fase  $G_1$ , as células passam por uma fase de restrição (R), onde podem sair do ciclo celular e entrar em uma fase reversível de quiescência ( $G_0$ ), reparar danos do DNA e reentrar no ciclo celular, dependendo do estímulo. O ciclo celular das células  $\beta$  tem duração de 14,9 horas, onde a fase  $G_1$  dura 2,5 horas; S (6,4);  $G_2$  (5,5) e fase M (0,5) horas (RANE; REDDY, 2000).

Estudos em seres humanos obesos e RI, mas não diabéticos, têm revelado que a primeira resposta fisiológica ao aumento da demanda de insulina é um período marcado pela expansão compensatória da massa da célula  $\beta$  (BONNER-WEIR, 1994; BUTLER *et al.*, 2003; KLOPPEL; CLEMENS, 1997) e da função das células  $\beta$  (KAHN *et al.*, 2000) que juntos permitem o aumento da produção e/ou secreção de insulina. Essas adaptações continuam seguidas vezes em obesos hiperinsulinêmicos. Os seres humanos com DM2 têm ilhotas menores e mostram uma redução de 40-60% da massa de células  $\beta$  em comparação com pacientes não diabéticos hiperinsulinêmicos (WESTERMARK; WILANDER, 1978).

Bonner Weir *et al.*, (1989) demonstraram que uma infusão de Gli por 96 horas resultou em aumento de 50% nas células  $\beta$  em ratos adultos, por meio de hiperplasia e hipertrofia das células. Além da Gli, fatores de crescimento estimulam a replicação das células  $\beta$  (BRELJE; PARSONS; SORENSON, 1994; GARAY; AKERBLUM; MARTIN, 1971; PARSONS; BRELJE; SORENSON, 1992; PARSONS *et al.*, 1983; RABINOVITCH *et al.*, 1982; SWENNE, 1983;). Os mecanismos genéticos que controlam a proliferação das células  $\beta$  não estão completamente elucidados, acredita-se que os reguladores do ciclo celular, como as ciclinas D1/D2

e CDK4 promovam proliferação dessas células (GEORGIA; BHUSHAN, 2004; KUSHNER *et al.*, 2005; RANE *et al.*, 1999). Alguns hormônios, como insulina, lactogênio placentário e prolactina também possuem papel na regulação da massa das células  $\beta$  (BERNARD *et al.*, 1998; PARIS *et al.*, 2003; PARSONS; BRELJE; SORENSON, 1992; SACHDEVA; STOFFERS, 2009). As incretinas como peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1) e o polipeptídeo inibitório gástrico (GIP) aumentam a secreção de insulina e promovem proliferação das células  $\beta$ -pancreáticas (DRUCKER, 2006). Fatores de crescimento tais como, IGF-1 e fator de crescimento do hepatócito (HGF), estão ligados à via IRS/PI3K, que por sua vez, através de sinais da PDK-1, modulam a Akt e FOXO1 (KULKARNI, 2012). A prolactina ativa a via do JAK2/STAT5, estimulando a proliferação celular (KULKARNI, 2012).

A ativação da ERK está envolvida na proliferação das células  $\beta$ -pancreáticas e transcrição gênica e ainda influencia a sobrevivência da célula e a secreção de insulina (LAWRENCE *et al.* 2008; COSTES *et al.*, 2006; FRIEDRICHSEN *et al.*, 2006; LONGUET *et al.*, 2005). A ativação da ERK é resultado da fosforilação pela proteína mitose-ativada pela ERK quinase e pela MEK1 e MEK 2 (BENES *et al.*, 1999). As ERKs respondem a fatores de crescimento e à citocinas e também a elevações da concentração de  $Ca^{2+}$  citoplasmático (FINKBEINE; GREENBERG, 1996). Estudos mostram que o CCh (análogo da Ach) que potencializa a secreção de insulina, estimula fosforilação da ERK1/2 em ilhotas pancreáticas de ratos (BARBOSA *et al.*, 2008). Porém, outros estudos mostram que ratos Wistar submetidos ao tratamento com dexametasona, apresentam hiperinsulinemia, RI, aumento da proliferação e do tamanho das células  $\beta$  pancreáticas, porém, não apresentam alteração na expressão proteica da ERK e da pERK nas ilhotas (RAFACHO *et al.*, 2009).

Michael *et al.*, (2000) demonstraram que uma deleção específica do IR no fígado causa hiperplasia das células  $\beta$ -pancreáticas em camundongos knockout para o IR. Imai *et al.*, (2008) mostraram que a ativação da ERK1/2 no fígado, realiza uma comunicação como pâncreas, através de aferências do nervo esplâncnico, que estimula o sistema nervoso central (SNC), e através das eferências do nervo vago, induz hipersecreção de insulina e proliferação das células  $\beta$ -pancreáticas. Recentemente Yi, Park e Melton (2013), demonstraram que o hormônio betatrofina

secretado pelo fígado e pelos adipócitos exerce efeito positivo sobre a massa das células  $\beta$ .

### ***Modelos Animais de Obesidade***

Pesquisadores utilizam-se de modelos experimentais animais para compreender melhor o papel de cada um dos elementos envolvidos na fisiopatologia da obesidade e do DM2, que podem determinar de maneira controlada o papel de cada um dos componentes da secreção e RI e obesidade. Dentre os diferentes modelos encontram-se os oriundos de linhagens genéticas, provocadas por mutações autossômicas recessivas (ratos Zucker *fa/fa*, camundongos *ob/ob*) bem como, camundongos transgênicos e *knockouts* para determinados genes específicos; ratos e camundongos submetidos a lesões eletrolíticas em regiões hipotalâmicas no VMH e lesões químicas induzidas por drogas específicas (glutamato monossódico, MSG) (BRAY; YORK, 1979).

O tratamento neonatal com MSG provoca lesões químicas em regiões hipotalâmicas, promovendo destruição de cerca de 90% das células nervosas no SNC, especialmente no núcleo arqueado (ARC) (NEMEROFF *et al.* 1978; TAKASAKI, 1978) e na EM do hipotálamo (OLNEY; SHARPE, 1969). O MSG é administrado em doses suficientes para induzir a obesidade na idade adulta, mas baixa para evitar, por exemplo, a lesão da retina (DAWSON, 1986; MORRIS *et al.*, 1998; OLNEY, 1969). Lesões na eminência mediana estão associadas à redução na secreção do hormônio liberador do hormônio de crescimento (GHRH) e do hormônio luteinizante (BLOCH *et al.*, 1984; SASAKI; KAWAI; OHTA, 1994).

As modificações anatômicas causadas pela administração do MSG são associadas com distúrbios metabólicos e endócrinos. Os animais MSG apresentam normofagia, reduzida concentração de GH circulante (MAITER *et al.*, 1991); diminuída capacidade termogênica do tecido adiposo marrom (REMKE; WILSDORF; MULLER, 1988); reduzido peso da massa muscular e da maioria dos órgãos (HAMAOKA; KUSUNOKI, 1986); reduzida concentração de NPY em várias áreas hipotalâmicas (MORRIS *et al.*, 1998); alta concentração de leptina circulante (DAWSON *et al.*, 1997); hiperinsulinemia e obesidade (LUCINEI BALBO *et al.*, 2000).

Alterações no SNA, com redução do tônus simpático e aumento do parassimpático, também tem um papel importante na instalação da obesidade neste



modelo. Áreas cerebrais de ratos obesos MSG, especificamente o hipotálamo tem maior atividade colinérgica (BONFLEUR *et al.*, 2000). O fígado e pâncreas de camundongos obesos MSG apresentam maior atividade da enzima acetilcolinesterase, sugerindo aumento do tônus vagal (LUCINEI BALBO *et al.*, 2000). A vagotomia subdiafragmática impede o aumento da concentração plasmática de insulina em ratos MSG e diminui significativamente o acúmulo de gordura (BALBO *et al.*, 2000). Hirata *et al.*, (1997) mostraram que ratos obesos MSG desenvolvem RI. A vagotomia reverte este quadro, evidenciando a importância do nervo vago nas alterações causadas pela lesão com o MSG (BALBO *et al.*, 2000).

Estudos também demonstram que ilhotas pancreáticas de camundongos obesos MSG secretam mais insulina em resposta à concentração fisiológica de Gli (LUCINEI BALBO *et al.*, 2000). Ilhotas de ratos MSG, assim como de animais submetidos à lesão no VMH e dos modelos geneticamente obesos também secretam mais insulina na presença de Gli. A vagotomia bilateral subdiafragmática precoce, bloqueia parcialmente o acúmulo de gordura no modelo MSG e impede as alterações na responsividade das ilhotas pancreáticas e a instalação da RI, reforçando a hipótese do desarranjo autonômico (BALBO *et al.*, 2007). Todavia, não se sabe se a maior responsividade das ilhotas à Gli neste modelo de obesidade possa ser decorrente de uma hipertrofia e/ou hiperplasia das ilhotas e/ou das células  $\beta$ -pancreáticas.

## REFERÊNCIAS

- AHRÉN B. Autonomic regulation of islet hormone secretion--implications for health and disease. **Diabetologia**, v. 43, n. 4, p. 393-410, 2000.
- AHRÉN, B. Regulation of insulin secretion by nerves and neuropeptides. **Ann. Acad. Med. Singapore.**, v. 28, n. 1, p. 99-104, Jan 1999.
- AHRÉN, B.; LUNDQUIST, I. Effects of selective and non-selective beta-adrenergic agents on insulin secretion in vivo. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 71, n. 1, p. 93-104, Apr 1981.
- ALONSO, L. C. et al. Glucose infusion in mice: a new model to induce beta-cell replication. **Diabetes**, v. 56, n. 7, p. 1792-801, Jul 2007.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION AND NATIONAL INSTITUTE OF DIABETES, D. G. A. K. D. The prevention or delay of type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 25, n. 4, p. 742-9, Apr 2002.
- ANAND, B. K.; BROBECK, J. R. Localization of a "feeding center" in the hypothalamus of the rat. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 77, n. 2, p. 323-4, Jun 1951.
- ATKINSON, M. A.; MACLAREN, N. K. The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. **N. Engl. J. Med.**, v. 331, n. 21, p. 1428-36, Nov 1994.
- BALBO, S. L. et al. Fat storage is partially dependent on vagal activity and insulin secretion of hypothalamic obese rat. **Endocrine**, v. 31, n. 2, p. 142-8, Apr 2007.
- BALBO, S. L. et al. Vagotomy reduces obesity in MSG-treated rats. **Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.**, v. 108, n. 5-6, p. 291-6, 2000 Nov-Dec 2000.
- BARBOSA, H. C. et al. Islet neogenesis-associated protein signaling in neonatal pancreatic rat islets: involvement of the cholinergic pathway. **J. Endocrinol.**, v. 199, n. 2, p. 299-306, Nov 2008.
- BARROSO P. A importância dos aspectos interdisciplinares da obesidade. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 11, n. 3, p. 269-270, 2012.
- BAVIERA, A. M. et al. Involvement of cAMP/Epac/PI3K-dependent pathway in the antiproteolytic effect of epinephrine on rat skeletal muscle. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 315, n. 1-2, p. 104-12, Feb 2010.
- BENES, C. et al. Mode of regulation of the extracellular signal-regulated kinases in the pancreatic beta-cell line MIN6 and their implication in the regulation of insulin gene transcription. **Biochem. J.**, v. 340 ( Pt 1), p. 219-25, May 1999.
- BERNARD, C. et al. Pancreatic beta-cell regeneration after 48-h glucose infusion in mildly diabetic rats is not correlated with functional improvement. **Diabetes**, v. 47, n. 7, p. 1058-65, Jul 1998.

BIRAL, A. M.; CARDOSO, P. M.; GRUNSPAN, S. A importância do educador em diabetes mellitus. **Diabetes Clínica**, São Paulo, v. 9, n. 3, p.193-199, 2005.

BLOCH, B. et al. Specific depletion of immunoreactive growth hormone-releasing factor by monosodium glutamate in rat median eminence. **Nature**, v. 307, n. 5948, p. 272-3, 1984 Jan 19-25 1984.

BONFLEUR M.L., et al. Altered brain acetylcholinesterase activity in MSG-induced obese rat. **Diabetes Research**. n. 35, p. 027-032, 2000.

BONNER-WEIR, S. et al. Compensatory growth of pancreatic beta-cells in adult rats after short-term glucose infusion. **Diabetes**, v. 38, n. 1, p. 49-53, Jan 1989.

BONNER-WEIR, S. Regulation of pancreatic beta-cell mass in vivo. **Recent. Prog. Horm. Res.**, v. 49, p. 91-104, 1994.

BOSCHERO, A. C. et al. Oxotremorine-m potentiation of glucose-induced insulin release from rat islets involves M3 muscarinic receptors. **Am. J. Physiol.**, v. 268, n. 2 Pt 1, p. E336-42, Feb 1995.

BOSCHERO, A.C. Acoplamento da estimulação-secreção de insulina pelas células beta pancreáticas. **ABE&M**. 40(3):149-155, 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Diabetes Mellitus**, Cadernos de atenção básica, Brasília, DF. 16:7-28, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigitel Brasil 2011**: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

BRAY, G. A. Obesity: historical development of scientific and cultural ideas. **Int. J. Obes.**, v. 14, n. 11, p. 909-26, Nov 1990.

BRAY, G. A. Syndromes of hypothalamic obesity in man. **Pediatr. Ann.**, v. 13, n. 7, p. 525-36, Jul 1984.

BRAY, G. A.; CHAMPAGNE, C. M. Beyond energy balance: there is more to obesity than kilocalories. **J. Am. Diet. Assoc.**, v. 105, n. 5 Suppl 1, p. S17-23, May 2005.

BRAY, G. A.; GALLAGHER, T. F. Manifestations of hypothalamic obesity in man: a comprehensive investigation of eight patients and a review of the literature. **Medicine (Baltimore)**, v. 54, n. 4, p. 301-30, Jul 1975.

BRAY, G. A.; YORK, D. A. Hypothalamic and genetic obesity in experimental animals: an autonomic and endocrine hypothesis. **Physiol. Rev.**, v. 59, n. 3, p. 719-809, Jul 1979.

BRELJE, T. C.; PARSONS, J. A.; SORENSON, R. L. Regulation of islet beta-cell proliferation by prolactin in rat islets. **Diabetes**, v. 43, n. 2, p. 263-73, Feb 1994.

BRENNESVIK, E. O. et al. Adrenaline potentiates insulin-stimulated PKB activation via cAMP and Epac: implications for cross talk between insulin and adrenaline. **Cell**

**Signal**, v. 17, n. 12, p. 1551-9, Dec 2005.

BRÜNING, J. C. et al. Development of a novel polygenic model of NIDDM in mice heterozygous for IR and IRS-1 null alleles. **Cell**, v. 88, n. 4, p. 561-72, Feb 1997.

BUDOHOSKI, L. et al. Effects of prolonged elevation of plasma adrenaline concentration in vivo on insulin-sensitivity in soleus muscle of the rat. **Biochem. J.**, v. 244, n. 3, p. 655-60, Jun 1987.

BUTLER, A. E. et al. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 52, n. 1, p. 102-10, Jan 2003.

COSTES, S. et al. ERK1/2 control phosphorylation and protein level of cAMP-responsive element-binding protein: a key role in glucose-mediated pancreatic beta-cell survival. **Diabetes**, v. 55, n. 8, p. 2220-30, Aug 2006.

CUNHA, A.C.P.T. da; NETO, C.S.P.; JÚNIOR, A.T. da C. Indicadores de obesidade e estilo de vida de dois grupos de mulheres submetidas à cirurgia bariátrica. **Fitness & Performance Journal**, v. 5, p. 146-154, 2006.

DAWSON, R. Developmental and sex-specific effects of low dose neonatal monosodium glutamate administration on mediobasal hypothalamic chemistry. **Neuroendocrinology**, v. 42, n. 2, p. 158-66, 1986.

DELMEIRE, D. et al. Type VIII adenylyl cyclase in rat beta cells: coincidence signal detector/generator for glucose and GLP-1. **Diabetologia**, v. 46, n. 10, p. 1383-93, Oct 2003.

DRUCKER, D. J. The biology of incretin hormones. **Cell. Metab.**, v. 3, n. 3, p. 153-65, Mar 2006.

DUTTARROY, A. et al. Muscarinic stimulation of pancreatic insulin and glucagon release is abolished in m3 muscarinic acetylcholine receptor-deficient mice. **Diabetes**, v. 53, n. 7, p. 1714-20, Jul 2004.

DYACHOK, O. et al. Glucose-induced cyclic AMP oscillations regulate pulsatile insulin secretion. **Cell. Metab.**, v. 8, n. 1, p. 26-37, Jul 2008.

EDVELL, A.; LINDSTRÖM, P. Vagotomy in young obese hyperglycemic mice: effects on syndrome development and islet proliferation. **Am. J. Physiol.**, v. 274, n. 6 Pt 1, p. E1034-9, Jun 1998.

ELMQUIST, J. K.; ELIAS, C. F.; SAPER, C. B. From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. **Neuron**, v. 22, n. 2, p. 221-32, Feb 1999.

FINKBEINER, S.; GREENBERG, M. E. Ca(2+)-dependent routes to Ras: mechanisms for neuronal survival, differentiation, and plasticity? **Neuron**, v. 16, n. 2, p. 233-6, Feb 1996.

FRIEDRICHSEN, B. N. et al. Stimulation of pancreatic beta-cell replication by incretins involves transcriptional induction of cyclin D1 via multiple signalling pathways. **J. Endocrinol.**, v. 188, n. 3, p. 481-92, Mar 2006.

FRÖDIN, M. et al. Glucose, other secretagogues, and nerve growth factor stimulate mitogen-activated protein kinase in the insulin-secreting beta-cell line, INS-1. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 14, p. 7882-9, Apr 1995.

FURUZAWA, Y.; OHMORI, Y.; WATANABE, T. Immunohistochemical studies of neural elements in pancreatic islets of the cat. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 58, n. 7, p. 641-6, Jul 1996.

GARAY, G. L.; AKERBLUM, H. K.; MARTIN, J. M. Experimental hypersomatotropism: serum growth hormone and insulin, and pituitary and pancreatic changes in MtT-W15 tumor-bearing rats before and after tumor removal. **Horm. Metab. Res.**, v. 3, n. 2, p. 82-9, Mar 1971.

GAUTAM, D. et al. Role of the M3 muscarinic acetylcholine receptor in beta-cell function and glucose homeostasis. **Diabetes Obes. Metab.**, v. 9 Suppl 2, p. 158-69, Nov 2007.

GEORGIA, S.; BHUSHAN, A. Beta cell replication is the primary mechanism for maintaining postnatal beta cell mass. **J. Clin. Invest.**, v. 114, n. 7, p. 963-8, Oct 2004.

GILON, P.; HENQUIN, J. C. Mechanisms and physiological significance of the cholinergic control of pancreatic beta-cell function. **Endocr. Ver.**, v. 22, n. 5, p. 565-604, Oct 2001.

HAMAOKA, K.; KUSUNOKI, T. Morphological and cell proliferative study on the growth of visceral organs in monosodium L-glutamate-treated obese mice. **J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)**, v. 32, n. 4, p. 395-411, Aug 1986.

HASHIMOTO, I. K. Níveis glicêmicos de diabéticos do tipo 2 cadastrados em uma Unidade Básica de Saúde de Londrina-PR. **Monografia. (Especialização em Saúde da Família)** – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

HELLERSTRÖM, C.; SJÖHOLM, A.; SWENNE, I. Effects of growth hormone and related growth factors on DNA replication and insulin production in pancreatic islet beta-cells. **Acta. Paediatr. Scand. Suppl.**, v. 377, p. 55-62; discussion 63, 1991.

HETHERINGTON, A.; RANSON, S. Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. **Anat. Rec.**, v. 78, p.149–172, 1940.

HIRATA, A. E. et al. Monosodium glutamate (MSG)-obese rats develop glucose intolerance and insulin resistance to peripheral glucose uptake. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 30, n. 5, p. 671-4, May 1997.

HIRIART, M.; AGUILAR-BRYAN, L. Channel regulation of glucose sensing in the pancreatic beta-cell. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 295, n. 6, p. E1298-306, Dec 2008.

IMAI, J. et al. Regulation of pancreatic beta cell mass by neuronal signals from the liver. **Science**, v. 322, n. 5905, p. 1250-4, Nov 2008.

- INCA - Instituto Nacional de Câncer. Inquérito Domiciliar sobre Comportamentos de Risco e Morbidade Referida de Doenças e Agravos não Transmissíveis. Rio de Janeiro; Ministério da Saúde, v. 6, p. 69-80, 2004.
- JACOB, S. et al. The beta2-adrenergic modulator celiprolol reduces insulin resistance in obese Zucker rats. **Life. Sci.**, v. 64, n. 22, p. 2071-9, 1999.
- JENSEN, J. et al. GSK-3beta regulation in skeletal muscles by adrenaline and insulin: evidence that PKA and PKB regulate different pools of GSK-3. **Cell. Signal.**, v. 19, n. 1, p. 204-10, Jan 2007.
- KHOO, S.; COBB, M. H. Activation of mitogen-activating protein kinase by glucose is not required for insulin secretion. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 94, n. 11, p. 5599-604, May 1997.
- KIBA, T. et al. Comparison of DNA contents of visceral organs in rats with ventromedial hypothalamic lesions and fed a high fat diet. **Neurosci. Lett.**, v. 126, n. 2, p. 127-30, May 1991.
- KIBA, T. et al. Ventromedial hypothalamic lesion-induced vagal hyperactivity stimulates rat pancreatic cell proliferation. **Gastroenterology**, v. 110, n. 3, p. 885-93, Mar 1996.
- KLOPPEL, G.; CLEMENS, A. Insulin-Dependent Diabetes Mellitus: Islet Changes in Relation to Etiology and Pathogenesis. **Endocr. Pathol.**, v. 8, n. 4, p. 273-282, 1997.
- KRONENBERG, H.M.; et al. **Williams textbook of endocrinology**. 11<sup>a</sup>. Ed, Saunders, 2008.
- KULKARNI, R. N. et al. Human  $\beta$ -cell proliferation and intracellular signaling: driving in the dark without a road map. **Diabetes**, v. 61, n. 9, p. 2205-13, Sep 2012.
- KULKARNI, R. N. et al. PDX-1 haploinsufficiency limits the compensatory islet hyperplasia that occurs in response to insulin resistance. **J. Clin. Invest.**, v. 114, n. 6, p. 828-36, Sep 2004.
- MICHAEL, M. D. et al. Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. **Mol. Cell.**, v. 6, n. 1, p. 87-97, Jul 2000.
- KUMAR, K. M. Current diagnostic criteria and their impact on outcome and management. **J. Indian. Med. Assoc.**, v. 100, n. 3, p. 149-52, Mar 2002.
- KUSHNER, J. A. et al. Cyclins D2 and D1 are essential for postnatal pancreatic beta-cell growth. **Mol. Cell. Biol.**, v. 25, n. 9, p. 3752-62, Maio 2005.
- LAUSIER, J. et al. Vagal control of pancreatic  $\beta$ -cell proliferation. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 299, n. 5, p. E786-93, Nov 2010.
- LAWRENCE, M. et al. The protein kinases ERK1/2 and their roles in pancreatic beta cells. **Acta. Physiol. (Oxf)**, v. 192, n. 1, p. 11-7, Jan 2008.

- LEFFERT, H. L. et al. Hormonal control of rat liver regeneration. **Gastroenterology**, v. 76, n. 6, p. 1470-82, Jun 1979.
- LONGUET, C. et al. Extracellularly regulated kinases 1/2 (p44/42 mitogen-activated protein kinases) phosphorylate synapsin I and regulate insulin secretion in the MIN6 beta-cell line and islets of Langerhans. **Endocrinology**, v. 146, n. 2, p. 643-54, Feb 2005.
- LOVE, J. A.; SZEBENI, K. Morphology and histochemistry of the rabbit pancreatic innervation. **Pancreas**, v. 18, n. 1, p. 53-64, Jan 1999.
- LUCINEI BALBO, S. et al. Insulin secretion and acetylcholinesterase activity in monosodium l-glutamate-induced obese mice. **Horm. Res.**, v. 54, n. 4, p. 186-91, 2000.
- LUITEN, P. G. et al. Autonomic innervation of the pancreas in diabetic and non-diabetic rats. A new view on intramural sympathetic structural organization. **J. Auton. Nerv. Syst.**, v. 15, n. 1, p. 33-44, Jan 1986.
- LUPIEN, J. R.; HIRSHMAN, M. F.; HORTON, E. S. Effects of norepinephrine infusion on in vivo insulin sensitivity and responsiveness. **Am. J. Physiol.**, v. 259, n. 2 Pt 1, p. E210-5, Aug 1990.
- LUSTIG, R. H. Autonomic dysfunction of the beta-cell and the pathogenesis of obesity. **Rev. Endocr. Metab. Disord.**, v. 4, n. 1, p. 23-32, Mar 2003.
- LYNCH, G. S. Update on emerging drugs for sarcopenia - age-related muscle wasting. **Expert Opin Emerg. Drugs**, v. 13, n. 4, p. 655-73, Dec 2008.
- LYNCH, G. S.; RYALL, J. G. Role of beta-adrenoceptor signaling in skeletal muscle: implications for muscle wasting and disease. **Physiol. Rev.**, v. 88, n. 2, p. 729-67, Apr 2008.
- MAITER, D. et al. Neonatal treatment with monosodium glutamate: effects of prolonged growth hormone (GH)-releasing hormone deficiency on pulsatile GH secretion and growth in female rats. **Endocrinology**, v. 128, n. 2, p. 1100-6, Feb 1991.
- MEDINA, A. et al. Involvement of the parasympathetic nervous system in the initiation of regeneration of pancreatic  $\beta$ -cells. **Endocr. J.**, v. 60, n. 5, p. 687-96, Maio 2013.
- MORRIS, M. J. et al. Reduced BAT function as a mechanism for obesity in the hypophagic, neuropeptide Y deficient monosodium glutamate-treated rat. **Regul. Pept.**, v. 75-76, p. 441-7, Sep 1998.
- NARAYAN, K. M. et al. Diabetes--a common, growing, serious, costly, and potentially preventable public health problem. **Diabetes Res. Clin. Pract.**, v. 50 Suppl 2, p. S77-84, Oct 2000.
- NARDELLI, T. R. et al. Taurine prevents fat deposition and ameliorates plasma lipid profile in monosodium glutamate-obese rats. **Amino Acids**, v. 41, n. 4, p. 901-8, Oct

2011.

NAVEGANTES, L. C.; MIGLIORINI, R. H.; DO CARMO KETTELHUT, I. Adrenergic control of protein metabolism in skeletal muscle. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care**, v. 5, n. 3, p. 281-6, May 2002.

NEMEROFF, C. B. et al. Effects of acute administration of monosodium-L-glutamate (MSG), atropine or haloperidol on anterior pituitary hormone secretion in the rat. **Brain. Res.**, v. 156, n. 1, p. 198-201, Nov 1978.

NESHER, R. et al. Beta-cell protein kinases and the dynamics of the insulin response to glucose. **Diabetes**, v. 51 Suppl 1, p. S68-73, Feb 2002.

OLNEY, J. W. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. **Science**, v. 164, n. 3880, p. 719-21, May 1969.

OLNEY, J. W.; SHARPE, L. G. Brain lesions in an infant rhesus monkey treated with monosodium glutamate. **Science**, v. 166, n. 3903, p. 386-8, Oct 1969.

PAIVA, D. C. P.; BERSUSA, A. A. S.; ESCUDER, M. M. L. Avaliação da assistência ao paciente com diabetes e/ou hipertensão pelo Programa Saúde da Família do Município de Francisco Morato, São Paulo, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 2, n. 2, p. 377-385, 2006.

PAN, S. J. et al. Effects of clenbuterol on insulin resistance in conscious obese Zucker rats. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 280, n. 4, p. E554-61, Apr 2001.

PARIS, M. et al. Specific and combined effects of insulin and glucose on functional pancreatic beta-cell mass in vivo in adult rats. **Endocrinology**, v. 144, n. 6, p. 2717-27, Jun 2003.

PARSONS, J. A. et al. Effect of MtTW15 mammosomatotropic tumors on pancreatic islet hormones. **Diabetes**, v. 32, n. 1, p. 67-74, Jan 1983.

PARSONS, J. A.; BRELJE, T. C.; SORENSON, R. L. Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: increased islet cell proliferation and insulin secretion correlates with the onset of placental lactogen secretion. **Endocrinology**, v. 130, n. 3, p. 1459-66, Mar 1992.

PICK, A. et al. Role of apoptosis in failure of beta-cell mass compensation for insulin resistance and beta-cell defects in the male Zucker diabetic fatty rat. **Diabetes**, v. 47, n. 3, p. 358-64, Mar 1998.

PICTET, R., RUTTER, W. J. Development of the embryonic pancreas. In **Handbook of Physiology**, Section 7, (ed. D. F. Steiner and N. Frenkel). P. 25-66. Washington, DC: American Physiological Society, 1972.

POPKIN, B. M.; DOAK, C. M. The obesity epidemic is a worldwide phenomenon. **Nutr. Rev.**, v. 56, n. 4 Pt 1, p. 106-14, Apr 1998.

PRATLEY, R. E.; WEYER, C. The role of impaired early insulin secretion in the pathogenesis of Type II diabetes mellitus. **Diabetologia**, v. 44, n. 8, p. 929-45, Aug



2001.

RABINOVITCH, A. et al. Insulin and multiplication stimulating activity (an insulin-like growth factor) stimulate islet (beta-cell replication in neonatal rat pancreatic monolayer cultures. **Diabetes**, v. 31, n. 2, p. 160-4, Feb 1982.

RAFACHO, A. et al. High doses of dexamethasone induce increased beta-cell proliferation in pancreatic rat islets. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 296, n. 4, p. E681-9, Apr 2009.

RANE, S. G. et al. Loss of Cdk4 expression causes insulin-deficient diabetes and Cdk4 activation results in beta-islet cell hyperplasia. **Nat. Genet.**, v. 22, n. 1, p. 44-52, May 1999.

RANE, S. G.; REDDY, E. P. Cell cycle control of pancreatic beta cell proliferation. **Front. Biosci.**, v. 5, p. D1-19, Jan 2000.

REMKE, H.; WILSDORF, A.; MÜLLER, F. Development of hypothalamic obesity in growing rats. **Exp. Pathol.**, v. 33, n. 4, p. 223-32, 1988.

REYNOLDS, K. et al. Prevalence and risk factors of overweight and obesity in China. **Obesity (Silver Spring)**, v. 15, n. 1, p. 10-8, Jan 2007.

RIECK, S. et al. The transcriptional response of the islet to pregnancy in mice. **Mol. Endocrinol.**, v. 23, n. 10, p. 1702-12, Oct 2009.

ROHNER-JEANRENAUD, F.; JEANRENAUD, B. [Interactions between the central nervous system, the endocrine pancreas and metabolism]. **Ann. Endocrinol. (Paris)**, v. 48, n. 5, p. 400-6, 1987.

RUTTER, W. J. et al. An analysis of pancreatic development: role of mesenchymal factor and other extracellular factors. **Symp. Soc. Dev. Biol.**, n. 35, p. 205-27, 1978

SACHDEVA, M. M.; STOFFERS, D. A. Minireview: Meeting the demand for insulin: molecular mechanisms of adaptive postnatal beta-cell mass expansion. **Mol. Endocrinol.**, v. 23, n. 6, p. 747-58, Jun 2009.

SALTIEL, A. R.; KAHN, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 799-806, Dec 2001.

SAMANIC, C. et al. Relation of body mass index to cancer risk in 362,552 Swedish men. **Cancer Causes Control**, v. 17, n. 7, p. 901-9, Sep 2006.

SASAKI, F.; KAWAI, T.; OHTA, M. Immunohistochemical evidence of neurons with GHRH or LHRH in the arcuate nucleus of male mice and their possible role in the postnatal development of adenohypophysial cells. **Anat. Rec.**, v. 240, n. 2, p. 255-60, Oct 1994.

SCHEURINK, A. J.; STEFFENS, A. B.; GAYKEMA, R. P. Hypothalamic adrenoceptors mediate sympathoadrenal activity in exercising rats. **Am. J. Physiol.**, v. 259, n. 3 Pt 2, p. R470-7, Sep 1990.

- SCOMPARIN, D. X. et al. Autonomic activity and glycemic homeostasis are maintained by precocious and low intensity training exercises in MSG-programmed obese mice. **Endocrine**, v. 36, n. 3, p. 510-7, Dec 2009.
- SEINO, S.; SHIBASAKI, T. PKA-dependent and PKA-independent pathways for cAMP-regulated exocytosis. **Physiol Rev.**, v. 85, n. 4, p. 1303-42, Oct 2005.
- SHARP, G. W. Mechanisms of inhibition of insulin release. **Am. J. Physiol.**, v. 271, n. 6 Pt 1, p. C1781-99, Dec 1996.
- SONE, H.; KAGAWA, Y. Pancreatic beta cell senescence contributes to the pathogenesis of type 2 diabetes in high-fat diet-induced diabetic mice. **Diabetologia**, v. 48, n. 1, p. 58-67, Jan 2005.
- SOWERS, J. R. Obesity and cardiovascular disease. **Clin. Chem.**, v. 44, n. 8 Pt 2, p. 1821-5, Aug 1998.
- STRAUB, S. G.; SHARP, G. W. Glucose-stimulated signaling pathways in biphasic insulin secretion. **Diabetes Metab. Res. Rev.**, v. 18, n. 6, p. 451-63, 2002 Nov-Dec 2002.
- SUZUKI, Y. et al. Cell proliferation in visceral organs induced by ventromedial hypothalamic (VMH) lesions: Development of electrical VMH lesions in mice and resulting pathophysiological profiles. **Endocr. J.**, v. 58, n. 4, p. 247-56, 2011.
- SWENNE, I. Effects of aging on the regenerative capacity of the pancreatic B-cell of the rat. **Diabetes**, v. 32, n. 1, p. 14-9, Jan 1983.
- TAKASAKI, Y. Studies on brain lesion by administration of monosodium L-glutamate to mice. I. Brain lesions in infant mice caused by administration of monosodium L-glutamate. **Toxicology**, v. 9, n. 4, p. 293-305, Apr 1978.
- TEFF, K. L. Visceral nerves: vagal and sympathetic innervation. **JPEN J. Parenter. Enteral. Nutr.**, v. 32, n. 5, p. 569-71, 2008 Sep-Oct 2008.
- TENGHOLM, A.; GYLFE, E. Oscillatory control of insulin secretion. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 297, n. 1-2, p. 58-72, Jan 2009.
- THORE, S. et al. Feedback activation of phospholipase C via intracellular mobilization and store-operated influx of Ca<sup>2+</sup> in insulin-secreting beta-cells. **J. Cell. Sci.**, v. 118, n. Pt 19, p. 4463-71, Oct 2005.
- THORE, S.; WUTTKE, A.; TENGHOLM, A. Rapid turnover of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate in insulin-secreting cells mediated by Ca<sup>2+</sup> and the ATP-to-ADP ratio. **Diabetes**, v. 56, n. 3, p. 818-26, Mar 2007.
- UKPDS 33. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. **Lancet**, v. 352, n. 9131, p. 837-53, Sep 1998.
- UNGER, R. H. Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM.

Genetic and clinical implications. **Diabetes**, v. 44, n. 8, p. 863-70, Aug 1995.

VAN DER ZEE, E. A. et al. Immunocytochemical localization of muscarinic acetylcholine receptors in the rat endocrine pancreas. **Cell. Tissue. Res.**, v. 269, n. 1, p. 99-106, Jul 1992.

WALLEY, A. J.; BLAKEMORE, A. I.; FROGUEL, P. Genetics of obesity and the prediction of risk for health. **Hum. Mol. Genet.**, v. 15 Spec No 2, p. R124-30, Oct 2006.

WESTERMARK, P.; WILANDER, E. The influence of amyloid deposits on the islet volume in maturity onset diabetes mellitus. **Diabetologia**, v. 15, n. 5, p. 417-21, Nov 1978.

WHITEMAN, E. L.; CHO, H.; BIRNBAUM, M. J. Role of Akt/protein kinase B in metabolism. **Trends Endocrinol. Metab.**, v. 13, n. 10, p. 444-51, Dec 2002.

YAMAGUCHI, K. et al. Induction and activation of cysteine oxidase of rat liver. II. The measurement of cysteine metabolism in vivo and the activation of in vivo activity of cysteine oxidase. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 297, n. 1, p. 48-59, Jan 1973.

YANG, S. N.; BERGGREN, P. O. The role of voltage-gated calcium channels in pancreatic beta-cell physiology and pathophysiology. **Endocr. Rev.**, v. 27, n. 6, p. 621-76, Oct 2006.

YI, P.; PARK, J. S.; MELTON, D. A. Betatrophin: a hormone that controls pancreatic  $\beta$  cell proliferation. **Cell**, v. 153, n. 4, p. 747-58, May 2013.

YOSHIMURA, R. et al. Continuous carbachol infusion promotes peripheral cell proliferation and mimics vagus hyperactivity in a rat model of hypothalamic obesity. **Biomed. Res.**, v. 27, n. 2, p. 81-8, Apr 2006.

YOUNGREN, J. F. Regulation of insulin receptor function. **Cell. Mol. Life. Sci.**, v. 64, n. 7-8, p. 873-91, Apr 2007.

**ARTIGO CIENTÍFICO**

**INVOLVEMENT OF THE VAGUS NERVE IN  $\beta$ -CELL PROLIFERATION AND  
WHOLE-BODY GLUCOSE CONTROL DISRUPTION IN MSG-OBESE RATS**

## ARTIGO CIENTÍFICO

### INVOLVEMENT OF THE VAGUS NERVE IN $\beta$ -CELL PROLIFERATION AND WHOLE-BODY GLUCOSE CONTROL DISRUPTION IN MSG-OBESSE RATS

Running title: Vagus nerve and  $\beta$  cell proliferation in MSG-rats

Camila Lubaczeuski<sup>1</sup>; Sandra Lucinei Balbo<sup>1</sup>; Rosane Aparecida Ribeiro<sup>2</sup>; Jean Franciesco Vettorazzi<sup>3</sup>; Junia C. Santos-Silva<sup>3</sup>; Everardo Magalhães Carneiro<sup>3</sup>; Maria Lúcia Bonfleur<sup>1</sup>

**1** Laboratório de Fisiologia Endócrina e Metabolismo, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Cascavel, PR, Brazil.

**2** Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Campus UFRJ-Macaé, Macaé, RJ, Brazil.

**3** Laboratório de Pâncreas Endócrino e Metabolismo, Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.

**\*Correspondence to** Maria Lúcia Bonfleur

Laboratório de Fisiologia Endócrina e Metabolismo

Cascavel, PR, Brazil CEP: 858119-110

E-mail: mlbonfleur@hotmail.com

Phone/Fax: +55 45 3220 3257

**Abstract**

The parasympathetic nervous system (PNS) is important for  $\beta$ -cell secretion and  $\beta$ -cell mass regulation. However, the contribution of the PNS to chronic processes is poorly described. Here, we characterize the involvement of the vagus nerve in pancreatic  $\beta$ -cell morpho-functional regulation and body nutrient homeostasis in 90-day old MSG (monosodium glutamate) rats. Male rats received MSG [4 g/Kg body weight (BW)] or saline (1.25 g/Kg BW, CTL group) during the first 5 days of life. At 30 days of age, half of the MSG and CTL rats were submitted to subdiaphragmatic vagotomy (MVAG and CVAG groups) or sham-surgery (MSG and CTL). At 90 days of age, MSG rats presented obesity, hyperinsulinemia, insulin resistance, dyslipidemia and higher triglyceride (TG) contents in the liver. MSG rats presented a lower pancreas weight, but an increased islet and  $\beta$ -cell relative mass content, and increased number of small, medium and large islets. These alterations were associated with increased  $\beta$ -cell number/1000  $\mu\text{m}^2$  of  $\beta$ -cell area and no alteration in MSG  $\beta$ -cell size. In addition, isolated islets from MSG rats hypersecrete insulin in response to glucose stimulus. Early vagotomy prevented obesity, TG deposition in the liver, and ameliorated glucose homeostasis and insulinemia in MVAG rats. MVAG pancreas presented normal values for weight and area, distribution of islets per size, relative islet and  $\beta$ -cell mass content and  $\beta$ -cell number per  $\beta$ -cell area. Here, we demonstrate that in the MSG pancreas, adaptive functionality occurs due to  $\beta$ -cell proliferation and not due to hypertrophy. The vagus nerve was chronically involved in MSG morphological alterations, and improved whole-body nutrient homeostasis in MVAG rats.

**Keywords:**  $\beta$ -cell proliferation; MSG-rats; Obesity; Parasympathetic nervous system; Vagus nerve.

## Introduction

Central and peripheral mechanisms are involved in body glucose homeostasis regulation (36). Insulin and glucagon are directly controlled by peripheral glucose levels and by the central nervous system (CNS) through the autonomic nervous system (ANS) (16). Pancreatic islets are innervated by vagal cholinergic nerves and sympathetic fibers (37). The parasympathetic nervous system (PNS) potentiates insulin secretion by the acetylcholine muscarinic receptor, (M)-3, whereas the sympathetic nervous system (SNS), which releases norepinephrine, predominantly decreases insulin secretion via the  $\alpha$ 2 adrenergic receptors (1).

Nutrients and hormones also contribute to pancreatic  $\beta$ -cell mass steady-state (8) and the PNS has been found to be involved in  $\beta$ -cell mass regulation under normal and pathological conditions (14, 18, 22, 24, 31, 41, 43). While the mechanism of the action of the PNS upon endocrine pancreatic mass regulation is not completely understood, some evidence has demonstrated that, in obesity, increased vagal action may lead to a vicious cycle that increases fat storage and disrupts body energy homeostasis (39, 40).

Early postnatal administration of glutamate monosodium (MSG) in rodents produces neuronal necrosis in the arcuate nuclei of the hypothalamus and median eminence that leads to obesity development in adulthood (34, 35). MSG-induced obesity is characterized by hypo or normophagy (27), higher fat depots, glucose intolerance, hyperinsulinemia and insulin resistance (3). Furthermore, pancreatic islets from MSG rodents secrete more insulin in response to glucose (2, 32), but present a lower secretory function in response to cholinergic stimulus (26, 38). This effect is partly associated with an alteration in ANS action, with a reduction in sympathetic function, but enhanced PNS activity (39). Subdiaphragmatic vagotomy in MSG rats prevents obesity and glucose intolerance in adulthood (3), supporting the

hypothesis that an unbalance of ANS in MSG obesity is present and may contribute to the co-morbidities in these rodents. We here in describe the use of subdiaphragmatic vagal denervation, performed at 30 days of age, to characterize the involvement of the vagus nerve in pancreatic  $\beta$ -cell function and mass regulation, as well as body glucose control disruption in 90-day old MSG-obese rats.

## **Materials and methods**

### *Animals*

All experiments were approved by the University's Committee on Ethics in Animal Experimentation (n°: 00812 CEEAAP/UNIOESTE). Male newborn *Wistar* rats received a subcutaneous injection of MSG [4 g/kg body weight (BW), MSG group], or hyperosmotic saline solution (1.25 g/Kg BW, CTL group) during the first 5 days of life (Balbo et al., 2000). Pups were weaned on the 21<sup>st</sup> day of life and had free access to standard rodent chow (Biobase®, Águas Frias, SC, Brazil) and water. The rats were housed in standard cages and maintained on a 12h light/dark cycle (lights on 06:00–18:00 h) at controlled temperature ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ).

### *Vagotomy*

At 30 days of age, MSG and CTL rats, after 12h of fasting, were anesthetized with a mixture of ketamine (90 mg/kg, i.p., Vetbrands®, Paulínia, SP, Brazil) and xylazine (9 mg/kg, i.p., Vetbrands®, Paulínia, SP, BR). Half of the rats were submitted to vagotomy or sham operation. Dorsal and subdiaphragmatic vagal trunks were separated from the esophagus and cut off (MVAG and CVAG groups) with the aid of a stereomicroscope. In sham-vagotomized rats (MSG and CTL groups) the vagus nerve was separated from the esophagus, but not cut. At the end of the



experimental period (2-months latter), stomach food retention from each group was evaluated by the stomach weight:BW ratio to confirm subdiaphragmatic vagal denervation (3).

#### *Obesity and general nutritional parameters*

Body weight and food intake were measured during the experimental period (from 30<sup>th</sup> to 90<sup>th</sup> day of life). Food intake was expressed by feed efficiency (food intake/BW gain) (13). At 90 days of age both rat groups, after 12h of fasting, were weighed and euthanized by decapitation; the nasoanal length was then measured to calculate the Lee Index [ $\sqrt[3]{\text{BW (g)}} / \text{nasoanal length (cm)}] \times 1000$  (6), and retroperitoneal and perigonadal fat pads were removed and weighed. Blood was collected and serum was stored at -20°C for insulin measurement by radioimmunoassay (RIA). Total cholesterol (CHOL) and triglycerides (TG) were measured using standard commercial kits, according to the manufacturers' instructions (Merck<sup>®</sup>, Alemanha and Boehringer<sup>®</sup> Mannheim, Alemanha).

#### *Intraperitoneal (ip) glucose tolerance test (ipGTT)*

At the end of the experimental period, rats from both groups were food deprived for 8h, and glycemia (time 0) measured using a glucose analyzer (Abbott<sup>®</sup>, Optium Xceed, Alameda, CA). Subsequently, the rats received an ip injection of glucose (2 g/Kg BW) and blood samples were collected at 15, 30, 60 and 120 min. Additional blood samples were collected at 0 and 30 min of the test for insulin measurement by RIA.

#### *Body insulin sensitivity*

Tissue insulin sensitivity was also evaluated by the previously validated (9) homeostasis model assessment (HOMA) using the HOMA index of insulin resistance [(HOMA-IR) = fasting insulin (IU/mL) x fasting glucose (mM)/22.5] described by Matthews et al. (30). For glucose disappearance rate ( $K_{ITT}$ ) evaluation, fasted rats were injected via ip with 1 U/Kg BW of human insulin (Humulin R®, Lilly, Indianapolis IN, EUA). Blood was taken immediately before insulin injection (time 0) and after at 4, 8, 12, 16 and 20 min for glucose analysis. The glucose disappearance rate ( $K_{ITT}$ ) was calculated as  $0.693/t_{1/2}$ .

#### *Lipids, TG and CHOL content in the liver*

Liver lipids were extracted by the method of Folch et al. (15). The extract was evaporated and weighed by a gravimetric method for total fat content measurement. Lipids were then diluted in isopropanol for determination of the TG and CHOL content in the liver using enzymatic colorimetric methods, according to the manufacturer's instructions (Laborclin®, Bioliquid, Pinhais, PR, BRA).

#### *Islet isolation, static insulin secretion and total islet insulin content*

Islets were isolated by collagenase (Sigma-Aldrich Chemicals, St Louis, MO, USA) digestion of the exocrine pancreas. For static incubations, 4 islets from each group were pre-incubated for 30 min at 37°C with 0.5 mL Krebs–bicarbonate (KBR) buffer with the following composition: 115 mM NaCl, 5 mM KCl, 2.56 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, 15 mM HEPES, supplemented with 5.6 mM glucose, 3 g of BSA/L, and equilibrated with a mixture of 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> to provide pH 7.4. This medium was then replaced with fresh buffer (1 mL) and the islets were incubated for 1 h with 2.8, 11.1 and 16.7 mM glucose. Aliquots of the supernatant

were collected at the end of the incubation period and kept at  $-20^{\circ}\text{C}$  for posterior insulin measurement by RIA. For islet insulin content, groups of 4 islets were collected and transferred to 1.5 mL tubes. Deionized water (1 mL) was added to the samples, followed by disruption of the pancreatic cells using a Polytron PT 1200C (Brinkmann Instruments, NY, USA).

### *Western Blotting*

For protein expression experiments, groups of isolated islets were solubilized in homogenization buffer (100 mM Tris pH 7.5, 10 mM sodium pyrophosphate, 100 mM sodium fluoride, 10 mM EDTA, 10 mM sodium vanadate, 2 mM PMSF and 1% Triton-X 100) at  $4^{\circ}\text{C}$  using a Polytron PT 1200 C homogenizer (Brinkmann Instruments, NY, USA). The protein concentration in the supernatants was assayed using the Bradford dye method, using BSA as a standard curve and a commercial Bradford reagent (Bio-Agency Lab., São Paulo, SP, BRA). For SDS gel electrophoresis and Western blot analysis, the samples were homogenized with a loading buffer containing dithiothreitol. After heating at  $95^{\circ}\text{C}$  for 5 min, the proteins were separated by electrophoresis (50  $\mu\text{g}$  protein/lane in 10% gels) and then transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were incubated with specific primary antibodies against phospho (p)-ERK<sub>1/2</sub> (1:500, cat: sc7383; 42 and 44 kDa) or ERK<sub>1/2</sub> protein (1:500, cat: sc94; 42 and 44 kDa; Santa Cruz Biotechnologies, CA, USA). Visualization of specific protein bands was carried out by incubating the membranes with appropriate secondary antibodies (1:10000; Zymed Laboratories, Inc., CA, USA), followed by exposure to X-ray films. The band intensities were quantified by optical densitometry using the free software, Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij>).

### *Pancreas morphometry and immunohistochemistry*

For morphometric analysis, pancreases from all groups of rats were removed, weighed and fixed for 24h in Bouin's solution. The pancreas was embedded in paraffin. From each pancreas, five consecutive 7- $\mu\text{m}$  serial sections were selected; a space of 140  $\mu\text{m}$  in thickness was then retained, before five more consecutive sections were obtained. Three sections were randomly selected for insulin and one section for glucagon immunoperoxidase reaction. For immunohistochemistry, paraffin was removed, the sections were rehydrated and washed with 0.05 M Tris-saline buffer (TBS) pH 7.4, and incubated with TBS containing 0.3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  for endogenous peroxidase activity blockade and permeabilized for 1 h with TTBS (0.1 % Tween 20 and 5 g/% of fat free milk in TBS). The sections were incubated with a polyclonal guinea pig anti-insulin (1:150; Dako North America, Inc., CA, USA) or rabbit anti-glucagon (1:50; Dako North America, Inc., CA, USA) antibody at 4°C overnight and, after this period, incubated with rabbit anti-guinea pig IgG or goat anti-rabbit conjugated antibody with HRP for 1 h and 30 min. The positive insulin or glucagon cells were detected with diaminobenzidine (DAB; Sigma- Aldrich Chemicals, St Louis, MO, USA) solution (10% DAB and 0.2%  $\text{H}_2\text{O}_2$  in TBS). Finally, the sections were quickly stained with Ehrlich's hematoxylin and mounted for microscopy observation. All islets present in the sections were covered systematically by capturing images with a digital camera coupled to a microscope (Olympus DP71; Olympus BX60).

The total number of islets per  $\text{mm}^2$  was calculated by dividing the total number of islets per pancreas area. The number of small, medium and large islets was calculated by dividing the number of total islets that presented an area  $<5,000 \mu\text{m}^2$ ,

or between 5,000 and 10,000  $\mu\text{m}^2$  or  $>10,000 \mu\text{m}^2$  respectively, per pancreas area (33). Total islets,  $\beta$ -cell and  $\alpha$ -cell area inside the islet was measured using Image-Pro-Plus Media, Cybernetics Program (Rockville, MD, USA) and at least 750 islets per group from 3-4 rats were sampled. The islet and  $\beta$ -cell relative masses were calculated from the sums of the islet and  $\beta$ -cells area, respectively, multiplied by 100, divided by the total pancreatic tissue.  $\beta$ -Cell size was measured using the same material used for determination of  $\beta$ -cell area and mass. The  $\beta$ -cell number was obtained by counting the total  $\beta$ -cell nuclei within each total  $\beta$ -cell area sampled and results were then expressed as  $\beta$ -cell number per 1000  $\mu\text{m}^2$  of  $\beta$ -cell area, as previously described (28).

### *Statistical analysis*

Results are presented as means  $\pm$  SEM for the number of determinations (n) indicated. The statistical analyses were carried out using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Newman–Keuls post-test ( $P < 0.05$ ) using GraphPad Prism Software version 5.00 for Windows (GraphPad<sup>®</sup> Software San Diego, CA, USA).

## **Results**

### *General rat parameters*

Figure 1A shows that BW progression in MSG-treated rats was significantly lower at 3 weeks after sham surgery, when compared to CTL rats ( $P < 0.05$ ). The total BW, as judged by the area under the growth curve (AUC), was lower in MSG than CTL rats ( $P < 0.05$ ; Fig. 1B). In addition, the amount of food consumed during the experimental period by MSG rats was lower than that of CTL rats ( $761 \pm 34$  vs

$863 \pm 10 \text{ g.weeks}^{-1}$ , respectively;  $P < 0.03$ ). However, the conversion of this food into efficient BW gain in MSG rats was similar to that seen in CTL rats (Fig. 1C).

Vagotomy did not modify BW between the groups, whereas it significantly reduced the total food intake in the CVAG ( $784 \pm 23 \text{ g.weeks}^{-1}$ ) and MVAG ( $649 \pm 21 \text{ g.weeks}^{-1}$ ) groups, compared to their respective controls ( $P < 0.001$ ), without altering feed efficiency (Fig 1C).

At the end of experimental period, MSG rats showed a reduction of 14% and 8% in final BW and nasoanal length, respectively, in comparison with CTL rats ( $P < 0.05$  and  $P < 0.03$ , respectively; Table 1). MSG treatment efficiently induced obesity, since the Lee index and retroperitoneal and perigonadal fat pads were higher in MSG, compared to CTL rats ( $P < 0.03$ ,  $P < 0.001$  and  $P < 0.001$ , respectively; Table 1). Vagotomy did not alter BW, nasoanal length or Lee index, but was effective in preventing fat deposition in MVAG, compared to MSG, with a reduction of 25% and 26% in the retroperitoneal and perigonadal fat stores ( $P < 0.05$  and  $P < 0.03$ ; Table 1). To confirm bilateral subdiaphragmatic vagotomy, we analyzed the ratio between stomach weight and BW (3). CVAG and MVAG rats presented higher stomach weight:BW ratios ( $0.86 \pm 0.05$  vs  $0.69 \pm 0.01$  % BW, respectively), when compared to CTL ( $0.49 \pm 0.01$  % BW;  $P < 0.001$ ) and MSG ( $0.38 \pm 0.08$  % BW;  $P < 0.001$ ) rats, respectively.

#### *Glucose tolerance and insulin sensitivity*

At the end of the experimental period, all rat groups were submitted to an ipGTT. Before glucose administration, fasted MSG rats did not show any alteration in blood glucose levels, whereas they presented higher plasma insulin levels ( $P < 0.05$ ; Fig. 2A and 2C). After glucose loading, glycemia reached maximal levels at 15 min in

all groups (Fig. 2A). MSG rats presented higher glycemia at 15, 30 and 60 min of the test, when compared with CTL rats ( $P < 0.05$ , Fig 2A). The total glycemia during the ipGTT in MSG was 50% higher than the CTL group ( $P < 0.03$ ; Fig. 2B). In addition, at 30 min, insulinemia was 4-fold higher in the MSG rats than in the CTL rats ( $P < 0.03$ ; Fig. 2C). Vagotomy normalized glucose tolerance and insulinemia, before and at 30 min after the glucose injection, in MVAG rats (Fig. 2A-C). Glucose intolerance in the MSG group was in accordance with an impaired insulin peripheral action, since the HOMA-IR was 3.3-fold higher in MSG rats than in CTL rats ( $P < 0.03$ ; Fig. 2D). In addition, the MSG group presented a 37% reduction in the glucose disappearance rate ( $K_{ITT}$ ) when compared with CTL rats ( $P < 0.03$ ; Fig 2E). Vagotomy, performed at 30 days of age, normalized HOMA-IR and the  $K_{ITT}$  values, indicating a significant preventative effect on insulin resistance in adult MSG rats (Fig. 2D and 2E).

#### *Serum biochemical parameters and lipid content in the liver*

Fasting glucose levels were similar in both groups (Table 2); however, the normoglycemia in MSG rats was maintained by hyperinsulinemia, when compared to CTL ( $P < 0.03$ ; Tab. 2). Vagotomy efficiently reduced insulinemia in MVAG rats, with a decrease of 33% in serum insulin, in comparison with MSG rats ( $P < 0.05$ ; Table 2). The MSG group presented hypertriglyceridemia and hypercholesterolemia. Serum TG levels were efficiently reduced in MVAG rats, compared to MSG ( $P < 0.05$ ). However, total CHOL levels were partially improved in the MVAG group (Table 2). Furthermore, the TG content in the liver of the MSG rats was 57% higher than in CTL rats ( $P < 0.05$ ; Table 2). Early subdiaphragmatic vagotomy normalized the TG content in the liver of adult MVAG rats (Table 2). No alteration was observed in total fat and CHOL content in the liver of any of the rat groups.

### *Islet insulin secretion and storage*

Figure 3A shows glucose-induced insulin secretion in islets isolated from CTL, CVAG, MSG and MVAG rats. Insulin release at basal glucose concentration was similar between groups. In contrast, at stimulatory glucose concentrations, the insulin release was significantly higher in MSG compared to CTL islets ( $P < 0.001$  and  $P < 0.05$ , for 11.1 and 16.7 mM glucose, respectively; Fig. 3A). Vagotomy partially reduced insulin secretion at 11.1 mM glucose in MVAG rats, but did not modify the hormone's secretion at 16.7 mM glucose, when compared to MSG rats (Fig. 3A). In addition, islet insulin content was 61% higher in MSG than that observed in CTL islets ( $P < 0.05$ ; Fig. 3B). Subdiaphragmatic vagal denervation did not alter islet insulin storage in the CVAG and MVAG groups (Fig. 3B).

### *Pancreatic islet morphology and morphometry*

Figure 4A shows histological pancreatic sections stained for insulin or glucagon. The pancreatic islet architecture was not altered between the groups.

Table 3 shows that MSG rats presented a reduction of 34% and 41% in the pancreas weight and total pancreas area, when compared to CTL rats ( $P < 0.03$ ). After 2-months of subdiaphragmatic vagotomy denervation, MVAG rats presented 1.3 and 1.8-fold increases in the pancreas weight and area, respectively, in comparison with MSG rats ( $P < 0.05$ ; Table 3). Histological analysis showed that pancreatic islets from MSG rats were smaller with a reduction in  $\beta$ -cell area without modification in  $\alpha$ -cell content, when compared with CTL ( $P < 0.001$ ; Table 3). Furthermore, the MSG group presented an increased number of pancreatic islets per  $\text{mm}^2$  of the pancreas analyzed ( $P < 0.03$ ), with a higher number of islets of all sizes



(small, medium and large; Table 3), which may contribute to the higher islet and  $\beta$ -cell relative mass in the MSG pancreas ( $P < 0.03$ ; Fig. 4B and 4C). These effects were associated with enhanced proliferation in the MSG group, since increased  $\beta$ -cell number/1000  $\mu\text{m}^2$  of  $\beta$ -cell area was present in the MSG pancreas, compared with CTL ( $P < 0.001$ ; Fig. 4E), but without any alteration in  $\beta$ -cell size (Fig. 4D). The pancreas of MVAG rats did not present any alteration in islet and  $\beta$ -cell area, when compared with MSG (Table 3). While the numbers of small- and large-sized MVAG pancreatic islets were similar to those of the CTL, there was an intermediate number of medium MVAG islets, when compared to the CTL and MSG groups (Table 3). This islet size normalization was associated with a similar  $\beta$ -cell number/1000  $\mu\text{m}^2$  of  $\beta$ -cell area in the MVAG and CTL pancreas (Fig. 4E). In addition, vagotomy, performed at 30 days of age, reduced the islet and  $\beta$ -cell area in the pancreas of 90-day-old CVAG rats ( $P < 0.05$ ), without altering the distribution of islet per size (Table 3) or  $\beta$ -cell number/1000  $\mu\text{m}^2$  of  $\beta$ -cell area (Fig. 4E). Finally, the relative islet and  $\beta$ -cell masses in the MVAG and CVAG pancreas were similar to those of the CTL (Fig. 4B and 4C).

#### *Extracellular regulated kinase (ERK) protein expression*

We verified whether ERK was involved in  $\beta$ -cell proliferation in MSG rats; Western blot analysis did not show any alterations in the pERK<sub>1/2</sub>/ERK<sub>1/2</sub> ratio (Fig. 5A), or pERK<sub>1/2</sub> (Fig. 5B) and ERK<sub>1/2</sub> (Fig. 5C) protein content when comparing all groups of islets.

## **Discussion**

Consistent data from the literature demonstrate that pancreatic islets from MSG-obese rodents secrete more insulin in response to glucose (2, 26, 32, 38). This effect may lead to the hyperinsulinemia that compensates insulin resistance. While this action may indicate that there is an adequate adaptive  $\beta$ -cell function to impaired hormone action, this is a simplistic manner of explaining the endocrine pancreatic function in MSG obesity. Here, we hypothesize that the increased glucose-induced insulin secretion in this experimental model of obesity may be associated with a  $\beta$ -cell hypertrophy and/or proliferation and that the PNS is the main determinant for the morpho-functional modifications in the MSG pancreas, since it has been reported that MSG rodents present ANS dysfunction with an increased PNS action, but a decreased SNS function (2, 10, 39). As such, we performed a subdiaphragmatic vagotomy at 30 days of age and observed, after 2 months, that adult vagotomized MSG rats presented normalization of several endocrine pancreatic characteristics that may be linked to the prevention of obesity, as well as improved glucose homeostasis and insulin action.

Pancreatic morphometry demonstrated that adult MSG rats presented increased islet and  $\beta$ -cell masses (Fig. 4B and 4C), and an elevated  $\beta$ -cell number/1000  $\mu\text{m}^2$  of  $\beta$ -cell area (Fig. 4E), with no modification in  $\beta$ -cell size (Fig. 4D). These islet modifications demonstrate that the increased insulin secretion at stimulatory glucose concentrations (Fig. 3A), as well as the hyperinsulinemia observed (Table 2 and Fig. 2C), are associated with enhanced pancreatic  $\beta$ -cell proliferation in the MSG group.

Reports suggest that the vagus nerve controls cellular proliferation. In VMH-lesioned rats that present hyperphagia and obesity development, an increase in liver DNA synthesis was observed at 1 day after the lesion and reached maximum levels

at 3 days after VMH-injury (19). These rats also showed hyperproliferation in the gastrointestinal mucosa (21, 23), and in the  $\beta$  and acinar cells of the pancreas (22). VMH-lesioned mice also presented a similar cell proliferation in the stomach, small intestine, liver, and, exocrine and endocrine pancreas (41). This increased proliferation was inhibited by bilateral subdiaphragmatic vagotomy or by administration of the cholinergic blocker, atropine (19, 20, 22). In fact, after 1 week of bilateral celiac branch-vagus nerve transection, normal *Sprague-Dawley* rats presented a 50% reduction in  $\beta$ -cell and increase acinar tissue proliferation, an action associated with lower islet protein kinase (PK)-B/Akt expression (24). The vagus nerve was also found to be involved in pancreas regeneration, since after 5 days of pancreatic duct ligation, the administration of atropine inhibited rat  $\beta$ -cell proliferation, an effect associated with lower PDX-1 (pancreatic and duodenal homeobox 1) and Maf-positive  $\beta$ -cells (31). These studies demonstrated that the vagus nerve is important for the acute control of cell proliferation; however its chronic action has been poorly investigated.

The acetylcholine-M3 receptor agonist, carbachol, activates ERK<sub>1/2</sub> in neonatal rat islets (5). ERK<sub>1/2</sub> protein is involved in  $\beta$ -cell proliferation, survival and secretion (11, 25). Imai et al. (18) reported that hepatic ERK activation transmits signals from the liver to the CNS, resulting in activation of the efferent vagus to the pancreas, which regulates  $\beta$ -cell proliferation. In our study, we verified whether the ERK<sub>1/2</sub> protein may be involved in the increased  $\beta$ -cell proliferation observed in the MSG group, but we did not find alterations in pERK<sub>1/2</sub>/ERK<sub>1/2</sub> protein expressions between the groups (Fig. 5).

Additionally, we also demonstrated that the PNS contributes to increased  $\beta$ -cell hyperplasia in the pancreas of the MSG rats. After 2 months of subdiaphragmatic

vagotomy, MVAG rats were found to presented normal values for pancreas weight and area, distribution of islets per size (Table 3), relative islet and  $\beta$ -cell masses (Fig. 4B and 4C), and  $\beta$ -cell number/1000  $\mu\text{m}^2$  of  $\beta$ -cell area (Fig. 4E). Thus, for the first time we demonstrate that the vagus nerve is chronically involved in islet morphology modification in MSG rats. Our data are in accordance with reports in *ob/ob* mice showing that, at 14 and 21 days after subdiaphragmatic truncal vagotomy, lower  $\beta$ -cell proliferation was observed, while no modification in  $\beta$ -cell proliferation was found at 5 months (14). Data support the hypothesis that hypertonia of the vagus nerve during the onset of the obesity and insulin resistance development may program  $\beta$ -cell mass. In addition, is important to emphasize that we observed that PNS activity is important for islet and  $\beta$ -cell constitution in normal rats, since adult CVAG rats presented a decrease in islet and  $\beta$ -cell area without any alteration in whole-pancreas mass content (Fig. 4B and 4C).

Islets isolated from MVAG rats presented enhanced insulin secretion at 16.7 mM glucose (Fig. 3A). However, a reduction in glucose-induced insulin secretion in islets from MSG rats submitted to early subdiaphragmatic vagotomy has been previously reported (2). The discrepancy between these findings needs further investigation; however, since MSG islets secrete less insulin in response to the cholinergic agonist, carbachol (2, 38), indicating that the vagus hypertonia may disrupt this important glucose-induced secretion amplifying pathway (42), we postulate that early vagotomy prevented the down-regulation in the M3/PKC pathway, improving MVAG  $\beta$ -cell function upon glucose stimulus.

Our study, in addition to detecting morpho-functional alterations in the MSG pancreas, also replicated the obesity parameters that have been previously reported for MSG rats (4, 17, 26, 27, 32), since MSG rats presented lower BW and nasoanal

length, increased Lee index and fat depots, normoglycemia, hyperinsulinemia, dyslipidemia, glucose intolerance and insulin resistance (Tables 1 and 2; Fig. 1 and 2). Vagotomy, performed at 30 days of age, prevented obesity, fat deposition in the liver and ameliorated glucose tolerance and insulin sensitivity in adult MVAG rats (Tables 1 and 2, Fig. 1 and 2). Prevention of body fat accumulation and an improvement in glucose tolerance has been reported in MSG vagotomized rats (3, 4). Furthermore, we demonstrated that MVAG rats presented lower serum TG levels and a normal TG content in the liver. Recently, Stearns et al. (40) reported that subdiaphragmatic vagotomy prevented the high-fat diet induced obesity in *Sprague-Dawley* rats as well as a reduced fat content in the liver. Furthermore, the vagal deafferentation by capsaicin decreased abdominal fat depots in these rodents. It is becoming increasingly recognized that vagal afferents play an important role in energy homeostasis. The nucleus tractus solitarius, the vagal afferent nucleus and sensory afferents all contribute to regulate energy balance (12). Since insulin enhanced the basal activity of the duodenal vagal mechanoreceptors (7), we suggested that the subdiaphragmatic vagotomy by preventing pancreatic islets morpho-functional alterations normalizes insulinemia in MVAG rats, which did not alter the vagus afferent inputs to the CNS. Furthermore, vagal efferents to the liver are involved in insulin-induced hepatic lipogenesis (29). We speculate that the improved insulinemia in MVAG rats normalizes vagal afferent inputs to the CNS, resulting in lower efferent to the liver, which may decrease TG production and consequently its levels in the serum. Therefore, our evidence suggests that vagal hypertonia to the pancreas may be a central mechanism in the disruption of nutrient homeostasis in MSG rats, leading to hyperinsulinemia, which in turn increases fat production and storage, and leads to insulin resistance.

In conclusion, we demonstrate, for the first time, that adult MSG rats showed enhanced pancreatic  $\beta$ -cell proliferation, contributing to the higher islet insulin secretion in response to glucose. The vagus nerve is the main factor involved in such a process, since subdiaphragmatic vagotomy performed at 30 days of age prevented islet morphological alterations in adult MVAG rats. Possibly this increased PNS activity in MSG endocrine pancreas is responsible for the hyperinsulinemia that enhances fat storage, damages glucose homeostasis and reduces the action of insulin in the MSG obesity.

### **Acknowledgments**

This study forms part of Camila Lubaczeuski M.Sc. and was supported by grants from Fundação Araucária; Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). We are grateful to Assis Roberto Escher for animal care and Nicola Conran for editing the English.

### **Authors contribution**

MLB, SLB, CL and JFV: conception and experimental design, execution of all experiments; JCSS: aid the immunohistochemistry and morphometric analysis; EMC: intellectual contribution and provide materials and reagents. CL, MLB and RAR: data interpretation and manuscript writing.

### **References**

1. **Ahrén B.** Islet nerves in focus--defining their neurobiological and clinical role. *Diabetologia* 55: 3152-3154, 2012.

2. **Balbo SL, Bonfleur ML, Carneiro EM, Amaral ME, Filiputti E, and Mathias PC.** Parasympathetic activity changes insulin response to glucose and neurotransmitters. *Diabetes Metab* 28: 3S13-17; discussion 13S108-112, 2002.
3. **Balbo SL, Grassioli S, Ribeiro RA, Bonfleur ML, Gravena C, Brito MoN, Andreazzi AE, Mathias PC, and Torrezan R.** Fat storage is partially dependent on vagal activity and insulin secretion of hypothalamic obese rat. *Endocrine* 31: 142-148, 2007.
4. **Balbo SL, Mathias PC, Bonfleur ML, Alves HF, Siroti FJ, Monteiro OG, Ribeiro FB, and Souza AC.** Vagotomy reduces obesity in MSG-treated rats. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 108: 291-296, 2000.
5. **Barbosa HC, Bordin S, Anhê G, Persaud SJ, Bowe J, Borelli MI, Gagliardino JJ, and Boschero AC.** Islet neogenesis-associated protein signaling in neonatal pancreatic rat islets: involvement of the cholinergic pathway. *J Endocrinol* 199: 299-306, 2008.
6. **Bernardis LL, and Patterson BD.** Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. *J Endocrinol* 40: 527-528, 1968.
7. **Blat S, and Malbert CH.** Insulin modulates duodenal vagal afferents basal activity. *Auton Neurosci* 122: 29-37, 2005.
8. **Bonner-Weir S.** Islet growth and development in the adult. *J Mol Endocrinol* 24: 297-302, 2000.
9. **Bonora E, Targher G, Alberiche M, Bonadonna RC, Saggiani F, Zenere MB, Monauni T, and Muggeo M.** Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity: studies in

subjects with various degrees of glucose tolerance and insulin sensitivity. *Diabetes Care* 23: 57-63, 2000.

10. **Bray GA, and York DA.** The MONA LISA hypothesis in the time of leptin. *Recent Prog Horm Res* 53: 95-117; discussion 117-118, 1998.

11. **Costes S, Broca C, Bertrand G, Lajoix AD, Bataille D, Bockaert J, and Dalle S.** ERK1/2 control phosphorylation and protein level of cAMP-responsive element-binding protein: a key role in glucose-mediated pancreatic beta-cell survival. *Diabetes* 55: 2220-2230, 2006.

12. **de Lartigue G, de La Serre CB, and Raybould HE.** Vagal afferent neurons in high fat diet-induced obesity; intestinal microflora, gut inflammation and cholecystokinin. *Physiol Behav* 105: 100-105, 2011.

13. **Duivenvoorden I, Teusink B, Rensen PC, Romijn JA, Havekes LM, and Voshol PJ.** Apolipoprotein C3 deficiency results in diet-induced obesity and aggravated insulin resistance in mice. *Diabetes* 54: 664-671, 2005.

14. **Edvell A, and Lindström P.** Vagotomy in young obese hyperglycemic mice: effects on syndrome development and islet proliferation. *Am J Physiol* 274: E1034-1039, 1998.

15. **FOLCH J, LEES M, and SLOANE STANLEY GH.** A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497-509, 1957.

16. **Gilon P, and Henquin JC.** Mechanisms and physiological significance of the cholinergic control of pancreatic beta-cell function. *Endocr Rev* 22: 565-604, 2001.

17. **Hirata AE, Andrade IS, Vaskevicius P, and Dolnikoff MS.** Monosodium glutamate (MSG)-obese rats develop glucose intolerance and insulin resistance to peripheral glucose uptake. *Braz J Med Biol Res* 30: 671-674, 1997.



18. **Imai J, Katagiri H, Yamada T, Ishigaki Y, Suzuki T, Kudo H, Uno K, Hasegawa Y, Gao J, Kaneko K, Ishihara H, Niijima A, Nakazato M, Asano T, Minokoshi Y, and Oka Y.** Regulation of pancreatic beta cell mass by neuronal signals from the liver. *Science* 322: 1250-1254, 2008.
19. **Kiba T, Tanaka K, Endo O, and Inoue S.** Role of vagus nerve in increased DNA synthesis after hypothalamic ventromedial lesions in rat liver. *Am J Physiol* 262: G483-487, 1992.
20. **Kiba T, Tanaka K, Endo O, and Inoue S.** Ventromedial hypothalamic lesions increase gastrointestinal DNA synthesis through vagus nerve in rats. *Gastroenterology* 104: 475-484, 1993.
21. **Kiba T, Tanaka K, Hoshino M, Numata K, Okano K, and Inoue S.** Ventromedial hypothalamic lesions induce the proliferation of gastrointestinal mucosal cells in the rat. *Life Sci* 57: 827-832, 1995.
22. **Kiba T, Tanaka K, Numata K, Hoshino M, Misugi K, and Inoue S.** Ventromedial hypothalamic lesion-induced vagal hyperactivity stimulates rat pancreatic cell proliferation. *Gastroenterology* 110: 885-893, 1996.
23. **Kintaka Y, Osaka T, Suzuki Y, Hashiguchi T, Niijima A, Kageyama H, Fumiko T, Shioda S, and Inoue S.** Effects of gastric vagotomy on visceral cell proliferation induced by ventromedial hypothalamic lesions: role of vagal hyperactivity. *J Mol Neurosci* 38: 243-249, 2009.
24. **Lausier J, Diaz WC, Roskens V, LaRock K, Herzer K, Fong CG, Latour MG, Peshavaria M, and Jetton TL.** Vagal control of pancreatic  $\beta$ -cell proliferation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 299: E786-793, 2010.
25. **Longuet C, Broca C, Costes S, Hani EH, Bataille D, and Dalle S.** Extracellularly regulated kinases 1/2 (p44/42 mitogen-activated protein kinases)

phosphorylate synapsin I and regulate insulin secretion in the MIN6 beta-cell line and islets of Langerhans. *Endocrinology* 146: 643-654, 2005.

26. **Lucinei Balbo S, Gravena C, Bonfleur ML, and de Freitas Mathias PC.**

Insulin secretion and acetylcholinesterase activity in monosodium l-glutamate-induced obese mice. *Horm Res* 54: 186-191, 2000.

27. **Maiter D, Underwood LE, Martin JB, and Koenig JI.** Neonatal treatment with monosodium glutamate: effects of prolonged growth hormone (GH)-releasing hormone deficiency on pulsatile GH secretion and growth in female rats.

*Endocrinology* 128: 1100-1106, 1991.

28. **Marroquí L, Batista TM, Gonzalez A, Vieira E, Rafacho A, Colleta SJ, Taboga SR, Boschero AC, Nadal A, Carneiro EM, and Quesada I.** Functional and structural adaptations in the pancreatic  $\alpha$ -cell and changes in glucagon signaling

during protein malnutrition. *Endocrinology* 153: 1663-1672, 2012.

29. **Martin DD, Cincotta AH, and Meier AH.** Hepatic vagotomy abolishes the circadian rhythm of lipogenic responsiveness to insulin and reduces fat stores in hamsters. *Neuroendocrinology* 52: 9-14, 1990.

30. **Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, and Turner RC.** Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell

function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28: 412-419, 1985.

31. **Medina A, Yamada S, Hara A, Hamamoto K, and Kojima I.** Involvement of the parasympathetic nervous system in the initiation of regeneration of pancreatic  $\beta$ -cells. *Endocr J* 60: 687-696, 2013.

32. **Nardelli TR, Ribeiro RA, Balbo SL, Vanzela EC, Carneiro EM, Boschero AC, and Bonfleur ML.** Taurine prevents fat deposition and ameliorates plasma lipid profile in monosodium glutamate-obese rats. *Amino Acids* 41: 901-908, 2011.
33. **Ng SF, Lin RC, Laybutt DR, Barres R, Owens JA, and Morris MJ.** Chronic high-fat diet in fathers programs  $\beta$ -cell dysfunction in female rat offspring. *Nature* 467: 963-966, 2010.
34. **Olney JW.** Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 164: 719-721, 1969.
35. **Olney JW.** Glutamate-induced neuronal necrosis in the infant mouse hypothalamus. An electron microscopic study. *J Neuropathol Exp Neurol* 30: 75-90, 1971.
36. **Plum L, Belgardt BF, and Brüning JC.** Central insulin action in energy and glucose homeostasis. *J Clin Invest* 116: 1761-1766, 2006.
37. **Rasmussen H, Zawalich KC, Ganesan S, Calle R, and Zawalich WS.** Physiology and pathophysiology of insulin secretion. *Diabetes Care* 13: 655-666, 1990.
38. **Ribeiro RA, Balbo SL, Roma LP, Camargo RL, Barella LF, Vanzela EC, de Freitas Mathias PC, Carneiro EM, Boschero AC, and Bonfleur ML.** Impaired muscarinic type 3 (M3) receptor/PKC and PKA pathways in islets from MSG-obese rats. *Mol Biol Rep* 40: 4521-4528, 2013.
39. **Scomparin DX, Gomes RM, Grassioli S, Rinaldi W, Martins AG, de Oliveira JC, Gravena C, and de Freitas Mathias PC.** Autonomic activity and glycemic homeostasis are maintained by precocious and low intensity training exercises in MSG-programmed obese mice. *Endocrine* 36: 510-517, 2009.

40. **Stearns AT, Balakrishnan A, Radmanesh A, Ashley SW, Rhoads DB, and Tavakkolizadeh A.** Relative contributions of afferent vagal fibers to resistance to diet-induced obesity. *Dig Dis Sci* 57: 1281-1290, 2012.
41. **Suzuki Y, Inoue S, Shimizu H, Ishizuka N, Kasahara Y, Takahashi T, Arai K, Kobayashi Y, Kishi M, Imazeki N, Senoo A, and Osaka T.** Cell proliferation in visceral organs induced by ventromedial hypothalamic (VMH) lesions: Development of electrical VMH lesions in mice and resulting pathophysiological profiles. *Endocr J* 58: 247-256, 2011.
42. **Thore S, Dyachok O, Gylfe E, and Tengholm A.** Feedback activation of phospholipase C via intracellular mobilization and store-operated influx of Ca<sup>2+</sup> in insulin-secreting beta-cells. *J Cell Sci* 118: 4463-4471, 2005.
43. **Yoshimura R, Omori H, Somekawa S, Osaka T, Ito R, Inoue S, and Endo Y.** Continuous carbachol infusion promotes peripheral cell proliferation and mimics vagus hyperactivity in a rat model of hypothalamic obesity. *Biomed Res* 27: 81-88, 2006.

### Figure legends

Figure 1: Body weight (A) of CTL, CVAG, MSG and MVAG rats recorded over 6 weeks (n = 6). Mean  $\pm$  SEM of the total body weight (B) expressed by the area under growth curve, and food efficiency (D). \*MSG and MVAG different from controls. The letters over the bars represent significant differences (P < 0.05).

Figure 2: (A) Changes in blood glucose during the ipGTT in 90-day-old CTL, CVAG, MSG and MVAG rats. (B) Total plasma glucose concentrations during the ipGTT, expressed by the AUC. (C) Insulinemia at 0 and 30 min of the ipGTT. Insulin sensitivity measured by the HOMA-IR (D) and  $K_{ITT}$  (E). Data are mean  $\pm$  SEM obtained from 8 rats for each group. \* Indicates a significant difference between MSG and CTL; #MSG and MVAG different from CTL and CVAG, respectively. %MSG different from CTL and CVAG. Different letters over the bars indicate significant differences (P < 0.05).

Figure 3: Glucose-induced insulin secretion (A) and total insulin content of islets (B) from 90-day-old CTL, CVAG, MSG and MVAG rats. Groups of 4 islets were incubated for 1 h with 2.8, 11.1 or 16.7 mM glucose. Data are means  $\pm$  SEM obtained from 16 groups of islets. Different letters over the bars indicate a significant difference (P < 0.05).

Figure 4: Representative images of pancreas sections stained for insulin or glucagon and hematoxylin (A). Relative islet mass (B),  $\beta$ -cell mass (C),  $\beta$ -cell size (D) and  $\beta$ -cell number (E) in the pancreas of 90-day-old CTL, CVAG, MSG and MVAG rats.

Data are mean  $\pm$  SEM (n = 4). Different letters indicate significant difference (P < 0.05).

Figure 5: Phospho (p)-ERK<sub>1/2</sub>/ERK<sub>1/2</sub> protein expression (A) in islets isolated from 90-day-old CTL, CVAG, MSG and MVAG rats. Protein extracts were processed for Western blot detection of pERK<sub>1/2</sub> (B) and ERK<sub>1/2</sub> (C) content. Bars represent the means  $\pm$  SEM of the values, determined by optical densitometry (n = 4).

Table 1: Body weight (BW), nasoanal length, Lee Index, retroperitoneal and perigonadal fat pads of 90-day old CTL, CVAG, MSG and MVAG rats.

	CTL	CVAG	MSG	MVAG
BW (g)	361 ± 11 <sup>a</sup>	337 ± 11 <sup>a</sup>	310 ± 11 <sup>b</sup>	277 ± 11 <sup>b</sup>
Nasoanal length (cm)	24 ± 0.7 <sup>a</sup>	25 ± 0.4 <sup>a</sup>	22 ± 0.2 <sup>b</sup>	22 ± 0.3 <sup>b</sup>
Lee Index	286 ± 5 <sup>a</sup>	278 ± 4 <sup>a</sup>	311 ± 1 <sup>b</sup>	304 ± 6 <sup>b</sup>
Retroperitoneal fat pads (% BW)	0.9 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.5 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.6 ± 0.1 <sup>b</sup>	1.2 ± 0.1 <sup>a</sup>
Perigonadal fat pads (% BW)	0.9 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.8 ± 0.04 <sup>a</sup>	1.9 ± 0.2 <sup>b</sup>	1.4 ± 0.1 <sup>a</sup>

Data are means ± SEM (n = 6). Different letters indicate significant difference (P < 0.05).

Table 2: Fasting serum glucose, insulin, TG and total CHOL concentrations. Total fat, TG and CHOL content in the liver of 90-day-old CTL, CVAG, MSG and MVAG rats.

	CTL	CVAG	MSG	MVAG
Glucose (mg/dL)	61 ± 4	63 ± 3	69 ± 3	67 ± 4
Serum insulin (ng/mL)	0.33 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.36 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.79 ± 0.1 <sup>b</sup>	0.53 ± 0.06 <sup>a</sup>
Serum TG (mg/dL)	126 ± 5 <sup>a</sup>	105 ± 11 <sup>a</sup>	271 ± 13 <sup>b</sup>	224 ± 26 <sup>c</sup>
Serum total CHOL (mg/dL)	84 ± 4 <sup>a</sup>	81 ± 4 <sup>a</sup>	111 ± 10 <sup>b</sup>	103 ± 3 <sup>ab</sup>
Fat liver content (mg/g liver)	66 ± 2	66 ± 2	77 ± 5	64 ± 7
TG liver content (µg/mg liver)	9.3 ± 0.1 <sup>a</sup>	8.0 ± 0.1 <sup>a</sup>	14.6 ± 2.2 <sup>b</sup>	9.8 ± 1.5 <sup>a</sup>
CHOL liver content (µg/mg liver)	2.5 ± 0.2	2.4 ± 0.2	3.2 ± 0.3	3.3 ± 0.6

Data are means ± SEM (n = 6–11). Different letters indicate significant difference (P < 0.05).



Table 3: Morphometric analysis of the pancreas of 90-day-old CTL, CVAG, MSG and MVAG rats.

	CTL	CVAG	MSG	MVAG
Pancreas weight (% <i>BW</i> )	0.43 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.47 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.28 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.36 ± 0.02 <sup>a</sup>
Pancreas area (mm <sup>2</sup> )	244 ± 30 <sup>a</sup>	334 ± 41 <sup>a</sup>	143 ± 12 <sup>b</sup>	263 ± 24 <sup>a</sup>
Islet area (μm <sup>2</sup> )	18685 ± 964 <sup>a</sup>	15882 ± 820 <sup>b</sup>	13532 ± 589 <sup>b</sup>	14674 ± 646 <sup>b</sup>
β-cell area (μm <sup>2</sup> )	13016 ± 667 <sup>a</sup>	11501 ± 606 <sup>b</sup>	9875 ± 427 <sup>b</sup>	10660 ± 488 <sup>b</sup>
α-cell area (μm <sup>2</sup> )	2039 ± 209	2091 ± 272	2102 ± 241	2249 ± 193
Total islet per mm <sup>2</sup> pancreas	1.1 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.9 ± 0.4 <sup>a</sup>	2.2 ± 0.1 <sup>b</sup>	1.5 ± 0.2 <sup>a</sup>
Number of small islets per mm <sup>2</sup> pancreas (<5,000 μm <sup>2</sup> )	0.5 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.4 ± 0.2 <sup>a</sup>	1.1 ± 0.1 <sup>b</sup>	0.7 ± 0.1 <sup>a</sup>
Number of medium islets per mm <sup>2</sup> pancreas (5,000-10,000 μm <sup>2</sup> )	0.2 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.1 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.4 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.3 ± 0.04 <sup>ab</sup>
Number of large islets per mm <sup>2</sup> pancreas (>10,000 μm <sup>2</sup> )	0.5 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.3 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.8 ± 0.06 <sup>b</sup>	0.5 ± 0.02 <sup>a</sup>
Number of islets analyzed	751	824	1283	1145

Data are means ± SEM. Different letters indicate significant difference (P < 0.05).

Figure 1

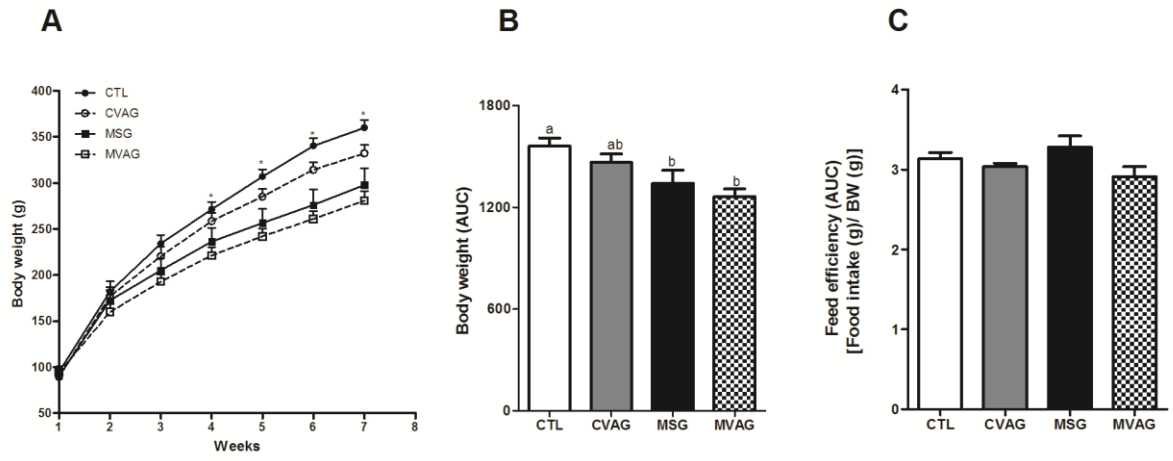


Figure 2

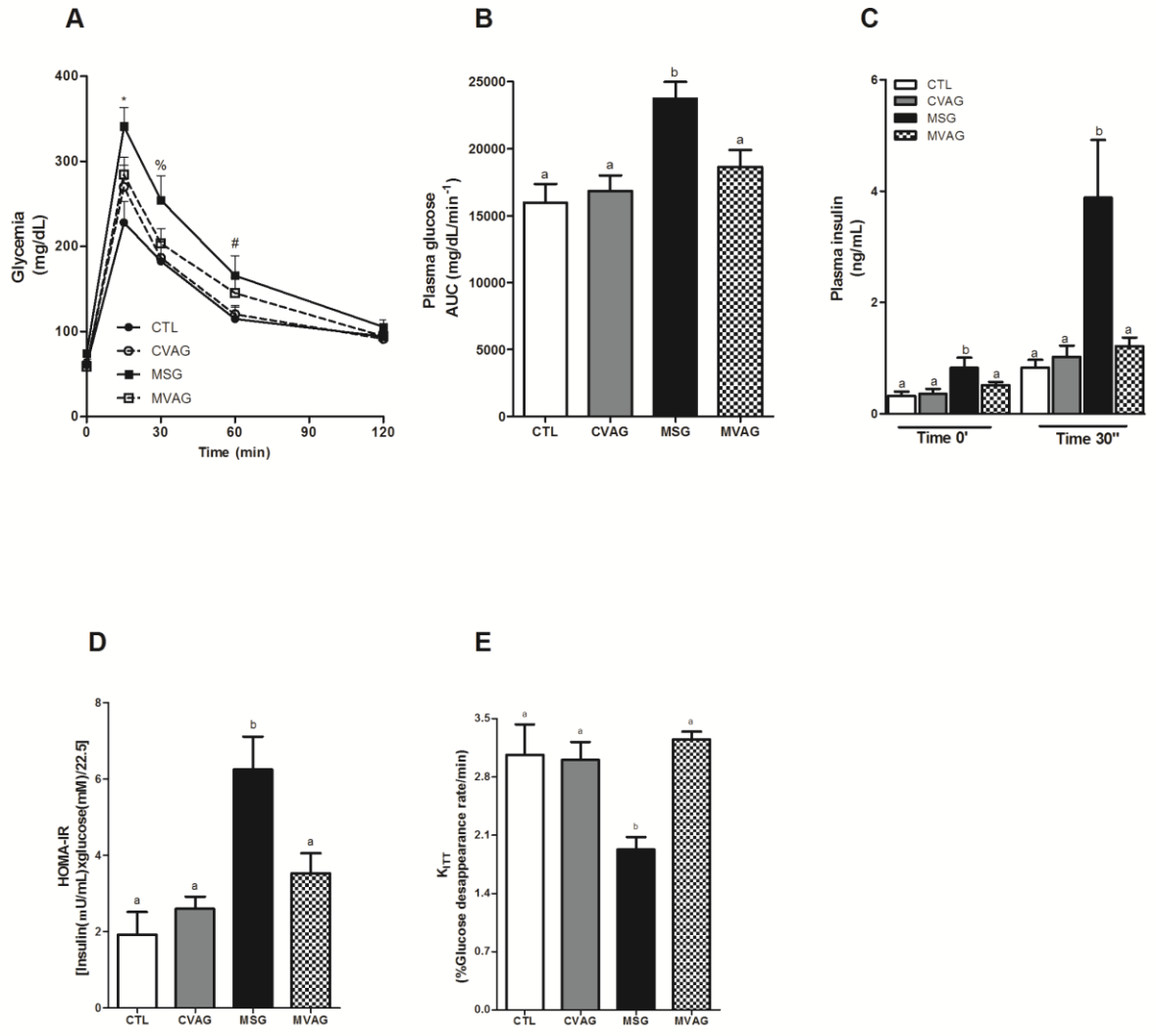


Figure 3

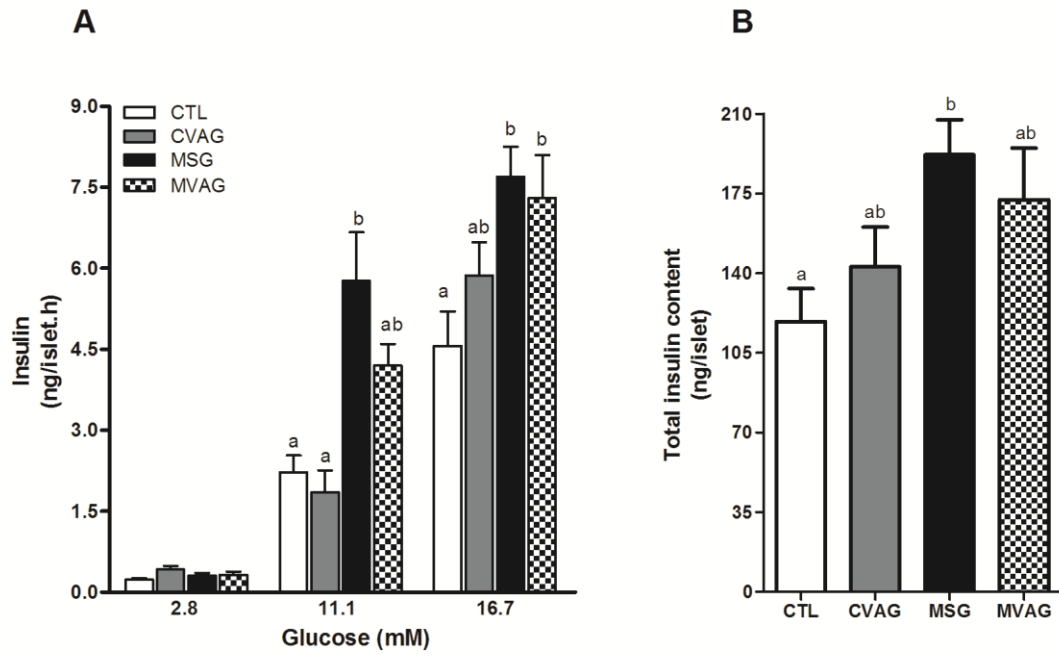


Figure 4

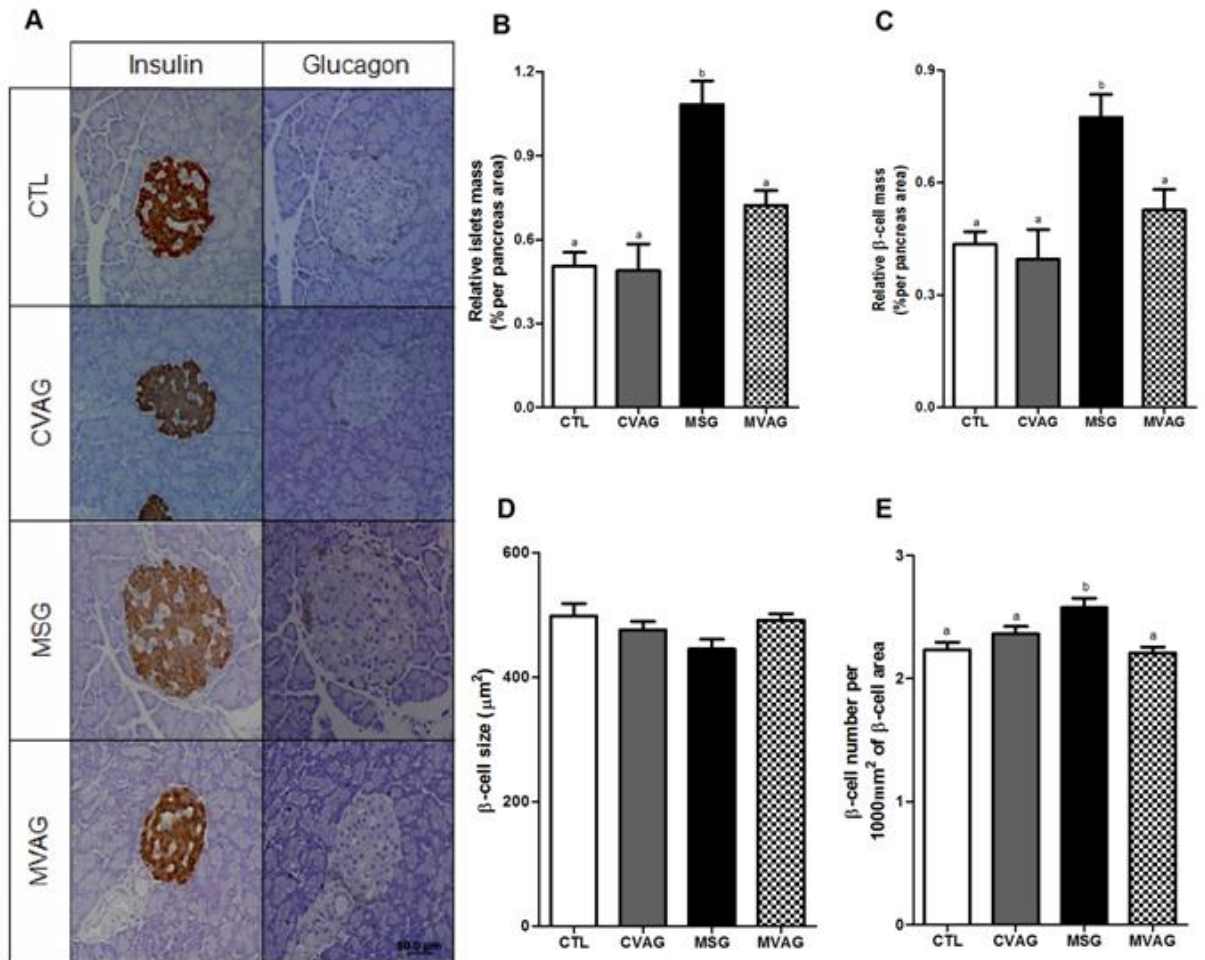
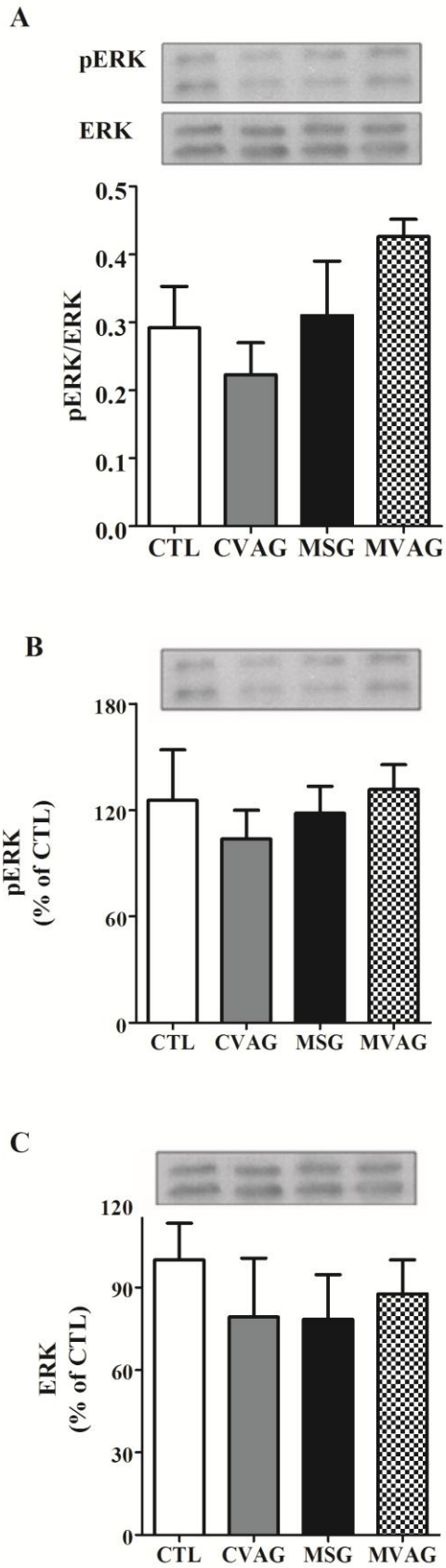


Figure 5



**ANEXO A:**

Certificado do Comitê de Ética na Experimentação Animal e Aulas Práticas - Universidade Estadual do Oeste do Paraná.



PRO-REITORIA DE PESQUISA E POS-GRADUACAO  
 COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL E AULAS PRÁTICAS  
 RUA UNIVERSITÁRIA, 2069 – PREDIO DA BIBLIOTECA – CAMPUS DE CASCAVEL - JD. UNIVERISTÁRIO  
 FONE: (45) 3220-3272 E 3277 - CEP 85819-110 - CASCAVEL – PR

## Comitê de Ética na Experimentação Animal e Aulas Práticas – CEEAAP/UNIOESTE

### PARECER DE APROVAÇÃO DE PROJETO

Protocolo de Experimentação Animal n°: **00812**

Título do Projeto: **Participação do sistema nervoso parassimpático na proliferação e manutenção celular em ilhotas de ratos obesos-MSG submetidos à vagotomia.**

Solicitante: **Maria Lucia Bonfleur (CCBS) Cascavel**

O projeto acima foi **aprovado**, conforme Ata 03-2012 em reunião ocorrida em 15-05-2012 realizada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal e Aulas Práticas da Unioeste, desde que seguido o protocolo proposto e avaliado por este Comitê.

Lembramos que, de acordo com as atribuições, o CEEAAP se resguarda do direito de realizar visitas aos locais onde os projetos serão executados com finalidade de acompanhamento.

Ao término da vigência do projeto, após o envio do relatório final, o coordenador receberá um Certificado de que o protocolo realizado seguiu os princípios da experimentação animal, de acordo com sua respectiva ata de aprovação em data especificada.

Cascavel, 15 de Maio de 2012.

Prof.ª Dr.ª Luciana Oliveira de Fariña  
 Coordenadora do CEEAAP/Unioeste  
 Portaria 3244/2011 - GRE



**ANEXO B:**

Normas do periódico

*American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*