

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 23/02/2019.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Eduardo Klöppel

**Vitamina D e cálcio para o tratamento de
ratas prenhes com diabetes moderado**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de
Mestre em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia
(Especialidade: Bioquímica).

Orientadora: Profa. Dra. Débora Cristina Damasceno

Botucatu

2018

Eduardo Klöppel

Vitamina D e cálcio para o tratamento de ratas prenhes
com diabetes moderado

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus de
Botucatu, para obtenção do título de
Mestre em Ginecologia, Obstetrícia e
Mastologia (Especialidade: Bioquímica).

Orientadora: Profa. Dra. Débora Cristina Damasceno

Botucatu

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Klöppel, Eduardo.

Vitamina D e cálcio para o tratamento de ratas prenhes com diabete moderado / Eduardo Klöppel. - Botucatu, 2018

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Débora Cristina Damasceno

Capes: 40101150

1. Diabetes mellitus. 2. Prenhez. 3. Vitamina D. 4. Cálcio. 5. Stress oxidativo. 6. Rato como animal de laboratório.

Palavras-chave: diabete; estresse oxidativo; prenhez; ratas; vitamina D; cálcio.

EPÍGRAFE

**“Não se conhece completamente
uma ciência enquanto não se
souber da sua história.”**

(Auguste Comte)

DEDICATÓRIA

Ao **Jorge Luiz Trevisani (Moishe)**, *in memoriam*, por ter sido durante toda minha vida um grande líder, incentivador, amigo, e acima de tudo um exemplo. Embora não esteja mais entre nós, seu legado sempre será a seriedade, a honestidade, o bom caráter, a ética, a humildade, o trabalho e a confiança no Eterno como meios para a conquista do sucesso e do respeito. Dentro de cada conquista minha, sempre haverá um exemplo seu.

Saudades eternas.

AGRADECIMENTOS

Ao Criador, **YHWH** (transliterado do hebraico - יהוה), por sua eterna misericórdia, e que apesar de eu não merecer, me concede todo o bem.

Aos meus familiares, meus pais **Sr. Agostinho Klöppel e Sra. Soraia da Silva**, meus irmãos **Caio Alex Klöppel e Murilo Klöppel** pelo apoio e por sempre desejarem o meu sucesso.

Aos meus amigos que sempre torcem por mim, **Andrieli Hauschildt, Beatriz Magalhães, Eric Trevisani, João Pedro Maia, Joelson Dantas, Juliana de Carvalho, Oto Schönholzer, Tatiele Schönholzer, Lucas Gabriel Venturini, Renato Henrique Ferreira, Rosa Jacinto Volpato e Thamires Ballarini Gratão.**

A **Aline Zanatta**, por todo carinho e paciência demonstrados durante todo esse período.

À toda a equipe do Escritório de Apoio à Pesquisa (EAP) da Faculdade de Medicina, especialmente ao **Prof. Dr. José Eduardo Corrente**, pelo auxílio no cálculo do delineamento experimental e nas análises estatísticas do estudo.

Ao Programa de Pós-graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia e Faculdade de Medicina de Botucatu, pela oportunidade de realizar o experimento, realizar a dissertação e utilizar a estrutura da Instituição como um todo para minha formação.

Aos funcionários da Seção de Pós-graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu, em particular à secretária do Programa de Pós-graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia, **Sra. Solange Sako.**

Aos funcionários da biblioteca da UNESP, em especial à **Sra. Rosimeire Aparecida Vicente (Rose) e Sra. Rosângela Aparecida Lobo**, pela confecção da ficha catalográfica.

Aos assistentes de suporte acadêmico (ASA) da Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX) da Faculdade de Medicina de Botucatu, especialmente aos **Srs. Danilo Chaguri, Carlos Roberto Gonçalves de Lima, José Márcio Cândido (Ari) e Jurandir Antonio**, pela manutenção dos biotérios, limpeza e cuidados com os animais.

Aos colegas do Laboratório de Pesquisa Experimental de Ginecologia e Obstetrícia **Carolina Abreu Miranda, Prof. Dr. Gustavo Tadeu Volpato, Franciane Quintanilha Gallego, Rafael Bottaro Gelaleti e Verônyca Gonçalves Paula** pela amizade, boa convivência e por toda a ajuda durante esses dois anos de mestrado.

A **Dra. Yuri Karen Sinzato** por todos os ensinamentos, paciência e também pelas críticas e broncas durante esses dois anos. Sem dúvidas você tem sido muito importante para a minha formação científica.

Aos participantes da banca de qualificação e de defesa da dissertação, **Profa Dra. Luciana Francisco Fleuri, Prof. Dr. Tiago Rodrigues e Prof. Dr. Kleber Eduardo Campos** pela disponibilidade, críticas e sugestões.

A minha orientadora, **Profa. Dra. Débora Cristina Damasceno**, primeiramente pela confiança, mas também por toda paciência, pelos inúmeros ensinamentos e exemplo diário na liderança e condução de um grupo de pesquisa sério e comprometido. Muito obrigado por toda a valiosa e continua contribuição para a minha formação profissional e pessoal.

À CAPES pela concessão da bolsa, permitindo total dedicação a execução desse estudo.

Aos animais, que involuntariamente participaram desse estudo em prol da ciência.

EFICÁCIA DO TRATAMENTO COM VITAMINA D E CÁLCIO SOBRE O CONTROLE GLICÊMICO E METABÓLICO, ESTRESSE OXIDATIVO E PERFORMANCE REPRODUTIVA DE RATAS PRENHES DIABÉTICAS

Kloppel E¹, Sinzato Y¹, Rodrigues T³, Bueno A¹, Volpato GT^{1,2}, Damasceno DC^{1*}

¹Laboratório de Pesquisa Experimental em Ginecologia e Obstetrícia, Programa de Pós-graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil.

²Laboratório de Fisiologia e Toxicologia Reprodutiva, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT), Barra do Garças, Estado do Mato Grosso, Brasil.

³Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC (UFABC), Santo André, Estado de São Paulo, Brasil.

***Correspondence to:** Profa. Dra. Débora Cristina Damasceno
Departamento de Ginecologia e Obstetrícia
Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP
Distrito de Rubião Júnior, s/n
CEP. 18618-970 Botucatu, São Paulo, Brasil
Fone/Fax: (55 14) 38801630
Email: damascenofmb@gmail.com

Esta dissertação foi apresentada na forma de artigo para ser submetido à publicação em periódico internacional.

RESUMO

Diabetes mellitus gestacional (DMG) aumenta o risco de complicações obstétricas, morbidade e mortalidade infantil. Os recém-nascidos podem apresentar macrosomia e, a longo prazo, alterações metabólicas. Além da insulina e de drogas hipoglicemiantes, os portadores de diabetes. Entretanto, o efeito da suplementação com vitaminas e minerais durante a gestação diabética não está bem descrito. Sendo assim, pretendemos analisar os efeitos da administração da vitamina D e de cálcio (Ca^{2+}) de forma associada (mistura) e isolada durante a prenhez de ratas com diabetes. Para isso, ratas recém-nascidas receberam a droga beta-citotóxica (*streptozotocin*) para indução do diabetes no dia do nascimento. Na vida adulta, essas ratas foram acasaladas e tratadas com vitamina D e/ou Ca^{2+} duas vezes por dia desde a confirmação da prenhez (dia 0) até o 20º dia de prenhez. No 17º dia, as ratas prenhes foram submetidas ao teste oral de tolerância à glicose (TOTG) e, ao final da prenhez, foram anestesiadas e mortas para coleta de amostras de sangue e de fígado para avaliação do estado redox. Além disso, foi realizada a exposição dos cornos uterinos visando analisar o desempenho reprodutivo materno e o desenvolvimento embriofetal. As ratas diabéticas tratadas com a mistura apresentaram redução dos níveis glicêmicos nos tempos do TOTG, diminuição da concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e aumento nas porcentagens de recém-nascidos classificados como adequados para a idade de prenhez (AIP). Após análise de cada componente, testados isoladamente, foi verificado que a vitamina D também diminuiu os níveis glicêmicos no TOTG e TBARS, melhorou o desempenho reprodutivo materno e aumentou a taxa de fetos AIP. Entretanto, após o tratamento com Ca^{2+} , as ratas diabéticas não tiveram efeitos benéficos. A comparação entre o tratamento isolado com vitamina D e a mistura mostrou melhores resultados no controle glicêmico nas ratas diabéticas tratadas com a vitamina D isolada. Sendo assim, nossos resultados indicam um potencial efeito benéfico do uso da vitamina D em relação à hiperglicemia, estresse oxidativo e repercussões maternas e fetais, a fim de auxiliar o tratamento do diabetes durante a gestação.

Palavras-chave: diabetes, ratas, prenhez, vitamina D, cálcio, estresse oxidativo.

SUMÁRIO

DESTAQUES.....	9
INTRODUÇÃO	10
MATERIAIS E MÉTODO	12
RESULTADOS	22
DISCUSSÃO	33
AGRADECIMENTOS	36
DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSE.....	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
ANEXOS 1 e 2.....	43

DESTAQUES

- A vitamina D melhorou a tolerância à glicose e reduziu a lipoperoxidação em ratas diabéticas.
- A vitamina D diminuiu as taxas de perdas embrionárias e fetais em ratas diabéticas.
- O Ca^{2+} isolado ou associado à vitamina D prejudicou a *performance* reprodutiva materna de ratas saudáveis.
- A vitamina D foi a responsável pelos resultados benéficos observados no organismo materno e no crescimento fetal.

INTRODUÇÃO

Diabetes mellitus (DM) é considerado um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos caracterizado por hiperglicemia, resultante da deficiência na síntese e/ou secreção de insulina pelas células beta (β)-pancreáticas, resistência à ação da insulina ou ambos. DM pode ser classificado como: *Diabetes mellitus* tipo 1 (DM1), *Diabetes mellitus* tipo 2 (DM2) e *Diabetes mellitus* gestacional (DMG) [1]. DM afeta cerca de 400 milhões de pessoas (7% da população mundial), dos quais 70% vivem em países com renda baixa e média [2,3].

Além da insulina e das drogas hipoglicemiantes empregadas como terapias farmacológicas para o tratamento do diabetes, a nutrição controlada também é recomendada para pacientes diabéticos [4]. Entretanto, o efeito da suplementação com determinadas vitaminas e minerais durante a gravidez complicada pelo DMG ainda está sob investigação. A vitamina D é obtida principalmente pela exposição da pele à radiação solar ultravioleta B (UVB), o 7-deidrocolesterol (7-DHC), molécula derivada do colesterol localizada nas membranas celulares de camadas profundas da epiderme é convertido em colecalciferol (vitamina D3). Há evidências de que o cálcio (Ca^{2+}) e a vitamina D podem apresentar excelentes efeitos positivos no metabolismo da glicose e no controle metabólico durante a gestação [5–7] por estarem envolvidos no processo de secreção de insulina, o qual envolve a ação direta nas células β do pâncreas [8,9] e por apresentar papel protetor frente a condição de estresse oxidativo [10,11]. Entretanto, a deficiência desses micronutrientes pode alterar a função secretória das células β -pancreáticas, prejudicando a ação da insulina [12]. Essa deficiência também está relacionada à diminuição da fertilidade [13], piora do crescimento fetal e riscos aumentados do surgimento de DMG [14]. Esses prejuízos à saúde se correlacionam com os níveis baixos de vitamina D encontrados em pacientes com DMG [15].

Tendo em vista que a literatura aponta que os mecanismos epigenéticos, fatores nutricionais e estilo de vida sedentário afetam os riscos de complicações diabéticas de maneira diferente para os sexos masculino e feminino [16], há necessidade de mais pesquisas sobre os mecanismos fisiopatológicos do DM e as diferentes respostas existentes entre machos e fêmeas, contribuindo para um tratamento mais personalizado de forma sexo-específico. Devido a questões éticas envolvendo estudos em humanos, procedimentos invasivos e diversas variáveis não controláveis que alteram o ambiente intrauterino durante a investigação [17], modelos animais são utilizados para identificar os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na síndrome diabética durante a prenhez e em sua prole. A fim de desenvolver modelos com animais de laboratório para simular a condição diabética, diferentes metodologias são empregadas, dentre

elas o uso de agentes β -citotóxicos (aloxana e *streptozotocin*) [18]. Visando reproduzir as glicemias do DM2 e/ou DMG humanos, modelos experimentais de diabetes são desenvolvidos. Para isso, existem estudos que utilizam diferentes doses do agente β -citotóxico, vias de administração e períodos de vida do animal [19–24]. Em nosso laboratório, para esta indução, as ratas recebem a dose de 100 miligramas (mg) de *streptozotocin* por quilograma (kg) de peso corpóreo, a qual é administrada no primeiro dia de vida dos animais [25–29]. Na vida adulta, ao final da prenhez, essas ratas apresentam intolerância à glicose, estresse oxidativo [26,27], número reduzido de fetos vivos, aumento nas taxas de perdas embrionárias e redução na área de trocas materno-fetais na placenta [29].

Desta forma, frente ao exposto, a **hipótese** deste estudo é que a mistura de vitamina D e de Ca^{2+} contribuirá para reduzir as complicações maternas advindas do diabetes, melhorando as repercussões materno-fetais. Além disso, ao testarmos os componentes da mistura de forma isolada, hipotetizamos que o tratamento materno com vitamina D apresentará resultados benéficos de forma mais significativa que o de Ca^{2+} tanto para o organismo materno quanto para o crescimento fetal. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar se o tratamento com a mistura de vitamina D (colecalfiferol) e/ou Ca^{2+} influencia na tolerância à glicose, peroxidação lipídica e no desempenho reprodutivo materno de ratas com diabetes, além do crescimento fetal dessa prole. Foi analisado também de forma individualizada qual o constituinte da mistura apresenta maior benefício, visando compreender melhor os mecanismos envolvidos nesses resultados positivos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] American Diabetes Association, Classification and diagnosis of diabetes, *Diabetes Care*. 40 (2017) S11–S24. doi:10.2337/dc17-S005.
- [2] American Diabetes Association, 4. Lifestyle Management., *Diabetes Care*. 40 (2017) S33–S43. doi:10.2337/dc17-S007.
- [3] IDF, *IDF Diabetes Atlas*, International Diabetes Federation. (2015) 1–163. doi:10.1289/image.ehp.v119.i03.
- [4] D.C. Volume, Standards of Medical Care in Diabetes—2017 : Summary of Revisions, *Diabetes Care*. 40 (2017) S4–S5. doi:10.2337/dc17-S003.
- [5] Z. Asemi, M. Karamali, A. Esmailzadeh, Effects of calcium-vitamin D co-supplementation on glycaemic control, inflammation and oxidative stress in gestational diabetes: A randomised placebo-controlled trial, *Diabetologia*. 57 (2014) 1798–1806. doi:10.1007/s00125-014-3293-x.
- [6] M. Karamali, Z. Asemi, M. Ahmadi-Dastjerdi, A. Esmailzadeh, Calcium plus Vitamin D supplementation affects pregnancy outcomes in gestational diabetes: Randomized, double-blind, placebo-controlled trial, *Public Health Nutrition*. 19 (2016) 156–163. doi:10.1017/S1368980015000609.
- [7] Q. Zhang, Y. Cheng, M. He, T. Li, Z. Ma, H. Cheng, Effect of various doses of vitamin D supplementation on pregnant women with gestational diabetes mellitus: A randomized controlled trial, *Experimental and Therapeutic Medicine*. 12 (2016) 1889–1895. doi:10.3892/etm.2016.3515.
- [8] C.J. Rosen, J.S. Adams, D.D. Bikle, D.M. Black, M.B. Demay, J.A.E. Manson, M.H. Murad, C.S. Kovacs, The nonskeletal effects of vitamin D: An endocrine society scientific statement, *Endocrine Reviews*. 33 (2012) 456–492. doi:10.1210/er.2012-1000.
- [9] P.M. Boulton, A. Faure-Dussert, B. Billaudel, Modulatory role of 1,25 dihydroxyvitamin D3 on pancreatic islet insulin release via the cyclic AMP pathway in the rat, *British Journal of Pharmacology*. 121 (1997) 751–758. doi:10.1038/sj.bjp.0701204.
- [10] M. Bhat, A. Ismail, Vitamin D treatment protects against and reverses oxidative stress induced muscle proteolysis, *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 152 (2015) 171–179. doi:10.1016/j.jsbmb.2015.05.012.
- [11] F. Foroozand, M. Jamilian, F. Bahmani, R. Talaei, N. Talaei, T. Hashemi, K. Nasri, Z. Asemi, A. Esmailzadeh, Calcium plus vitamin D supplementation influences biomarkers of inflammation and oxidative stress in overweight and vitamin D-deficient women with polycystic ovary syndrome: a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial, *Clinical Endocrinology*. 83 (2015) 888–894. doi:10.1111/cen.12840.
- [12] K.A. Al-Shoumer, T.M. Al-Essa, Is there a relationship between vitamin D with insulin resistance and diabetes mellitus?, *World Journal of Diabetes*. 6 (2015) 1057–64. doi:10.4239/wjd.v6.i8.1057.
- [13] A. Nandi, N. Sinha, E. Ong, H. Sonmez, L. Poretsky, Is there a role for vitamin D in human reproduction?, *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*. 25 (2016) 15–28. doi:10.1515/hmbci-2015-0051.
- [14] S.-Q. Wei, H.-P. Qi, Z.-C. Luo, W.D. Fraser, Maternal vitamin D status and adverse pregnancy outcomes: a systematic review and meta-analysis, *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal*

- Medicine. 26 (2013) 889–899. doi:10.3109/14767058.2013.765849.
- [15] S. Soheilykhah, M. Mojibian, M. Rashidi, S. Rahimi-Saghand, F. Jafari, Maternal Vitamin D Status in Gestational Diabetes Mellitus, *Nutrition in Clinical Practice*. 25 (2010) 524–527. doi:10.1177/0884533610379851.
 - [16] A. Kautzky-Willer, J. Harreiter, G. Pacini, Sex and Gender Differences in Risk, Pathophysiology and Complications of Type 2 Diabetes Mellitus., *Endocrine Reviews*. 37 (2016) 278–316. doi:10.1210/er.2015-1137.
 - [17] I. López-Soldado, E. Herrera, Different diabetogenic response to moderate doses of streptozotocin in pregnant rats, and its long-term consequences in the offspring, *Experimental Diabetes Research*. 4 (2003) 107–118. doi:10.1155/EDR.2003.107.
 - [18] D.T. Ward, S.K. Yau, A.P. Mee, E.B. Mawer, C.A. Miller, H.O. Garland, D. Riccardi, Functional, molecular, and biochemical characterization of streptozotocin-induced diabetes., *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*. 12 (2001) 779–790. <http://jasn.asnjournals.org/content/12/4/779.full.pdf> (accessed January 23, 2018).
 - [19] B. Portha, C. Levacher, L. Picon, G. Rosselin, Diabetogenic effect of streptozotocin in the rat during the perinatal period, *Diabetes*. 23 (1974) 889–895. doi:10.2337/diab.23.11.889.
 - [20] K. Tsuji, T. Taminato, M. Usami, H. Ishida, N. Kitano, H. Fukumoto, G. Koh, T. Kurose, Y. Yamada, H. Yano, Y. Seino, H. Imura, Characteristic features of insulin secretion in the streptozotocin-induced NIDDM rat model, *Metabolism*. 37 (1988) 1040–1044. doi:10.1016/0026-0495(88)90064-9.
 - [21] H. MERZOUK, S. MADANI, D. CHABANE SARI, J. PROST, M. BOUCHENAK, J. BELLEVILLE, Time course of changes in serum glucose, insulin, lipids and tissue lipase activities in macrosomic offspring of rats with streptozotocin-induced diabetes, *Clinical Science*. 98 (2000) 21. doi:10.1042/CS19990109.
 - [22] Y.K. Sinzato, P.H.O. Lima, K.E. de Campos, A.C.I. Kiss, M.V.C. Rudge, D.C. Damasceno, Neonatally-induced diabetes: lipid profile outcomes and oxidative stress status in adult rats., *Revista Da Associação Médica Brasileira* (1992). 55 (2009) 384–8. doi:10.1590/S0104-42302009000400010.
 - [23] A. Jawerbaum, V. White, Animal models in diabetes and pregnancy, *Endocrine Reviews*. 31 (2010) 680–701. doi:10.1210/er.2009-0038.
 - [24] D.C. Damasceno, A.C.I. Kiss, Y.K. Sinzato, K.E. De Campos, M.V.C. Rudge, I.M.P. Calderon, G.T. Volpato, Maternal-fetal outcome, lipid profile and oxidative stress of diabetic rats neonatally exposed to streptozotocin, *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes*. 119 (2011) 408–413. doi:10.1055/s-0030-1269886.
 - [25] D.C. Damasceno, Y.K. Sinzato, A. Bueno, A.O. Netto, B. Dallaqua, F.Q. Gallego, I.L. Iessi, S.B. Corvino, R.G. Serrano, G. Marini, F. Piculo, I.M.P. Calderon, M.V.C. Rudge, Mild diabetes models and their maternal-fetal repercussions, *Journal of Diabetes Research*. 2013 (2013) 473575. doi:10.1155/2013/473575.
 - [26] B. Dallaqua, F.H. Saito, T. Rodrigues, I.M.P. Calderon, M.V.C. Rudge, E. Herrera, D.C. Damasceno, Treatment with *Azadirachta indica* in diabetic pregnant rats: Negative effects on maternal outcome, *Journal of Ethnopharmacology*. 143 (2012) 805–811. doi:10.1016/j.jep.2012.07.023.
 - [27] B. Dallaqua, F.H. Saito, T. Rodrigues, I.M.P. Calderon, M.V.C. Rudge, G.T. Volpato, D.C. Damasceno, *Azadirachta indica* treatment on the congenital malformations of fetuses from rats,

- Journal of Ethnopharmacology. 150 (2013) 1109–1113. doi:10.1016/j.jep.2013.10.046.
- [28] P.H. Lima, Y. Sinzato, R. Gelaleti, I.M. Calderon, M.V. Rudge, D. Damasceno, Genotoxicity Evaluation in Severe or Mild Diabetic Pregnancy in Laboratory Animals, *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*. 120 (2012) 303–307. doi:10.1055/s-0031-1299766.
 - [29] Y.K. Sinzato, G.T. Volpato, I.L. Iessi, A. Bueno, I. de M.P. Calderon, M.V.C. Rudge, D.C. Damasceno, Neonatally induced mild diabetes in rats and its effect on maternal, placental, and fetal parameters, *Experimental Diabetes Research*. 2012 (2012) 108163. doi:10.1155/2012/108163.
 - [30] T.M.M. Santos, Y.K. Sinzato, F.Q. Gallego, I.L. Iessi, G.T. Volpato, B. Dallaqua, D.C. Damasceno, Extracellular HSP70 levels in diabetic environment in rats, *Cell Stress and Chaperones*. 20 (2015) 595–603. doi:10.1007/s12192-015-0581-4.
 - [31] F.J.R. Damasceno, D. C., Kempinas, W. G., Volpato, G. T., Consoni, M., Rudge, M. V. C., & Paumgarten, *Anomalias congênitas: estudos experimentais*, Belo Horizonte: Coopmed. (2008).
 - [32] M.M. Tai, A mathematical model for the determination of total area under glucose tolerance and other metabolic curves, *Diabetes Care*. 17 (1994) 152–154. doi:10.2337/diacare.17.2.152.
 - [33] N.A. Soulimane-Mokhtari, B. Guermouche, A. Yessoufou, M. Saker, K. Moutairou, A. Hichami, H. Merzouk, N.A. Khan, Modulation of lipid metabolism by n –3 polyunsaturated fatty acids in gestational diabetic rats and their macrosomic offspring, *Clinical Science*. 109 (2005) 287–295. doi:10.1042/CS20050028.
 - [34] M.D.S.S. De Souza, Y.K. Sinzato, P.H.O. Lima, I.M.P. Calderon, M.V.C. Rudge, D.C. Damasceno, Oxidative stress status and lipid profiles of diabetic pregnant rats exposed to cigarette smoke, *Reproductive BioMedicine Online*. 20 (2010) 547–552. doi:10.1016/j.rbmo.2010.01.002.
 - [35] L. Bequer, T. Gómez, J.L. Molina, A. Álvarez, C. Chaviano, S. Clapés, Experimental diabetes impairs maternal reproductive performance in pregnant Wistar rats and their offspring, *Systems Biology in Reproductive Medicine*. (2017) 1–11. doi:10.1080/19396368.2017.1395928.
 - [36] A.C.I. Kiss, B. Woodside, Y.K. Sinzato, M.M. Bernardi, W. De Grava Kempinas, J.A. Anselmo-Franci, D.C. Damasceno, Neonatally induced mild diabetes: influence on development, behavior and reproductive function of female Wistar rats., *Diabetology & Metabolic Syndrome*. 5 (2013) 61. doi:10.1186/1758-5996-5-61.
 - [37] M. Lane, B.D. Bavister, Calcium homeostasis in early hamster preimplantation embryos., *Biology of Reproduction*. 59 (1998) 1000–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9746754> (accessed April 18, 2018).
 - [38] C. Cade, A.W. Norman, Vitamin d3 improves impaired glucose tolerance and insulin secretion in the vitamin d-deficient rat in vivo, *Endocrinology*. 119 (1986) 84–90. doi:10.1210/endo-119-1-84.
 - [39] S. Lee, A. Clark, 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and Pancreatic beta-Cell Function: Vitamin D Receptors, Gene Expression, Insulin Secretion, *Endocrinology*. 134 (1994) 1602–1610. doi:10.1210/endo.134.4.8137721.
 - [40] J.A. Johnson, J.P. Grande, P.C. Roche, R. Kumar, Immunohistochemical localization of the 1,25(OH)2D3 receptor and calbindin D28k in human and rat pancreas., *The American Journal of Physiology*. 267 (1994) E356-60. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7943215> (accessed November 17, 2017).
 - [41] A. Lahbib, S. Ghodbane, K. Louchami, A. Sener, M. Sakly, H. Abdelmelek, Effects of vitamin

- D on insulin secretion and glucose transporter GLUT2 under static magnetic field in rat, *Environmental Science and Pollution Research*. 22 (2015) 18011–18016. doi:10.1007/s11356-015-4844-5.
- [42] A. Norman, J. Frankel, A. Heldt, G. Grodsky, Vitamin D deficiency inhibits pancreatic secretion of insulin, *Science*. 209 (1980) 823–825. doi:10.1126/science.6250216.
- [43] S. Jayanarayanan, T.R. Anju, S. Smijin, C.S. Paulose, ScienceDirect Vitamin D 3 supplementation increases insulin level by regulating altered IP3 and AMPA receptor expression in the pancreatic islets of streptozotocin-induced diabetic rat, *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 26 (2015) 1041–1049. doi:10.1016/j.jnutbio.2015.04.011.
- [44] I.N. Sergeev, 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and type 2 diabetes: Ca²⁺-dependent molecular mechanisms and the role of vitamin D status, *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*. 26 (2016) 61–65. doi:10.1515/hmbci-2015-0069.
- [45] B. Maestro, J. Campion, N. Davila, C. Calle, Stimulation by 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 of Insulin Receptor Expression and Insulin Responsiveness for Glucose Transport in U-937 Human Promonocytic Cells, *Endocrine Journal*. 47 (2000) 383–391. https://www.jstage.jst.go.jp/article/endocrj1993/47/4/47_4_383/_pdf (accessed November 17, 2017).
- [46] S. Xavier, J. Sadanandan, N. George, C.S. Paulose, β 2-Adrenoceptor and insulin receptor expression in the skeletal muscle of streptozotocin induced diabetic rats: Antagonism by vitamin D3 and curcumin, *European Journal of Pharmacology*. 687 (2012) 14–20. doi:10.1016/J.EJPHAR.2012.02.050.
- [47] Y. Wang, H.F. DeLuca, Is the vitamin D receptor found in muscle?, *Endocrinology*. 152 (2011) 354–363. doi:10.1210/en.2010-1109.
- [48] Y. Wang, J. Zhu, H.F. DeLuca, Where is the vitamin D receptor?, *Arch Biochem Biophys*. 523 (2012) 123–133. doi:10.1016/j.abb.2012.04.001.
- [49] G. Davì, A. Falco, C. Patrono, Lipid Peroxidation in Diabetes Mellitus, *Antioxidants & Redox Signaling*. 7 (2005) 256–268. doi:10.1089/ars.2005.7.256.
- [50] H. Wiseman, Vitamin D is a membrane antioxidant. Ability to inhibit iron-dependent lipid peroxidation in liposomes compared to cholesterol, ergosterol and tamoxifen and relevance to anticancer action., *FEBS Letters*. 326 (1993) 285–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8325381> (accessed April 18, 2018).
- [51] M. Gauster, G. Desoye, M. Tötsch, U. Hiden, The Placenta and Gestational Diabetes Mellitus, *Current Diabetes Reports*. 12 (2012) 16–23. doi:10.1007/s11892-011-0244-5.
- [52] M. del C. Figueroa-García, M.T. Espinosa-García, F. Martinez-Montes, M. Palomar-Morales, R. Mejía-Zepeda, Even a Chronic Mild Hyperglycemia Affects Membrane Fluidity and Lipoperoxidation in Placental Mitochondria in Wistar Rats., *PloS One*. 10 (2015) e0143778. doi:10.1371/journal.pone.0143778.
- [53] E. Capobianco, D. Fornes, I. Linenberg, T.L. Powell, T. Jansson, A. Jawerbaum, A novel rat model of gestational diabetes induced by intrauterine programming is associated with alterations in placental signaling and fetal overgrowth, *Molecular and Cellular Endocrinology*. 422 (2016) 221–232. doi:10.1016/j.mce.2015.12.020.
- [54] M. Shahbazi, M. Jeddi-Tehrani, M. Zareie, A. Salek-Moghaddam, M.M. Akhondi, M. Bahmanpoor, M.R. Sadeghi, A.H. Zarnani, Expression profiling of vitamin D receptor in placenta, decidua and ovary of pregnant mice, *Placenta*. 32 (2011) 657–664.

doi:10.1016/j.placenta.2011.06.013.

- [55] J. Knabl, R. Hüttenbrenner, S. Hutter, M. Günthner-Biller, C. Riedel, U. Hiden, F. Kainer, G. Desoye, U. Jeschke, Gestational Diabetes Mellitus Upregulates Vitamin D Receptor in Extravillous Trophoblasts and Fetoplacental Endothelial Cells, *Reproductive Sciences*. 22 (2015) 358–366. doi:10.1177/1933719114542020.
- [56] J. Knabl, A. Vattai, Y. Ye, J. Jueckstock, S. Hutter, F. Kainer, S. Mahner, U. Jeschke, Role of placental VDR expression and function in common late pregnancy disorders, *International Journal of Molecular Sciences*. 18 (2017) 2340. doi:10.3390/ijms18112340.
- [57] A. Stephanou, R. Ross, S. Handwerger, Regulation of human placental lactogen expression by 1,25-dihydroxyvitamin D₃, *Endocrinology*. 135 (1994) 2651–2656. doi:10.1210/endo.135.6.7988455.
- [58] T.C. Brelje, D.W. Scharp, P.E. Lacy, L. Ogren, F. Talamantes, M. Robertson, H.G. Friesen, R.L. Sorenson, Effect of homologous placental lactogens, prolactins, and growth hormones on islet B-cell division and insulin secretion in rat, mouse, and human islets: implication for placental lactogen regulation of islet function during pregnancy., *Endocrinology*. 132 (1993) 879–887. doi:10.1210/endo.132.2.8425500.
- [59] M.C. Lacroix, P. Bolifraud, D. Durieux, A. Pauloin, M. Vidaud, G. Kann, Placental growth hormone and lactogen production by perfused ovine placental explants: regulation by growth hormone-releasing hormone and glucose., *Biology of Reproduction*. 66 (2002) 555–61. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11870057> (accessed April 18, 2018).