

Thiago Martins Batista

**Mecanismos funcionais e moleculares envolvidos no
desenvolvimento de resistência a insulina em
camundongos desnutridos submetidos à obesidade
experimental**

CAMPINAS, 2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

Thiago Martins Batista

**Mecanismos funcionais e moleculares envolvidos no
desenvolvimento de resistência a insulina em
camundongos desnutridos submetidos à obesidade
experimental**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Thiago Martins Batista
[Assinatura]
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao
Instituto de Biologia para
obtenção do Título de
Doutor em Biologia
Funcional e Molecular, na
área de Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Everardo Magalhaes Carneiro

CAMPINAS, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

B32m

Batista, Thiago Martins, 1984-
Mecanismos moleculares envolvidos no
desenvolvimento de resistência à insulina em
camundongos desnutridos submetidos à obesidade
experimental / Thiago Martins Batista. – Campinas, SP:
[s.n.], 2012.

Orientador: Everardo Magalhães Carneiro.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Desnutrição. 2. Obesidade. 3. Insulina –
Resistência. 4. Taurina. I. Carneiro, Everardo
Magalhães, 1955-. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Molecular mechanisms involved in the development of insulin resistance in malnutrition mice submitted to experimental obesity

Palavras-chave em Inglês:

Malnutrition

Obesity

Insulin – Resistance

Taurine

Área de concentração: Fisiologia

Titulação: Doutor em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Everardo Magalhães Carneiro [Orientador]

Fernando Rodrigues de Moraes Abdulkader

Márcio Alberto Torsoni

Lício Augusto Velloso

Angel Nadal

Data da defesa: 21-11-2012

Programa de Pós Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 21 de novembro de 2012

BANCA EXAMINADORA

Membros Titulares

Prof. Dr. Everardo Magalhaes Carneiro
(Orientador)



Assinatura

Prof. Dr. Fernando Rodrigues de Moraes Abdulkader



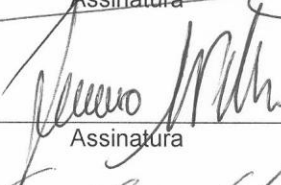
Assinatura

Prof. Dr. Marcio Alberto Torsoni



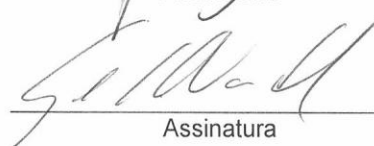
Assinatura

Prof. Dr. Licio Augusto Velloso



Assinatura

Prof. Dr. Angel Nadal Navajas



Assinatura

Profa. Dra. Eliana Pereira de Araujo



Assinatura

Profa. Dra. Silvana Auxiliadora Bordin da Silva



Assinatura

Prof. Dr. Gabriel Forato Anhe



Assinatura

“Life’s too short to cry, long enough to try”

(Kai Hansen)

Agradecimentos

Primeiramente aos meus pais e demais membros da família que sempre me apoiaram e acreditaram que eu conseguiria chegar até aqui. Mãe, Pai, Popi, Lucianinha, Angela, Andersão, muitíssimo obrigado pela contribuição de vocês!

Ao professor Everardo Magalhães Carneiro por ter aberto as portas de seu laboratório e ter permitido minha formação ao longo desses 6 (seis) anos sob sua orientação. Agradeço pelo privilégio de integrar seu grupo de pesquisa, bem como pela confiança na elaboração e execução dos projetos. Em seu grupo tive a oportunidade de obter uma formação completa participando de praticamente todas as etapas que compõem a complexa carreira de pesquisador.

Ao professor Antônio Carlos Boschero por ter sido um exemplo de dedicação na busca do conhecimento e por ter contribuído com sua sabedoria e experiência em nossos trabalhos e projetos deixando-os mais simples e ao mesmo tempo mais completos.

Aos professores Ivan Quesada e Angel Nadal e todo seu grupo da Universidade Miguel Hernández de Elche – Espanha - pela incrível receptividade durante minha estada em seu laboratório e pela oportunidade de colaborar em seus projetos.

À professora e grande amiga Rosane Aparecida Ribeiro por sua constante contribuição para o direcionamento de nossos projetos e pelos sábios conselhos em momentos de dúvida.

Aos demais companheiros que contribuíram pessoal e profissionalmente e viabilizaram a execução desse projeto: Priscilla, Rafael, Pablo, Junia, Jean e mais recentemente, Renato.

Ao professor Jaime Amaya-Farfán e todo o grupo do Laboratório de Fontes Protéicas da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp que mostraram o quanto proveitosa pode ser a cooperação entre laboratórios.

À bióloga Marise Carnelossi Brunelli pela inestimável ajuda na aquisição de reagentes e sua contribuição fundamental para o melhor andamento de nosso grupo.

À FAPESP pela concessão da bolsa de estudos e por seu apoio nos demais projetos do laboratório.

Sumário

Lista de abreviaturas.....	x
Lista de figuras	xiii
Lista de tabelas.....	xvi
Resumo	xvii
Abstract	xviii
1.Introdução.....	1
1.1 Secreção de insulina.....	2
1.2 Desnutrição, Obesidade e Diabetes	3
1.3 Resistência hepática a insulina e homeostase glicêmica	5
1.4 Taurina.....	7
2.Objetivos.....	9
3. Artigo 1	11
TAURINE SUPPLEMENTATION IMPROVES LIVER GLUCOSE CONTROL IN NORMAL PROTEIN AND MALNOURISHED MICE FED A HIGH-FAT DIET	12
3.1. Abstract.....	14
3.2. Introduction	15
3.3. Materials and methods.....	16
3.3.1. Animals and diets	16
3.3.2. General nutritional parameters	16
3.3.3. Plasma amino acid profile.....	17
3.3.4. Liver glycogen quantification.....	17
3.3.5. Intraperitoneal glucose (ipGTT), insulin (ipITT), glucagon (ipGITT) and pyruvate (ipPTT) tolerance tests.....	18
3.3.6. Western blot	19

3.3.7. Statistical analysis	20
3.4. Results.....	20
3.4.1. Effects of diet and TAU treatment upon mice characteristics	20
3.4.2. Glucose homeostasis	22
3.4.3. Akt and AMPK phosphorylation in the liver	23
3.4.4. Plasma amino acid profile.....	24
3.5. Discussion	24
3.6. Acknowledgements	29
3.7. Conflict of interest	29
3.8. Author contributions	29
3.9. References.....	29
4.Artigo 2	49
MORFOLOGIA DO PÂNCREAS ENDÓCRINO E REGULAÇÃO DA SECREÇÃO DE INSULINA EM CAMUNDONGOS DESNUTRIDOS ALIMENTADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA E SUPLEMENTADOS COM TAURINA	50
4.1. Introdução.....	51
4.2. Materiais e métodos.....	52
4.2.1. Animais e dietas:	52
4.2.2. Histologia do pâncreas, imunohistoquímica para insulina e morfometria.....	53
4.2.3. Isolamento de ilhotas pancreáticas de camundongos.....	54
4.2.4. Fragmentação de DNA	55
4.2.5. Secreção estática de insulina	55
4.2.6. Registro do cálcio citoplasmático em ilhotas pancreáticas.....	55
4.2.7. Western blot	56
4.2.8. Interleucina (IL)-6 plasmática.....	57
4.2.9. Análise dos resultados.....	57
4.3. Resultados.....	57

4.3.1	Peso e composição corporal.....	57
4.3.2.	Avaliação morfológica do pâncreas endócrino	58
4.3.3.	Fragmentação e conteúdo total de DNA	58
4.3.4.	Expressão da PCNA em ilhotas pancreáticas.....	58
4.3.5.	Secreção e conteúdo de insulina em ilhotas isoladas	58
4.3.6.	Oscilações de Ca^{2+} citoplasmático em ilhotas isoladas.....	59
4.3.7.	Fosforilação e expressão da Akt e ERK1/2 em ilhotas pancreáticas.....	59
4.3.8.	Fosforilação da Stat 3 e IL-6 plasmática	60
4.4.	Discussão	69
4.5.	Conclusões	74
5.	Considerações finais.....	75
6.	Referências bibliográficas	78
7.	Anexos.....	85

Lista de abreviaturas

AICAR - *5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside*

AIN – instituto americano de nutrição

Akt – proteína homóloga ao oncogene do timoma viral

AMP – monofosfato de adenosina

AMPC – AMP cíclico

AMPK – proteína quinase ativada por AMP

ANOVA – análise de variância

ATP – trifosfato de adenosina

AUC – *area under curve*

BCAA – *branched-chain keto acids*

BCATm - *mitochondrial branched chain amino acid aminotransferase*

BCKD - *branched chain α -keto acid dehydrogenase*

BW – *body weight*

Cav – canal de Ca^{2+} sensível à voltagem

CHOL - *cholesterol*

CREB - proteína que se liga ao elemento responsivo ao AMPC

DM2 – diabetes mellitus tipo 2

DMSO – dimetil sulfóxido

DNA – ácido desoxirribonucleico

ERK_{1/2} - proteína quinase regulada por sinais extracelulares

G-6-Pase – Glicose-6 fosfatase

GCK – glicoquinase

GIP - peptídeo insulínico dependente de glicose

GLP-1 – *glucagon-like peptide 1*

GLUT2 – transportador de glicose 2

GLUT4 – transportador de glicose 4

GITT – teste de tolerância ao glucagon

GSK-3 - *glycogen synthase kinase 3*

GTT – teste de tolerância a glicose

HFD – *high fat diet*

IFN- γ – interferon γ

IGF-II – fator de crescimento semelhante a insulina II

IL-1 β – interleucina 1 β

IL-6 – interleucina 6

IR – receptor de insulina

IRS-1 – substrato 1 do receptor de insulina

ITT – Teste de tolerância a insulina

K_{ATP} – canal de K⁺ sensível ao ATP

LKB1 – *liver kinase B1*

L-NAME - *L-NG-Nitroarginine methyl ester*

mTOR – alvo da rapamicina em mamíferos

NEFA – non-sterified fatty acid

NO – nitric oxide

NOD – não-obeso diabético

NOS – nitric oxide synthase

OLETF - *Otsuka Long-Evans Tokushima fatty*

ONOO⁻ - peroxynitrite

PCNA - antígeno nuclear de células em proliferação

PDX-1 – homeobox duodenal e pancreático

PEPCK - fosfoenolpiruvato carboxiquinase

PI3K – fosfatidil inositol 3-quinase

PKA – proteína quinase dependente de AMPc

PKC – proteína quinase C

PLC – fosfolipase C

PTT – teste de tolerância ao piruvato

S6K – quinase da proteína ribossomal S6

SERCA - Ca^{2+} -ATPase do retículo endoplasmático

SNAP – S-nitroso-N-penicillamine

SNAP-25 - Proteína sinaptossomal associada de 25kDa

Stat3 – *signal transducer and activator of transcription 3*

SUR1 – receptor de sulfoniluréia 1

TAU – taurine

TG – triglyceride

TNF- α – fator de necrose tumoral α

TORC2 - transducer of regulated CREB protein 2

T2DM – type 2 diabetes mellitus

Lista de figuras

Artigo 1

Figure 1. Taurine supplementation prevents obesity and hyperphagia in normal protein obese mice. Body weight (BW) of **(A)** C, CH, CHT and **(B)** R, RH, RHT mice registered for 14 weeks (n = 5). Arrows indicate the beginning of the HFD treatment. **(C)** Total BW expressed by the area under growth curve. **(D)** Calorie intake registered during the last week of experimental period (n = 5-7). Data are means $\pm$ SEM; * different from C (P < 0.05); # different from R (P < 0.05).

Figure 2. Taurine supplementation reduces adiposity and hyperleptinemia in normal protein obese mice. **(A)** Periepididymal and **(B)** retroperitoneal fat pads in C, CH, CHT, R, RH and RHT mice (n = 10-12). **(C)** Plasma leptin in fasted mice (n = 5-7). Data are means $\pm$ SEM; * different from C (P < 0.05); # different from R (P < 0.05). \$ different from CH (P < 0.05).

Figure 3. Taurine supplementation improves glucose but not insulin tolerance in normal protein obese mice. **(A)** Plasma glucose (n = 8-11) and **(B)** insulin (n = 6-10) levels in fasted C, CH, CHT, R, RH and RHT mice. Changes in blood glucose during **(C, D)** ipGTT (n = 8-11) and **(F, G)** ipITT (n = 7-8). Total plasma glucose concentrations during **(E)** ipGTT and **(H)** ipITT expressed by the AUC. Data are means $\pm$ SEM; * different from C (P < 0.05); # different from R (P < 0.05).

Figure 4. Taurine supplementation improves glucagon and pyruvate-induced liver glucose output in obese mice. Changes in plasma glucose levels during **(A, B)** ipGITT (n = 5-7) and **(D, E)** ipPTT (n = 7-12) in C, CH, CHT, R, RH and RHT mice. Total plasma glucose concentrations during **(C)** ipGITT and **(F)** ipPTT expressed by the AUC. **(G)** Liver glycogen content (n = 4). Data are means $\pm$ SEM; * different from C (P < 0.05); # different from R (P < 0.05).

Figure 5. Taurine supplementation enhances insulin signaling in normal protein and AMPK phosphorylation in malnourished obese mice. **(A)** p-Akt^{ser473}/Akt protein expression in the liver from insulin-stimulated (100 μ L; 10⁻⁶ M) C, CH, CHT, R, RH and RHT mice (n = 4-6). **(B)** p-AMPK^{thr172}/AMPK protein expression in the liver from fasted C, CH, CHT, R, RH and RHT mice (n = 9-10). **(C)** Plasma adiponectin (n = 7-8). Data are means $\pm$ SEM; * different from C (P < 0.05); # different from R (P < 0.05). \$ different from CH (P < 0.05).

Figure 6. Taurine supplementation increases arginine plasma levels. Plasma **(A)** TAU, **(B)** arginine, **(C)** leucine, **(D)** valine and **(E)** isoleucine in fasted C, CH, CHT, R, RH and RHT mice (n = 4). Data are means $\pm$ SEM; * different from C (P < 0.05); # different from R (P < 0.05). \$ different from CH (P < 0.05). & P < 0.05 vs RH.

Artigo 2

Figura 1. Análise morfométrica do pâncreas de camundongos **A)** C (n = 464 ilhotas), **B)** CH (n = 507), **C)** CHT (n = 574), **D)** R (n = 265), **E)** RH (n = 490) e **F)** RHT (n = 644). Após imonuhistoquímica para insulina, foram calculadas as **G)** área total das ilhotas, **H)** área de células β e **I)** área de células não- β . Valores representam média $\pm$ EPM; * P < 0,05 em relação a C (ANOVA de uma via e pós teste de Duncan).

Figura 2. **A)** conteúdo total de DNA por ilhota e **B)** porcentagem de fragmentação. Valores representam média $\pm$ EPM. * P < 0,05 em relação a C; # P < 0,05 em relação a R (ANOVA de uma via e pós teste de Duncan).

Figura 3. Expresão da PCNA em ilhotas pancreáticas de camundongos C, CH, CHT, R, RH e RHT. Os dados de PCNA foram normalizados pelo padrão de bandas obtido com o corante Ponceau-S. Valores representam média $\pm$ EPM, * P < 0,05 em relação a C, n = 4-6. (ANOVA de uma via e pós teste de Duncan).

Figura 4. **A)** Secreção estática de insulina de camundongos C, CH, CHT, R, RH e RHT. As ilhotas foram pré-incubadas em solução de Krebs contendo 5.6 mM de glicose durante 30 min. Após a retirada do líquido de pré-incubação, as ilhotas foram expostas à solução de Krebs contendo 2.8, 11.1 e 22.2 mM de glicose; n = 18 grupos de 4 ilhotas por condição **B)** Conteúdo total de insulina por ilhota; n = 18 grupos de 4 ilhotas. Valores representam média $\pm$ EPM. * P < 0,05 em relação a C; # P < 0,05 em relação a R (ANOVA de uma via e pós teste de Duncan).

Figura 5. Mudanças na razão de fluorescência para cálcio intracelular em ilhotas isoladas de camundongos **A)** C, **B)** CH, **C)** CHT, **D)** R, **E)** RH e **F)** RHT. Barras acima dos traços representativos indicam início da perfusão com 2.8 e 11.1 mM de glicose. **G)** frequência e **H)** amplitude das oscilações durante estímulo com glicose 11.1 mM. Valores representam média $\pm$ EPM, n = 6-7. * P < 0,05 em relação a C; # P < 0,05 em relação a R; (ANOVA de uma via e pós teste de Duncan).

Figura 6. Fosforilação da **A)** Akt (p-Akt^{thr308}) e **B)** ERK_{1/2} (p-ERK_{1/2}) em ilhotas pancreáticas de camundongos C, CH, CHT, R, RH e RHT. Os dados de p-Akt^{thr308} e p-ERK_{1/2} foram normalizados pela Akt total e pela ERK_{1/2} total, respectivamente. Valores representam média $\pm$ EPM, n = 4-6. P > 0,05 (ANOVA de uma via).

Figura 7 **A)** Fosforilação da Stat 3 (p-Stat 3) em ilhotas pancreáticas de camundongos C, CH, CHT, R, RH e RHT, n = 4-6. Os dados p-Stat 3 foram normalizados pela Stat 3 total. **B)** IL-6 plasmática de camundongos em jejum, n = 7-13. Valores representam média $\pm$ EPM. * P < 0,05 em relação a C (ANOVA de uma via e pós teste de Duncan).

Lista de tabelas

Artigo 1

Table 1. Composition of the diets

Table 2. Total plasma proteins, NEFA, CHOL and TG from fasted C, CH, CHT, R, RH and RHT mice

Artigo 2

Tabela 1. Peso absoluto e relativo do pâncreas e cérebro de camundongos C, CH, CHT, R, RH e RHT.

Resumo

A resistência a insulina é um fator de risco para o diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e é caracterizada pelo aumento da produção hepática de glicose, pela menor captação desse açúcar pelos músculos e tecido adiposo e pela hipersecreção de insulina pelas células β pancreáticas. Estudos populacionais correlacionam o aporte insuficiente de nutrientes na fase gestacional e pós-natal com o desenvolvimento da resistência a insulina e do DM2 na vida adulta. Essas duas condições são frequentemente associadas a alterações no perfil de aminoácidos plasmáticos. Alguns estudos evidenciam menor concentração do aminoácido sulfurado, taurina, no plasma de humanos e camundongos diabéticos. Neste trabalho, investigamos o desenvolvimento da obesidade, da resistência a insulina e as alterações morfofisiológicas no pâncreas endócrino de camundongos submetidos a restrição protéica após o desmame e em seguida alimentados com dieta hiperlipídica. Também tivemos como objetivo verificar os efeitos da suplementação com taurina sobre o controle da homeostase glicêmica nesse modelo animal. Nossos resultados mostram que camundongos desnutridos respondem ao tratamento com dieta hiperlipídica de maneira semelhante aos camundongos alimentados com dieta normoprotéica. Ambos os grupos se tornaram obesos, hiperleptinêmicos e hipercolesterolêmicos; apresentaram maior ingestão calórica, maior produção hepática de glicose e hipersecreção de insulina em ilhotas isoladas. A suplementação com taurina melhorou esses parâmetros com maior intensidade nos camundongos alimentados com dieta normoprotéica. Esses efeitos da taurina foram associados com maior fosforilação da proteína homóloga ao timoma viral (Akt) no fígado dos camundongos controles, e nos desnutridos houve maior fosforilação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK). Em conclusão, a desnutrição pós desmame não acelera ou potencializa o desenvolvimento da resistência a insulina induzida por dieta hiperlipídica, porém confere resistência aos efeitos da suplementação com taurina.

Abstract

Insulin resistance is a risk factor for type 2 diabetes mellitus (T2DM) and is characterized by increased hepatic glucose output, the lower uptake of this sugar by muscle and adipose tissue and by hypersecretion of insulin by pancreatic β cells. Population studies correlate the insufficient nutrient intake during pregnancy and early life stages with the development of insulin resistance and T2DM in adulthood. These two conditions are often associated with changes in plasma amino acid profile. Some studies show lower concentration of the sulfur-containing amino acid, taurine, in plasma of diabetic humans and mice. In this project, we investigate the development of obesity, insulin resistance and morphophysiological changes in the endocrine pancreas of mice subjected to protein restriction after weaning and then fed a high-fat diet. We also aimed to investigate the effects of taurine supplementation on the control of glucose homeostasis in this animal model. Our results show that undernourished mice respond to treatment with high-fat diet similarly to mice fed a normal protein diet. Both groups became obese, hypercholesterolemic, hyperleptinemic, had higher caloric intake, increased hepatic glucose output and insulin hypersecretion in isolated islets. The taurine supplementation improved these parameters with greater intensity in mice fed a normal protein diet. These effects of taurine were associated with increased phosphorylation of thymoma viral oncogene homolog (Akt) in the liver of control mice and in malnourished mice, the phosphorylation of the AMP-activated protein kinase (AMPK) was increased. In conclusion, malnutrition after weaning doesn't accelerate nor potentiate the development of insulin resistance induced by high fat diet, but confers resistance to the effects of taurine supplementation.

1.Introdução

1.1 Secreção de insulina

O pâncreas endócrino é uma glândula única, composta por quatro principais tipos de células distribuídas por toda a porção exócrina. Essas células estão agregadas em “ilhas” denominadas ilhotas de Langerhans. São geralmente ovas e a distribuição das células endócrinas dentro de uma ilhota é similar na maioria dos mamíferos (Kulkarni, 2004). Em ilhotas de camundongos, a população celular está organizada de maneira a formar um aglomerado central (núcleo) de células β com um manto de células α e, em menor proporção, células δ localizadas na periferia. Essa população está dividida na proporção de 75% de células β produtoras de insulina, 6% de células δ produtoras de somatostatina e 19% de células α e PP produtoras de glucagon e polipeptídeo pancreático, respectivamente (Orci, 1985). Em humanos e primatas, ao contrário do observado em camundongos, as células α e δ se encontram dispersas pelas ilhotas e a proporção dos tipos celulares varia de 28-75% de células β , 10-65% de células α e 1.2-22% de células δ (Brissova *et al.*, 2005).

A secreção de insulina pelas células β é controlada continuamente de acordo com as flutuações da concentração de nutrientes circulantes, em especial, a glicose. Este açúcar é o regulador mais importante da secreção de insulina sendo que em resposta à hexose há um aumento rápido, ou pico da liberação do hormônio nos primeiros minutos da estimulação, o qual constitui a primeira fase da secreção. Enquanto a concentração de glicose permanecer elevada, um segundo aumento ou fase é observado, e embora possua menor amplitude do que a primeira resposta, esta é sustentada até que a euglicemia seja estabelecida (Straub & Sharp, 2002; Hiriart & Aguilar-Bryan, 2008).

A secreção de insulina estimulada pela glicose inicia-se com o transporte desse açúcar pelas células β pancreáticas, através de um transportador específico (GLUT 2). A glicose é fosforilada a glicose-6-fosfato pela enzima glicoquinase (GCK) 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 β . A redução do efluxo de K^+ nas células leva à

despolarização da membrana que, por sua vez, provoca a abertura de canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem (Cav), e influxo deste cátion que ativa a maquinaria exocitótica dos grânulos de insulina (Boschero & Malaisse, 1979; Hiriart & Aguilar-Bryan, 2008; Henquin, 2011).

Além da glicose, a secreção de insulina pode ser modulada por outros nutrientes, neurotransmissores e hormônios. Aminoácidos e cetoácidos também podem regular a secreção de insulina isoladamente ou potencializar os efeitos gerados pela glicose (Gao *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2004; Um *et al.*, 2004). O sistema nervoso autônomo e hormônios intestinais também participam da regulação da liberação de insulina. O hormônio glucagon-like peptide 1 (GLP-1) e o peptídeo insulínico dependente de glicose (GIP), são importantes durante a ingestão alimentar. Eles são liberados do intestino para circulação e potencializam a secreção de insulina. Outros hormônios produzidos pelas ilhotas pancreáticas como o glucagon e a somatostatina exercem ação estimulatória e inibitória, respectivamente, sobre a secreção das células β (Nesher *et al.*, 2002; McClenaghan, 2007; Hiriart & Aguilar-Bryan, 2008; Youos, 2011).

1.2 Desnutrição, Obesidade e Diabetes

A desnutrição protéico-energética é um termo genérico e está associada a uma série de doenças relacionadas à falta de nutrientes na alimentação durante diferentes fases da vida. Epidemiologicamente ela ainda é uma desordem nutricional de maior prevalência entre crianças de países em desenvolvimento estando presente em mais de 50% dos casos de mortalidade infantil (Pelletier, 1994; Gao *et al.*, 2003; Grover & Ee, 2009). Embora seja frequentemente associada à pobreza e problemas sociais, a desnutrição também está presente em 6-24% das crianças hospitalizadas em países desenvolvidos (Joosten & Hulst, 2008; Pawellek *et al.*, 2008).

Ao longo das décadas, vários estudos vêm mostrando uma correlação positiva entre o baixo peso ao nascer e o desenvolvimento de doenças crônicas na vida adulta como a hipertensão arterial e o DM2 (Hales & Barker, 1992; Rao,

1995; Sawaya *et al.*, 2003; Bol *et al.*, 2010; Aubin *et al.*, 2012). Este último é precedido pela resistência periférica à ação da insulina que quando prolongada, pode levar a disfunção e falência das células β (Cnop *et al.*, 2011).

Em 1992, Hales & Barker criaram a hipótese do fenótipo econômico que postula a ativação de uma reprogramação *in utero*, mediante restrição nutricional durante a gestação, levando ao retardo no desenvolvimento de órgãos e tecidos como rins, tecido muscular e pâncreas endócrino em favorecimento de órgãos vitais como o cérebro. Essas adaptações poderiam repercutir na vida adulta com o desenvolvimento de doenças renais, hipertensão arterial e DM2. Dados da literatura confirmam esta hipótese demonstrando que tanto a fase de crescimento intra-uterino quanto os estágios iniciais de vida são fundamentais para o desenvolvimento, maturação e funcionamento adequado do pâncreas endócrino (Remacle *et al.*, 2007; Reusens *et al.*, 2011). Estudos conduzidos em fetos de roedores que passaram por restrição protéica durante a fase de gestação, verificaram menor tamanho e vascularização das ilhotas (Snoeck *et al.*, 1990), bem como reduzida taxa de replicação devido a alterações em proteínas envolvidas no ciclo celular (Petrik *et al.*, 1999) e maior número de células morrendo por apoptose (Boujendar *et al.*, 2002). Quando as ilhotas desses animais foram removidas do meio metabolicamente desfavorável e cultivadas por 7 dias em meio com disponibilidade adequada de nutrientes, essas características ainda estavam presentes (Rasschaert *et al.*, 1995). Essas evidências sugerem que distúrbios no meio intra-uterino, como no caso da restrição protéica, podem comprometer permanentemente o desenvolvimento e função das ilhotas pancreáticas.

Nosso grupo de pesquisa tem estudado o papel da desnutrição fetal e infantil usando o modelo experimental animal de restrição protéica na vida intra-uterina, lactação e após desmame, avaliando seus efeitos sobre a secreção e ação da insulina na vida adulta (Latorraca *et al.*, 1999; Ferreira *et al.*, 2003; Ferreira *et al.*, 2004; Amaral *et al.*, 2010; Filiputti *et al.*, 2010; Batista *et al.*, 2012). Nesses diferentes modelos a secreção de insulina estimulada por glicose,

aminoácidos e outros potencializadores se encontra reduzida. Entre os mecanismos propostos para a menor função dessas células estão: menor expressão de PDX-1 (Arantes *et al.*, 2002; Martin *et al.*, 2004), PKA α (Milanski *et al.*, 2005), PKC α (Ferreira *et al.*, 2004), S6K-1 (Filiputti *et al.*, 2008), mTOR e PI3K (Filiputti *et al.*, 2010), subunidade β_2 do Cav e receptor muscarínico M $_3$ (Amaral *et al.*, 2010; Batista *et al.*, 2012), GDH (da Silva *et al.*, 2012), menor massa de células β (Rafacho *et al.*, 2009) e mobilização de íons Ca $^{2+}$ (Latorraca *et al.*, 1999; Soriano *et al.*, 2010).

Com relação à ação periférica da insulina, já foram constatadas hipoinsulinemia e normoglicemia durante GTT oral em ratos desnutridos após o desmame, sugerindo maior tolerância a glicose. O músculo desses animais teve maior fosforilação em tirosina de IR e IRS-1, maior associação dessa última com a subunidade p85 da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e maior conteúdo de GLUT4 (transportador de glicose do tipo 4) na membrana plasmática após estimulação com insulina (Reis *et al.*, 1997; Gavete *et al.*, 2005).

Por outro lado, já foram verificados aos 15 meses de vida em ratos desnutridos durante a gestação e lactação, menor captação de glicose e reduzida atividade da PI3K e Akt em adipócitos isolados (Ozanne *et al.*, 2001). Ainda, diminuição da fosforilação da Akt e do conteúdo GLUT-4 foi observada no músculo esquelético de humanos com baixo peso ao nascer (Jensen *et al.*, 2008). Esses dados sugerem que o aumento da sensibilidade a insulina produzida pela desnutrição seja transitório e, em estágios posteriores da vida a resistência a insulina e o DM2 podem ocorrer.

1.3 Resistência hepática a insulina e homeostase glicêmica

O fígado possui um papel central no metabolismo dos carboidratos, lipídios e proteínas. No período pós-absortivo ou jejum, o glicogênio hepático é mobilizado para manutenção da glicemia. Durante o jejum prolongado inicia-se, concomitante ao uso do glicogênio, a produção hepática de glicose a partir de outros substratos

como o lactato, glicerol e aminoácidos pela via gliconeogênica (Yabaluri & Bashyam, 2010).

Durante o jejum, o principal regulador hormonal da produção hepática de glicose é o glucagon, secretado pelas células α pancreáticas. Ao se ligar ao seu receptor, o glucagon promove aumento do conteúdo intracelular de AMP cíclico (AMPC) e ativação da proteína quinase dependente de AMPC (PKA) que por sua vez fosforila a proteína que se liga ao elemento responsivo ao AMPC (CREB) no DNA, que por sua vez migra ao núcleo e regula a expressão gênica. Entre os genes aos quais a CREB se liga e estimula a transcrição, estão a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) e a glicose-6-fosfatase (G-6Pase), enzimas chave que regulam as etapas iniciais e finais, respectivamente, da gliconeogênese (Yabaluri & Bashyam, 2010). Por outro lado, um dos supressores mais potentes da produção hepática de glicose é a insulina que após se ligar ao seu receptor, inibe a expressão da PEPCK e G-6Pase através da ativação da PI3K e Akt (Barthel & Schmoll, 2003).

A regulação da produção hepática de glicose é fundamental para o controle da homeostase glicêmica. De fato, maior produção hepática de glicose é uma característica frequentemente observada em humanos com DM2 (Barthel & Schmoll, 2003). O aumento da gliconeogênese no diabetes se dá pela resistência hepática a insulina. Camundongos *knockout* para o receptor de insulina somente no fígado apresentam hiperglicemia, intolerância a glicose e resistência a insulina. Ainda, a expressão da PEPCK e G-6Pase se encontra elevada, não ocorrendo inibição da produção hepática de glicose na presença de insulina (Michael *et al.*, 2000).

Existem evidências de que a função hepática também se encontre alterada na desnutrição. Ratos alimentados com dieta hipoprotéica, apresentam maior conteúdo hepático de glicogênio (Filiputti *et al.*, 2008; Giozzet *et al.*, 2008). Esse efeito já foi associado com a maior sensibilidade a insulina nesses animais (Latorraca *et al.*, 1998). Interessantemente, mesmo com maior conteúdo hepático de glicogênio, camundongos desnutridos apresentam menor mobilização de glicose em resposta ao jejum ou após uma carga exógena de glucagon. A menor

fosforilação do CREB após a sobrecarga de glucagon sugere uma resistência a esse hormônio em camundongos desnutridos (Marroqui *et al.*, 2012). Tal efeito enfatiza o prejuízo na homeostase da glicose nesse modelo experimental.

1.4 Taurina

A taurina é um aminoácido presente em altas concentrações tanto no interior das células como no plasma de mamíferos. Este aminoácido é obtido pela ingestão de carne, peixe e leite, mas também pode ser biossintetizado a partir de metionina e cisteína. Tem importância em processos biológicos tais como desenvolvimento do sistema nervoso e retina, modulação do Ca^{2+} , determinação do conteúdo de fosfolípidos de membrana, reprodução, imunidade e pode também funcionar como um osmólito para regular o volume celular (Huxtable 1992; Aerts & Van Assche, 2002).

Além das várias funções atribuídas à taurina, estudos de nosso laboratório vêm mostrando que esse aminoácido possui um papel regulador sobre a secreção de insulina e homeostase glicêmica. O tratamento de ilhotas com a taurina aumenta a sensibilidade das células β a glicose, e promove uma maior migração do fator de transcrição PDX-1 para o núcleo destas células (Carneiro *et al.*, 2009). Camundongos suplementados com taurina são mais tolerantes a glicose e insulina. Ainda, suas ilhotas demonstram maior captação de Ca^{2+} na presença de concentrações estimulatórias de glicose possivelmente devido ao aumento da expressão da subunidade β_2 do Cav (Ribeiro *et al.*, 2009). Além disso, em ratos desnutridos, a suplementação com taurina restaura a secreção de insulina estimulada por glicose e pelo agonista colinérgico, carbacol. Esses efeitos foram associados à normalização da expressão do receptor muscarínico M_3 e das proteínas da maquinaria exocitótica SNAP-25 e Sintaxina 1 (Batista *et al.*, 2012).

Em modelo animal de obesidade e resistência a insulina, a concentração plasmática de taurina se encontra reduzida e a suplementação com esse aminoácido reduz o ganho de peso corpóreo e de tecido adiposo induzido por

dieta hiperlipídica além de normalizar o metabolismo basal (Tsuboyama-Kasaoka *et al.*, 2006). Nos ratos obesos *Otsuka Long-Evans Tokushima* (OLETF), a suplementação com o aminoácido melhora o perfil lipídico plasmático e a sensibilidade periférica a insulina (Nakaya *et al.*, 2000). As ilhotas pancreáticas de ratos OLETF suplementados com taurina apresentam menos fibrose e menor taxa de apoptose de células β (Lee *et al.*, 2011). Em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica, a suplementação com taurina aumenta a tolerância a glicose, reduz a hipersecreção de insulina e a hipertrofia das ilhotas pancreáticas (Ribeiro *et al.*, 2012).

Estudos conduzidos em humanos mostram que o tratamento preventivo com taurina impede a redução da secreção de insulina em indivíduos obesos submetidos à infusão contínua com ácidos graxos por 48h (Xiao *et al.*, 2008). O conjunto dessas evidências indica que a suplementação com taurina possa ser usada como uma estratégia preventiva à obesidade e ao DM2.

2.Objetivos

Neste estudo tivemos como objetivo analisar se as características descritas pela hipótese do fenótipo econômico de Hales & Barker seriam reproduzidas em camundongos submetidos a restrição proteica após o desmame e em seguida, alimentados com dieta hiperlipídica. Para isso avaliamos o crescimento, adiposidade, sensibilidade periférica a insulina e a funcionalidade das ilhotas pancreáticas nesse modelo animal. Adicionalmente, avaliamos os efeitos da suplementação com taurina sobre esses parâmetros.

Os dados referentes a sensibilidade periférica e análises em fígado estão apresentados no Artigo 1: “*Taurine supplementation improves liver glucose control in normal protein and malnourished mice fed a high fat diet*”, aceito para publicação no periódico *Molecular Nutrition and Food Research*.

Os dados referentes à caracterização morfológica e funcional do pâncreas endócrino estão apresentados no Artigo 2: “Morfologia do pâncreas endócrino e regulação da secreção de insulina em camundongos desnutridos alimentados com dieta hiperlipídica e suplementados com taurina”, ainda em preparo.

3.Artigo 1

TAURINE SUPPLEMENTATION IMPROVES LIVER GLUCOSE CONTROL IN NORMAL PROTEIN AND MALNOURISHED MICE FED A HIGH-FAT DIET

Artigo aceito para publicação – Molecular Nutrition and Food Research

Thiago M. Batista^{1*}, Rosane A. Ribeiro^{1,2}, Priscilla M. R. da Silva¹, Rafael L. Camargo¹,
Pablo C. B. Lollo³, Antonio C. Boschero¹ and Everardo M. Carneiro¹

¹Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil;

²Núcleo em Ecologia e Desenvolvimento Sócio-Ambiental de Macaé (NUPEM), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Macaé, RJ, Brazil;

³Departamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

Running head: Taurine regulates glucose control in malnutrition

Number of words: 6,908

* Correspondence to Thiago Martins Batista

Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CEP 13083-970, Campinas, SP, Brazil.

E-mail: thiagombatista84@gmail.com

Tel.: +55 19 3521 6198; Fax: +55 19 3521 6185

List of abbreviations: AICAR, 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside; Akt, thymoma viral proto-oncogene/protein kinase B; AMPK, AMP-activated protein kinase; AUC, area under curve; BCAA, branched-chain amino acids; BCATm, mitochondrial branched chain amino acid aminotransferase; BCKD, branched chain α -keto acid dehydrogenase; BW, body weight; CHOL, cholesterol; FOXO1, forkhead box protein-1; GITT, glucagon tolerance test; GTT, glucose tolerance test; GLUT-4, glucose transporter 4; GSK-3, glycogen synthase kinase 3; HFD, high-fat diet; ITT, insulin tolerance test; LKB1, liver kinase B1; L-NAME, L-NG-Nitroarginine methyl ester; NEFA, non-esterified fatty acid; NO, nitric oxide; NOS, nitric oxide synthase; ONOO⁻, peroxynitrite; PEPCK, phosphoenolpyruvate carboxykinase; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; PTT, pyruvate tolerance test; SNAP, S-nitroso-N-penicillamine; TAU, Taurine; TG, triglyceride; TORC2, transducer of regulated CREB protein 2; T2DM, type 2 diabetes mellitus;

Keywords: Glucose Homeostasis; High-fat diet; Insulin resistance; Obesity; Protein-malnutrition; Taurine Supplementation.

3.1. Abstract

Scope: Poor nutrition during the perinatal period is associated with an increased risk for metabolic syndrome in adulthood. Taurine (TAU) regulates β cell function and glucose homeostasis. Here, we assessed the effects of TAU supplementation upon adiposity and glucose control in malnourished mice fed a high-fat diet (HFD). **Methods:** Weaned male C57BL/6J mice were fed a control (14% protein-C) or a protein-restricted (6% protein-R) diet for 6 weeks. Afterwards, mice received or not a HFD for 8 weeks (CH and RH). Half of the HFD mice were supplemented with 5% TAU after weaning (CHT and RHT). **Results:** Protein restriction led to typical malnutrition features. HFD increased body weight (BW), adiposity, and led to hyperleptinemia, hyperphagia, glucose intolerance and higher liver glucose output in RH and CH groups. Fasted R mice showed higher plasma adiponectin levels and increased phosphorylation of the AMP-activated protein kinase (p-AMPK) in the liver. These parameters were reduced in RH mice and increased p-AMPK persisted in RHT. TAU prevented obesity and improved glucose tolerance only in CHT, but liver glucose control was ameliorated in both supplemented groups. Better CHT liver glucose control was linked to increased Akt (thymoma viral proto-oncogene/protein kinase B) phosphorylation. **Conclusion:** malnourished mice fed a HFD developed obesity, glucose intolerance and increased liver glucose output. TAU preserved only normal liver glucose control in RHT mice an effect associated with increased liver p-AMPK content.

3.2. Introduction

Insulin resistance is a risk factor for type 2 diabetes mellitus (T2DM). It is characterized by the impaired action of insulin on the inhibition of liver glucose output and decreased adipocyte and muscle glucose uptake [1]. Several studies have shown a correlation between low birth weight and risk of insulin resistance and T2DM in later life [2-4]. This correlation is supported by reports of abnormal function of phosphoinositide 3- kinase (PI3K), including lower Akt phosphorylation and glucose transporter (GLUT)- 4 protein expression in the muscles of low birth-weight men [5, 6].

Protein-malnutrition during pregnancy is a frequent cause of low birth weight. Rodent models of dietary protein restriction are useful for understanding metabolic adaptations that may occur during this period and during adult life. Adult offspring from low-protein dams showed normal blood glucose during oral glucose tolerance test despite lower insulinemia. The higher glucose tolerance is explained by increased insulin sensitivity [7, 8]. However, this effect seems to be transitory, since, rats from malnourished mothers, at 15 months of age present impaired adipocyte glucose uptake and become diabetic [9].

Taurine (TAU), is a sulfur-containing amino acid found in high concentrations in the plasma and tissues of mammals [10]. This amino acid demonstrates several physiological properties and, amongst these, its anti-diabetic activity is the object of intense research. TAU supplementation has been shown to improve insulin sensitivity and normalized blood glucose, plasma insulin, hypertension, dyslipidemia and β -cell function in pre-diabetic and diabetic rodents [11-13]. In addition, TAU concentration is reduced in plasma of diabetic subjects [14, 15]. Finally, TAU supplemented malnourished rats have showed enhanced nutrient-induced insulin secretion and recovered glucose tolerance [16, 17].

The aim of this study was to evaluate the progression of obesity and body glucose control in mice fed either a normal or a low-protein diet for six weeks, followed by a high fat diet (HFD) for additional eight weeks. In addition, the preventive effect of TAU supplementation upon the metabolic damages induced by HFD in normal and low-protein diet mice was studied.

3.3. Materials and methods

3.3.1. Animals and diets

All experiments were approved by the ethics committee at UNICAMP (protocol number: 1942-1). Male C57Bl/6J mice were obtained from the breeding colony at UNICAMP and maintained at $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$, on a 12-h light-dark cycle, with free access to food and water.

Weaned 30-day old mice were randomly distributed in the following groups: mice that received a normal-protein diet (14% protein) without (Control group: C, n=21) or with 5% TAU in their drinking water; or mice submitted to a protein-restricted diet (6% protein) without (Restricted group: R, n=19) or with 5% TAU in their drinking water [13, 16, 18, 19]. After 6 weeks, C and R groups were subdivided and received, or not, a HFD (35% fat) for 8 weeks (CH and RH, n=21) [20]. All TAU treated mice were kept on the supplementation protocol and were also fed a HFD for 8 weeks (CHT, n=20; and RHT, n=18). All experimental procedures listed below were developed at the end of diet and TAU treatment (14 weeks). Diet compositions are described in Table 1.

3.3.2. General nutritional parameters

Body weight (BW) was measured weekly throughout the experimental period. During the last week of HFD treatment all mice groups were placed in metabolic cages and had their

food intake monitored, as previously reported [21]. At the end of the experimental period (14 weeks), fasted mice were euthanized in a CO₂ chamber followed by decapitation. Their blood was collected in heparinized tubes (5,000 IU diluted 1:1,000), centrifuged at 10,600 g and the obtained plasma was stored at -20°C until use. A colorimetric kit was used according to the manufacturer's instructions for quantification of total plasma proteins (Laborlab, Guarulhos, SP, Brazil). Enzymatic kits were used for quantification of non-esterified fatty acids (NEFAs) (Wako[®]; Richmond, USA), cholesterol (CHOL) and triglycerides (TG) (Roche/Hitachi[®]; Indianapolis, USA). Enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) kits were used for plasma leptin (Crystalchem; Downers Grove, USA) and adiponectin (Millipore; Billerica, USA). Plasma glucose was measured using a glucose analyzer (Accu-Chek Advantage, Roche Diagnostic, Switzerland), insulin was measured by radioimmunoassay as previously reported [22].

3.3.3. Plasma amino acid profile

Plasma-free amino acids were extracted using 80% ethanol containing 0.1M HCl. The mixture was sonicated for 10 min and further homogenized for 1 h, followed by centrifugation at 10,600 g for 15 min. The supernatant was filtered through a 0.22 mm membrane, 40 µL of the samples were derivatized with phenylisothiocyanate (PTC) [waters pico-tag for free amino acids(WAT0 10954 Ver4)] and 20 µL of the PTC-derivatives were separated by chromatography using a Luna C-18 5µ, 250 x 4.6 mm column (00G-4252-EQ; Phenomenex, Torrance, CA, USA), at 50°C, in an HPLC system (SCL-10avp, CTO10avp, SPDm10avp; Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, MD, USA) with CLASS-VP 6.12 software. The solvent A was acetonitrile 60% and solvent B was sodium acetate 0.58

M + 5% of acetonitrile. An amino acid standard solution was derivatized and analyzed together with the samples, and methionine sulfone was used as an internal control.

3.3.4. Liver glycogen quantification

Fasting glycogen content in the liver were measured in sample pieces (weighing 15-20 mg from the two major lobules) collected from 8 h fasted mice. Glycogen was measured by the phenolsulfuric method [20] after KOH digestion and ethanol precipitation of glycogen. The glycogen content in the liver was calculated using D-glucose as standard curve.

3.3.5. Intraperitoneal glucose (ipGTT), insulin (ipITT), glucagon (ipGITT) and pyruvate (ipPTT) tolerance tests

For ipGTT, overnight fasted mice (10 h) were injected with a 2 g/Kg BW of a 20% glucose solution. Blood glucose was determined before (time 0) and 15, 30, 60 and 120 min after glucose injection using a glucose analyzer (Accu-Chek Advantage, Roche Diagnostic®, Switzerland) and blood sample was taken from the tip of the tail. For ipITT, fed mice were injected with 1.5U/Kg BW of human insulin (Biohulin[®], Biobrás, Brazil). Blood glucose was determined before (time 0) and 10, 15, 30, 45 and 60 min after insulin injection. For ipGITT, overnight fasted mice (8 h) were injected with 100 µg/Kg BW of human glucagon (Glucagen[®], Novo Nordisk, Denmark). Blood glucose was determined before (time 0) and 5, 10, 20, 40 and 60 min after glucagon injection. For ipPTT, overnight fasted mice (14 h) were injected with 2 g/Kg BW of sodium pyruvate (Merck; Darmstadt, Germany). Blood glucose was determined before (time 0) and 15, 30 and 60 min after pyruvate injection.

3.3.6. Western blot

For the evaluation of Akt phosphorylation (p-Akt), 12 h food-deprived mice were anesthetized with a mixture of ketamine (50 mg/Kg, i.p., Vetbrands®, Paulínia, SP, BRA) and xylazine (16 mg/Kg, i.p., Rompun, Bayer®, São Paulo, SP, BRA), and subsequently received an ip injection of insulin (100 µL; 1.10^{-6} M). After 5 min, fragments of the liver were excised and immediately frozen in liquid nitrogen. Phosphorylated AMPK/AMPK ratio was evaluated in liver samples from 12h fasted mice that received ip 0.9% saline (100 µL). Liver fragments were homogenized using a Polytron PT 1200 C homogenizer (Brinkmann Instruments, NY, USA) in buffer containing: 100 mmol/L Tris pH 7.5, 10 mmol/L sodium pyrophosphate, 100 mmol/L sodium fluoride, 10 mmol/L EDTA, 10 mmol/L sodium vanadate, 2 mmol/L PMSF and 1% Triton X-100. The extracts were then centrifuged at 15,300 g at 4°C for 40 min to remove insoluble material. The protein concentration in the supernatants was assayed using the Bradford dye method [24], using BSA as a standard curve and Bradford reagent (Bio-Agency Lab., São Paulo, SP, BRA). For SDS gel electrophoresis and Western blot analysis, the samples were treated with a Laemmli sample buffer containing dithiothreitol. After heating samples at 95°C for 5 min, the proteins were separated by electrophoresis (70 µg protein/lane, 10% gels). Following electrophoresis, proteins were transferred to nitrocellulose membranes. The nitrocellulose filters were treated overnight with a blocking buffer (5% non-fat dried milk, 10 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, and 0.02% Tween 20) and were subsequently incubated with a polyclonal antibody against p-Akt (1:1000, cat. sc-7985R, Santa Cruz Biotechnology), Akt (1:1000, cat. sc-8313, Santa Cruz Biotechnology), p-AMPK (1:1000, cat # 2535, Cell Signaling) and AMPK (1:1000, cat # 2532, Cell Signaling). Detection was performed after

2 h incubation with a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (1:10,000, Invitrogen, São Paulo, SP, BRA). The band intensities were quantified by optical densitometry using the free software, Image Tool (<http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/itdesc.html>). Densitometry values obtained from phosphorylated proteins (p-Akt and p-AMPK) were normalized by total protein expression (Akt and AMPK) and expressed as % of C group, as previously described [16, 19].

3.3.7. Statistical analysis

Results are presented as means $\pm$ SEM for the number of determinations (n) indicated. The statistical analyses were carried out using a one-way analysis of variance (ANOVA) and two-way ANOVA with repeated measures (for glucose, insulin, glucagon and pyruvate tolerance experiments) followed by Duncan *post test* ($P \leq 0.05$) with the Statistica 5.0 software (Statsoft, Tulsa, OK, USA). Prior to ANOVA analysis a Gaussian distribution of the samples was assumed based on the Kolmogorov-Smirnov normality test using GraphPad Prism version 5.00 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3.4. Results

3.4.1. Effects of diet and TAU treatment upon mice characteristics

Body weight (BW) from normal protein and protein-restricted groups was measured weekly as illustrated in Figure 1A and B, respectively. At the end of the experiment, the final BW of R mice was lower than C (24 ± 2 vs 29 ± 1 g, respectively; $P < 0.05$). The final BW from CH (38 ± 1 g) and RH (37 ± 2 g) groups was increased when compared to controls ($P < 0.01$ and $P < 0.001$, respectively). The BW from CHT mice (34 ± 1 g) was similar to C, whereas RHT had final BW (32 ± 2 g) higher than R mice ($P < 0.01$). In accordance, total BW, assessed by the area under curve (AUC), was reduced in R compared

to C mice ($P < 0.05$; Fig 1C). HFD increased BW AUC in both CH and RH, when compared to C and R mice ($P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively). TAU supplementation reduced total BW in CHT mice, however RHT also showed a persistent higher total BW compared with R ($P < 0.05$). The final BW ratio between CH/C and RH/R mice, at the end of the experiment, was 1.3 and 1.5, respectively, indicating a catch up growth pattern in malnourished mice fed a HFD. CH and RH mice also showed increased adiposity, as demonstrated by a 2.8 and 1.9-fold increase in periepididymal ($P < 0.001$ and $P < 0.05$), and a 2.7 and 2.0-fold increase in retroperitoneal ($P < 0.001$) fat pads, compared to C and R mice, respectively (Fig. 2A and 2B). The increase in fat depots was accompanied by increased plasma leptin in CH and RH groups ($P < 0.01$ and $P < 0.05$, respectively; Fig. 2C). Despite increased plasma leptin levels, CH and RH mice showed a higher calorie intake when compared with C and R mice ($P < 0.001$ and $P < 0.05$, respectively; Fig. 1D). TAU supplementation impaired the development of obesity and normalized calorie intake only in normal protein mice, because the CHT group showed similar BW, calorie intake, and plasma leptin levels to those of the C group (Fig. 1C, 1D and 2C), and a 20% reduction in fat depots, compared to the CH group ($P < 0.05$; Fig. 2A and 2B). Mice submitted to low-protein diet developed malnutrition, as indicated by a reduction in the total plasma proteins in the R, compared with the C mice ($P < 0.01$; Tab. 2). Plasma NEFAs levels were higher in RH when compared with the R group ($P < 0.05$). Plasma CHOL was increased in CH and RH groups, compared with their respective controls ($P < 0.001$ and $P < 0.05$, respectively). TAU supplementation lowered plasma CHOL in CHT mice with a 15% reduction, compared with the CH group ($P < 0.05$).

3.4.2. Glucose homeostasis

Blood glucose and plasma insulin levels were similar between fasted R and C mice (Fig. 3A and B). CH, but not RH mice, were hyperglycemic and hyperinsulinemic ($P < 0.05$; Fig. 3A and 3B). TAU supplementation normalized blood glucose and plasma insulin levels in CHT mice (Fig 3A and 3B).

During the ipGTT, blood glucose reached maximal values at 30 min in all groups (Fig. 3C and 3D). CH mice showed increased blood glucose at 60 min of the test ($P < 0.001$; Fig. 3C). In RH group, hyperglycemia started at 30 min and persisted until 120 min of the test ($P < 0.001$; Fig. 3D). TAU improved glucose tolerance in CHT mice as judged by similar glucose levels to those observed in C group (Fig. 3C). However, RHT had higher blood glucose at 30 and 60 min of the test compared with R mice ($P < 0.001$ and $P < 0.01$; Fig. 3D respectively). In addition, total plasma glucose levels (AUC) during ipGTT in CH and RH were higher than their respective controls ($P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively; Fig. 3E). TAU normalized glucose tolerance in CHT, but not in RHT mice (Fig. 3E).

During ipITT, R mice showed lower blood glucose compared with C mice (Fig. 3F and 3G), indicating increased insulin sensitivity, as demonstrated by the lower AUC in the R group ($P < 0.05$; Fig. 3H). HFD induced insulin resistance since the total plasma glucose levels in all HFD fed mice were higher than their respective controls (Fig. 3H). TAU supplementation did not alter the insulin resistance induced by HFD.

In addition, liver glucose output was evaluated using ipGITT and ipPTT (Fig. 4). After an ip glucagon administration, blood glucose in all groups, except for CH, reached the zenith after 10 min (Fig. 4A and 4B). In the CH group, the highest blood glucose concentration was observed at 20 min. The AUC during ipGITT showed a lower liver glucose output in R

compared to C mice ($P < 0.007$; Fig. 4C). In addition, hepatic glucose mobilization was increased in CH and RH mice, compared with their controls ($P < 0.05$ and $P < 0.01$; Fig. 4C). TAU supplementation normalized liver glucose output, induced by glucagon, in CHT but not in RHT mice. R and CH mice showed increased liver glycogen content ($P < 0.05$ and $P < 0.001$, respectively; Fig. 4G). TAU supplementation decreased liver glycogen content in both the CHT and RHT groups (Fig. 4G).

Figures 4D and 4E show an ipPTT performed in 14h-fasted mice. The AUC during ipPTT was similar between R and C mice, whereas CH and RH groups presented an increased glucose output as observed by the higher AUC compared to controls ($P < 0.01$; Fig. 4F). TAU supplementation improved liver glucose production after pyruvate administration only in RHT. Despite the disruption in glucose homeostasis in all groups, no differences on liver CHOL and TG content were observed (data not shown).

3.4.3. Akt and AMPK phosphorylation in the liver

Figure 5A shows p-Akt/Akt ratio in liver samples of fasted mice after an ip insulin administration. The R and C groups showed a similar liver p-Akt content (Fig. 5A). In addition, Akt activation was similar in obese controls and protein-restricted mice, but significantly increased in CHT, compared with all groups (Fig. 5A).

Phosphorylated AMPK (p-AMPK) was significantly increased in the liver of fasted R mice in comparison with C ($P < 0.05$; Fig. 5B). HFD significantly reduced p-AMPK content in fasted RH mice ($P < 0.01$). TAU supplementation preserved the enhanced AMPK activation in RHT mice (Fig. 5B).

In addition, plasma adiponectin was higher in fasted R than C mice ($P < 0.001$; Fig. 5C).

HFD lowered plasma adiponectin in RH and RHT, compared with R mice ($P < 0.001$).

3.4.4. Plasma amino acid profile

Plasma TAU, arginine, leucine, valine and isoleucine levels did not differ between R and C groups (Fig. 6). In addition, HFD treatment increased plasma leucine and valine levels in CH mice, compared with C ($P < 0.05$ and $P < 0.01$; Fig. 6C and 6D). TAU administration efficiently increased plasma TAU levels in CHT and RHT, in comparison with CH and RH mice, respectively ($P < 0.007$; Fig. 6A). Plasma arginine levels was 2.2 and 2.7 higher in CHT and RHT mice compared with their controls ($P < 0.001$ and $P < 0.01$; Fig. 6B). TAU supplementation also lowered plasma isoleucine in CHT, compared with the CH group ($P < 0.05$; Fig. 6E) and normalized plasma leucine and valine in CHT mice.

3.5. Discussion

Malnutrition during pregnancy leads to low birth weight, which may predispose to chronic diseases such as hypertension, glucose intolerance and T2DM [2-4]. Rodents submitted to protein restriction during gestation and lactation showed catch up growth after receiving normo or hypercaloric diets, which was critical for the development of obesity and glucose intolerance [25-27]. Here, we assessed whether a similar susceptibility was present in HFD mice fed on a low-protein diet after weaning. Our results show that catch up growth was present in malnourished obese mice, since the BW ratio between RH/R was increased in comparison to CH/C mice. In addition, hyperleptinemia, hyperphagia, hypercholesterolemia and insulin resistance were present in RH mice at a similar extent to those observed in CH. These RH mice features are in accordance with previous reports indicating that, after 8 months of hypercaloric diet, protein malnourished mice were

overweight and expressed higher amounts of leptin in the adipose tissue, compared with the normal protein group [26]. In addition, isolated adipocytes from 15 month-old malnourished rats presented lower glucose uptake, associated with decreased PI3K and Akt activities [9].

In our study, although RH mice presented glucose intolerance and insulin resistance they did not develop hyperinsulinemia as observed in CH mice (Fig. 3). In fact, impaired islet function in protein restricted rodents during gestation, lactation, and after weaning were reported [7, 16, 28, 29]. However, for the first time, we showed that malnutrition after a weaning may disrupt the β -cell capacity to compensate peripheral insulin resistance and may lead to the early development of T2DM in R mice submitted to a HFD.

In our study, TAU supplementation prevented excessive weight gain and hyperphagia (Fig. 1), lowered body fat depots, plasma leptin (Fig. 2), CHOL (Tab. 2), glucose and insulin levels (Fig. 3), and improved glucose tolerance (Fig. 3) in control, but not in malnourished mice fed a HFD.

Improved plasma lipid profile and enhanced glucose tolerance after TAU supplementation have been previously reported [13, 30-32]. The better glucose control in CHT mice could be, at least in part, explained by enhanced Akt activation in the liver (Fig. 5A). TAU has been reported to increase p-Akt content in different cellular types [19, 33-37]. It is known that Akt activation diminishes liver glucose output through inhibition of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) and forkhead box protein-1 (FOXO1) enzymes [38, 39]. The mechanisms by which TAU enhanced Akt activation are still unclear and may be due to a direct interaction of this amino acid with the insulin receptor [40, 41].

Although TAU supplementation did not prevent obesity and glucose intolerance in RHT mice (Fig. 1, 2 and 3), the pyruvate-induced glucose production was normalized in that group (Fig. 4). However, these effects were not associated with alterations in p-Akt content in the liver of RHT mice (Fig. 5) and may be related to the improvement of liver AMPK activation (Fig. 5B).

In the liver, AMPK suppresses lipid synthesis through inhibition of acetyl-CoA carboxylase [42]. This kinase also regulates liver glucose output, since the AMPK activator: 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside (AICAR) reduces transcriptional activity of the phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) gene promoter, after phosphorylation and inhibition of the TORC2 (transducer of regulated CREB protein 2) and GSK3 β [43-45]. In addition, adiponectin exerts insulin-sensitizing effects promoting nuclear export and cytosolic stabilization of the AMPK upstream activator kinase LKB1 [46, 47].

The enhanced insulin sensitivity in R mice (Fig. 3F-H) may be a consequence of increased plasma adiponectin levels, which promoted a higher AMPK activation in the liver (Fig. 5B and 5C). On the other hand, HFD decreased adiponectin levels and liver p-AMPK content in RH mice (Fig. 5B and 5C), which may contribute to defective insulin signaling in this group. Despite the lower plasma adiponectin concentrations in RHT (Fig. 5C), this group presented a persistent increase in AMPK phosphorylation in the liver (Fig. 5B). These observations suggest that TAU supplementation enhanced p-AMPK content by a different and yet unknown pathway.

Of note, plasma arginine concentrations were increased 2-fold in TAU supplemented groups (Fig. 6B). Higher plasma arginine levels were reported in guinea pigs after a single

ip injection of TAU [48]; however, the mechanisms by which these amino acids interact and regulate their own concentrations are not yet clear.

Arginine is a physiological precursor for nitric oxide (NO) generated by the reaction catalyzed by NO synthase (NOS) [49]. Previous studies reported that AMPK activation is regulated by NO and its derivatives. Incubation of L6 myotubes with a NO donor, SNAP (S-nitroso-N-penicillamine), has been found to increase GLUT4 mRNA and AMPK phosphorylation at the Thr¹⁷² residue. In addition, AICAR-induced AMPK activation was prevented by incubation with L-NAME, a NOS inhibitor [50]. Furthermore, the anti-diabetic drug metformin increased AMPK activation in endothelial and aortic cells via production of peroxynitrite (ONOO⁻), a reactive molecule formed by binding of the superoxide radical (O₂⁻) to NO [51, 52]. Although ONOO⁻, at pathologic levels, may contribute to insulin resistance through protein nitration, physiological levels of this molecule are important for AMPK activation [53]. As such, we propose that TAU supplementation, by increasing plasma arginine levels, created an alternative pathway for AMPK activation in the liver of RHT mice, in turn, improving hepatic glucose control. In addition, in our study CH mice showed higher plasma concentrations of the ketogenic amino acids: leucine and valine (Fig. 6C and 6D). This finding may be related to the impaired glucose control and insulin action in this group (Fig. 3 and 4). Increased branched-chain amino acids (BCAA) levels were reported in pre-diabetic and T2DM states [54-57]. Excessive amounts of BCAAs, especially leucine, can lead to hyperactivation of the mammalian target of rapamycin (mTOR), an amino acid sensor, which abrogates insulin signaling through phosphorylation of several serine residues of the insulin receptor substrate 1 (IRS-1) [58, 59]. On the other hand, insulin regulates BCAAs metabolism and

insulin resistant subjects showed increased plasma BCAAs levels during euglycemic-hyperinsulinaemic clamp [54]. In leptin deficient (*ob/ob*) obese mice and Zucker fatty (*fa/fa*) diabetic rats a decrease in protein expression of the mitochondrial BCAA aminotransferase (BCATm) and branched chain α -keto acid dehydrogenase (BCKD) complex in adipose tissue was reported [55]. Also, after bariatric surgery lower plasma BCAAs were present together with enhanced BCATm expression in white adipose tissues of human subjects [55]. Thus, lower oxidation of BCAAs may favor their accumulation in plasma of insulin resistant and diabetic subjects.

Here, TAU normalized BCAA levels in CHT mice. These observations support the improved glucose control in this group that was preserved by supplementation. The TAU action upon BCAAs metabolism is unclear. In a work from our laboratory pancreatic islets from TAU-treated mice presented enhanced leucine-induced insulin release associated with a better amino acid oxidation [60]. In this way, further studies are required to fully address this action of TAU upon the regulation of plasma BCAAs, but these evidences indicate that TAU may contribute to body nutrient control not only via insulin sensitizing effects but also through regulation of key metabolic enzymes.

In conclusion, we show that TAU supplementation, during early life and adulthood prevents obesity and improves glucose homeostasis in C mice fed a HFD. The later effect is probably due to increased p-Akt expression in the liver. In addition, for the first time, we provide evidence that a HFD treatment after a prolonged period of protein-malnutrition, after weaning, leads to the same metabolic damages such as: obesity, hyperphagia and glucose intolerance seen in normal protein mice but they were not restored or prevented by TAU supplementation. The higher adiponectin levels in malnourished mice possibly

enhance AMPK activation in the liver and contribute to normoglycemia in this group.

Finally, TAU regulates plasma arginine levels, which may preserve AMPK activation and normal hepatic glucose control in RHT mice.

3.6. Acknowledgements

This study was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT). We are grateful to Nicola Conran for editing the English. We also thank EM Risso and Prof. Dr. JA Farfán from the Laboratório de Fontes Protéicas (Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP) for plasma amino acid determination.

3.7. Conflict of interest

The authors have no conflicts of interest.

3.8. Author contributions

Batista TM designed the study, performed the experiments, analyzed data and wrote the manuscript. Ribeiro RA designed the study, analyzed data and wrote the manuscript. Silva PMR, Camargo RL and Lollo PCB performed the experiments. Boschero AC reviewed the manuscript. Carneiro EM designed the study and reviewed the manuscript.

3.9. References

- [1] Schenk S., Saberi M., Olefsky J. M., Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J Clin Invest* 2008, *118*, 2992-3002.
- [2] Cianfarani S., Germani D., Branca F., Low birthweight and adult insulin resistance: the "catch-up growth" hypothesis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1999, *81*, F71-73.
- [3] Hales C. N., Barker D. J., Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 1992, *35*, 595-601.
- [4] Sawaya A. L., Martins P., Hoffman D., Roberts S. B., The link between childhood undernutrition and risk of chronic diseases in adulthood: a case study of Brazil. *Nutr Rev* 2003, *61*, 168-175.
- [5] Jensen C. B., Martin-Gronert M. S., Storgaard H., Madsbad S., Vaag A., Ozanne S. E., Altered PI3-kinase/Akt signalling in skeletal muscle of young men with low birth weight. *PLoS One* 2008, *3*, e3738.
- [6] Ozanne S. E., Jensen C. B., Tingey K. J., Storgaard H., Madsbad S., Vaag A. A., Low birthweight is associated with specific changes in muscle insulin-signalling protein expression. *Diabetologia* 2005, *48*, 547-552.
- [7] Latorraca M. Q., Reis M. A., Carneiro E. M., Mello M. A., Velloso L. A., Saad M. J., Boschero A. C., Protein deficiency and nutritional recovery modulate insulin secretion and the early steps of insulin action in rats. *J Nutr* 1998, *128*, 1643-1649.
- [8] Reis M. A., Carneiro E. M., Mello M. A., Boschero A. C., Saad M. J., Velloso L. A., Glucose-induced insulin secretion is impaired and insulin-induced phosphorylation of the insulin receptor and insulin receptor substrate-1 are increased in protein-deficient rats. *J Nutr* 1997, *127*, 403-410.

- [9] Ozanne S. E., Dorling M. W., Wang C. L., Nave B. T., Impaired PI 3-kinase activation in adipocytes from early growth-restricted male rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001, 280, E534-539.
- [10] Huxtable R. J., Physiological actions of taurine. *Physiol Rev* 1992, 72, 101-163.
- [11] Anuradha C. V., Balakrishnan S. D., Taurine attenuates hypertension and improves insulin sensitivity in the fructose-fed rat, an animal model of insulin resistance. *Can J Physiol Pharmacol* 1999, 77, 749-754.
- [12] Colivicchi M. A., Raimondi L., Bianchi L., Tipton K. F., Pirisino R., Della Corte L., Taurine prevents streptozotocin impairment of hormone-stimulated glucose uptake in rat adipocytes. *Eur J Pharmacol* 2004, 495, 209-215.
- [13] Tsuboyama-Kasaoka N., Shozawa C., Sano K., Kamei Y., Kasaoka S., Hosokawa Y., Ezaki O., Taurine (2-aminoethanesulfonic acid) deficiency creates a vicious circle promoting obesity. *Endocrinology* 2006, 147, 3276-3284.
- [14] De Luca G., Calpona P. R., Caponetti A., Romano G., Di Benedetto A., Cucinotta D., Di Giorgio R. M., Taurine and osmoregulation: platelet taurine content, uptake, and release in type 2 diabetic patients. *Metabolism* 2001, 50, 60-64.
- [15] Franconi F., Bennardini F., Mattana A., Miceli M., Ciuti M., Mian M., Gironi A., Anichini R., Seghieri G., Plasma and platelet taurine are reduced in subjects with insulin-dependent diabetes mellitus: effects of taurine supplementation. *Am J Clin Nutr* 1995, 61, 1115-1119.
- [16] Batista T. M., Ribeiro R. A., Amaral A. G., de Oliveira C. A., Boschero A. C., Carneiro E. M., Taurine supplementation restores glucose and carbachol-induced

- insulin secretion in islets from low-protein diet rats: involvement of Ach-M3R, Synt 1 and SNAP-25 proteins. *J Nutr Biochem* 2012, 23, 306-312.
- [17] Cherif H., Reusens B., Ahn M. T., Hoet J. J., Remacle C., Effects of taurine on the insulin secretion of rat fetal islets from dams fed a low-protein diet. *J Endocrinol* 1998, 159, 341-348.
- [18] Filiputti E., Ferreira F., Souza K. L., Stoppiglia L. F., Arantes V. C., Boschero A. C., Carneiro E. M., Impaired insulin secretion and decreased expression of the nutritionally responsive ribosomal kinase protein S6K-1 in pancreatic islets from malnourished rats. *Life Sci* 2008, 82, 542-548.
- [19] Ribeiro R. A., Santos-Silva J. C., Vettorazzi J. F., Cotrim B. B., Mobiolli D. D., Boschero A. C., Carneiro E. M., Taurine supplementation prevents morpho-physiological alterations in high-fat diet mice pancreatic beta-cells. *Amino Acids* 2012, 43(4), 1791-1801.
- [20] De Souza C. T., Araujo E. P., Stoppiglia L. F., Pauli J. R., Ropelle E., Rocco S. A., Marin R. M., Franchini K. G., Carvalheira J. B., Saad M. J., Boschero A. C., Carneiro E. M., Velloso L. A., Inhibition of UCP2 expression reverses diet-induced diabetes mellitus by effects on both insulin secretion and action. *Faseb J* 2007, 21, 1153-1163.
- [21] Morrison A. B., Campbell J. A., Evaluation of protein in foods. V. Factors influencing the protein efficiency ratio of foods. *J Nutr* 1960, 70, 112-118.
- [22] Ribeiro R. A., Vanzela E. C., Oliveira C. A., Bonfleur M. L., Boschero A. C., Carneiro E. M., Taurine supplementation: involvement of cholinergic/phospholipase C and protein kinase A pathways in potentiation of

- insulin secretion and Ca²⁺ handling in mouse pancreatic islets. *Br J Nutr* 2010, *104*, 1148-1155.
- [23] Lo S., Russell J. C., Taylor A. W., Determination of glycogen in small tissue samples. *J Appl Physiol* 1970, *28*, 234-236.
- [24] Bradford M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976, *72*, 248-254.
- [25] Bieswal F., Ahn M. T., Reusens B., Holvoet P., Raes M., Rees W. D., Remacle C., The importance of catch-up growth after early malnutrition for the programming of obesity in male rat. *Obesity (Silver Spring)* 2006, *14*, 1330-1343.
- [26] Bol V. V., Delattre A. I., Reusens B., Raes M., Remacle C., Forced catch-up growth after fetal protein restriction alters the adipose tissue gene expression program leading to obesity in adult mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009, *297*, R291-299.
- [27] Peixoto-Silva N., Frantz E. D., Mandarim-de-Lacerda C. A., Pinheiro-Mulder A., Maternal protein restriction in mice causes adverse metabolic and hypothalamic effects in the F1 and F2 generations. *Br J Nutr* 2011, 1-10.
- [28] Soriano S., Gonzalez A., Marroqui L., Tuduri E., Vieira E., Amaral A. G., Batista T. M., Rafacho A., Boscherio A. C., Nadal A., Carneiro E. M., Quesada I., Reduced Insulin Secretion in Protein Malnourished Mice Is Associated with Multiple Changes in the {beta}-Cell Stimulus-Secretion Coupling. *Endocrinology* 2010, *151*, 3543-3554.

- [29] Theys N., Bouckennooghe T., Ahn M. T., Remacle C., Reusens B., Maternal low-protein diet alters pancreatic islet mitochondrial function in a sex-specific manner in the adult rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009, 297, R1516-1525.
- [30] Nakaya Y., Minami A., Harada N., Sakamoto S., Niwa Y., Ohnaka M., Taurine improves insulin sensitivity in the Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rat, a model of spontaneous type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr* 2000, 71, 54-58.
- [31] Nandhini A. T., Thirunavukkarasu V., Ravichandran M. K., Anuradha C. V., Effect of taurine on biomarkers of oxidative stress in tissues of fructose-fed insulin-resistant rats. *Singapore Med J* 2005, 46, 82-87.
- [32] Nardelli T. R., Ribeiro R. A., Balbo S. L., Vanzela E. C., Carneiro E. M., Boschero A. C., Bonfleur M. L., Taurine prevents fat deposition and ameliorates plasma lipid profile in monosodium glutamate-obese rats. *Amino Acids* 2011, 41, 901-908.
- [33] Baek Y. Y., Cho D. H., Choe J., Lee H., Jeoung D., Ha K. S., Won M. H., Kwon Y. G., Kim Y. M., Extracellular taurine induces angiogenesis by activating ERK-, Akt-, and FAK-dependent signal pathways. *Eur J Pharmacol* 2012, 674, 188-199.
- [34] Das J., Ghosh J., Manna P., Sil P. C., Taurine suppresses doxorubicin-triggered oxidative stress and cardiac apoptosis in rat via up-regulation of PI3-K/Akt and inhibition of p53, p38-JNK. *Biochem Pharmacol* 2011, 81, 891-909.
- [35] Das J., Vasan V., Sil P. C., Taurine exerts hypoglycemic effect in alloxan-induced diabetic rats, improves insulin-mediated glucose transport signaling pathway in heart and ameliorates cardiac oxidative stress and apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol* 2012, 258, 296-308.

- [36] Solon C. S., Franci D., Ignacio-Souza L. M., Romanatto T., Roman E. A., Arruda A. P., Morari J., Torsoni A. S., Carneiro E. M., Velloso L. A., Taurine enhances the anorexigenic effects of insulin in the hypothalamus of rats. *Amino Acids* 2012, 42 (6), 2403-10.
- [37] Takatani T., Takahashi K., Uozumi Y., Matsuda T., Ito T., Schaffer S. W., Fujio Y., Azuma J., Taurine prevents the ischemia-induced apoptosis in cultured neonatal rat cardiomyocytes through Akt/caspase-9 pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2004, 316, 484-489.
- [38] Lochhead P. A., Coghlan M., Rice S. Q., Sutherland C., Inhibition of GSK-3 selectively reduces glucose-6-phosphatase and phosphatase and phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression. *Diabetes* 2001, 50, 937-946.
- [39] Samuel V. T., Choi C. S., Phillips T. G., Romanelli A. J., Geisler J. G., Bhanot S., McKay R., Monia B., Shutter J. R., Lindberg R. A., Shulman G. I., Veniant M. M., Targeting foxo1 in mice using antisense oligonucleotide improves hepatic and peripheral insulin action. *Diabetes* 2006, 55, 2042-2050.
- [40] Carneiro E. M., Latorraca M. Q., Araujo E., Beltra M., Oliveras M. J., Navarro M., Berna G., Bedoya F. J., Velloso L. A., Soria B., Martin F., Taurine supplementation modulates glucose homeostasis and islet function. *J Nutr Biochem* 2009, 20, 503-511.
- [41] Maturo J., Kulakowski E. C., Taurine binding to the purified insulin receptor. *Biochem Pharmacol* 1988, 37, 3755-3760.
- [42] Zhou G., Myers R., Li Y., Chen Y., Shen X., Fenyk-Melody J., Wu M., Ventre J., Doebber T., Fujii N., Musi N., Hirshman M. F., Goodyear L. J., Moller D. E., Role

- of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* 2001, 108, 1167-1174.
- [43] Horike N., Sakoda H., Kushiyama A., Ono H., Fujishiro M., Kamata H., Nishiyama K., Uchijima Y., Kurihara Y., Kurihara H., Asano T., AMP-activated protein kinase activation increases phosphorylation of glycogen synthase kinase 3 β and thereby reduces cAMP-responsive element transcriptional activity and phosphoenolpyruvate carboxykinase C gene expression in the liver. *J Biol Chem* 2008, 283, 33902-33910.
- [44] Koo S. H., Flechner L., Qi L., Zhang X., Srean R. A., Jeffries S., Hedrick S., Xu W., Boussouar F., Brindle P., Takemori H., Montminy M., The CREB coactivator TORC2 is a key regulator of fasting glucose metabolism. *Nature* 2005, 437, 1109-1111.
- [45] Shaw R. J., Lamia K. A., Vasquez D., Koo S. H., Bardeesy N., Depinho R. A., Montminy M., Cantley L. C., The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science* 2005, 310, 1642-1646.
- [46] Bjursell M., Ahnmark A., Bohlooly Y. M., William-Olsson L., Rhedin M., Peng X. R., Ploj K., Gerdin A. K., Arnerup G., Elmgren A., Berg A. L., Oscarsson J., Linden D., Opposing effects of adiponectin receptors 1 and 2 on energy metabolism. *Diabetes* 2007, 56, 583-593.
- [47] Buechler C., Wanninger J., Neumeier M., Adiponectin receptor binding proteins--recent advances in elucidating adiponectin signalling pathways. *FEBS Lett* 2010, 584, 4280-4286.

- [48] Balabanli B., Erdamar H., Turkozkan N., Yaman H., Kurt Y., Effect of taurine on endotoxin-induced alterations in plasma asymmetric dimethylarginine, L-arginine and nitric oxide in guinea pigs. *J Thromb Thrombolysis* 2007, 24, 53-57.
- [49] Alderton W. K., Cooper C. E., Knowles R. G., Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001, 357, 593-615.
- [50] Lira V. A., Soltow Q. A., Long J. H., Betters J. L., Sellman J. E., Criswell D. S., Nitric oxide increases GLUT4 expression and regulates AMPK signaling in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007, 293, E1062-1068.
- [51] Choi H. C., Song P., Xie Z., Wu Y., Xu J., Zhang M., Dong Y., Wang S., Lau K., Zou M. H., Reactive nitrogen species is required for the activation of the AMP-activated protein kinase by statin in vivo. *J Biol Chem* 2008, 283, 20186-20197.
- [52] Xie Z., Dong Y., Scholz R., Neumann D., Zou M. H., Phosphorylation of LKB1 at serine 428 by protein kinase C-zeta is required for metformin-enhanced activation of the AMP-activated protein kinase in endothelial cells. *Circulation* 2008, 117, 952-962.
- [53] Xu J., Zou M. H., Molecular insights and therapeutic targets for diabetic endothelial dysfunction. *Circulation* 2009, 120, 1266-1286.
- [54] Forlani G., Vannini P., Marchesini G., Zoli M., Ciavarella A., Pisi E., Insulin-dependent metabolism of branched-chain amino acids in obesity. *Metabolism* 1984, 33, 147-150.
- [55] She P., Van Horn C., Reid T., Hutson S. M., Cooney R. N., Lynch C. J., Obesity-related elevations in plasma leucine are associated with alterations in enzymes

- involved in branched-chain amino acid metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007, 293, E1552-1563.
- [56] Waldram A., Holmes E., Wang Y., Rantalainen M., Wilson I. D., Tuohy K. M., McCartney A. L., Gibson G. R., Nicholson J. K., Top-down systems biology modeling of host metabotype-microbiome associations in obese rodents. *J Proteome Res* 2009, 8, 2361-2375.
- [57] Tai E. S., Tan M. L., Stevens R. D., Low Y. L., Muehlbauer M. J., Goh D. L., Ilkayeva O. R., Wenner B. R., Bain J. R., Lee J. J., Lim S. C., Khoo C. M., Shah S. H., Newgard C. B., Insulin resistance is associated with a metabolic profile of altered protein metabolism in Chinese and Asian-Indian men. *Diabetologia* 2010, 53, 757-767.
- [58] Patti M. E., Brambilla E., Luzi L., Landaker E. J., Kahn C. R., Bidirectional Modulation of Insulin Action by Amino Acids. *J Clin Invest* 1998, 101, 1519-1529.
- [59] Um S. H., Alessio D. D., Thomas G., Nutrient overload, insulin resistance, and ribosomal protein S6 kinase 1, S6K1. *CELL METABOLISM* 2006, 3, 393-402.
- [60] Ribeiro R. A., Bonfleur M. L., Amaral A. G., Vanzela E. C., Rocco S. A., Boschero A. C., Carneiro E. M., Taurine supplementation enhances nutrient-induced insulin secretion in pancreatic mice islets. *Diabetes Metab Res Rev* 2009, 25, 370-379.
- [61] Reeves P. G., Nielsen F. H., Fahey G. C., Jr., AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 1993, 123, 1939-1951.

Table 1. Composition of the diets

Ingredient (g/Kg)	Control	Low protein	High fat
Casein	140	71.5	140
Cornstarch	465.7	502.5	208.7
Dextrinised cornstarch	155	166.5	100
Sucrose	100	121	100
L-cystine	1.8	1	1.8
Fiber	50	50	50
Soybean oil	40	40	40
Mineral mix (AIN-93M)*	35	35	35
Vitamin mix (AIN-93M)*	10	10	10
Choline chlorydrate	2.5	2.5	2.5
Lard	-	-	312
Energy (Kcal/Kg)	3.88	3.88	5.44

* For details, see Reeves et al., [57]

Table 2. Total plasma proteins, NEFA, CHOL and TG from fasted C, CH, CHT, R, RH and RHT mice

	C	CH	CHT	R	RH	RHT
Total proteins (g/dL)	5.21 ± 0.3	5.63 ± 0.2	5.44 ± 0.1	3.77 ± 0.5*	5.58 ± 0.1 [#]	5.59 ± 0.3 [#]
NEFA (mmol/L)	1.04 ± 0.06	0.80 ± 0.06	0.91 ± 0.03	0.82 ± 0.08	1.09 ± 0.06 [#]	0.80 ± 0.07
Plasma CHOL (mg/dL)	96.12 ± 7.3	145.5 ± 6.7*	123.3 ± 7.7* ^{\$}	100.0 ± 6.8	134.5 ± 9.2 [#]	129.4 ± 6.3 [#]
Plasma TG (mg/dL)	69.20 ± 5.8	77.26 ± 3.9	77.46 ± 8.1	74.80 ± 11.9	71.57 ± 6.6	86.05 ± 5.1

Data are means ± SEM (n = 4-16). * P < 0.05 vs C; [#] P < 0.05 vs R; ^{\$} P < 0.05 vs CH.

Figure legends

Figure 1. **Taurine supplementation prevents obesity and hyperphagia in normal protein obese mice.** Body weight (BW) of (A) C, CH, CHT and (B) R, RH, RHT mice registered for 14 weeks (n = 5). Arrows indicate the beginning of the HFD treatment. (C) Total BW expressed by the area under growth curve. (D) Calorie intake registered during the last week of experimental period (n = 5-7). Data are means $\pm$ SEM; * different from C (P < 0.05); # different from R (P < 0.05).

Figure 2. **Taurine supplementation reduces adiposity and hyperleptinemia in normal protein obese mice.** (A) Periepididymal and (B) retroperitoneal fat pads in C, CH, CHT, R, RH and RHT mice (n = 10-12). (C) Plasma leptin in fasted mice (n = 5-7). Data are means $\pm$ SEM; * different from C (P < 0.05); # different from R (P < 0.05). \$ different from CH (P < 0.05).

Figure 3. **Taurine supplementation improves glucose but not insulin tolerance in normal protein obese mice.** (A) Plasma glucose (n = 8-11) and (B) insulin (n = 6-10) levels in fasted C, CH, CHT, R, RH and RHT mice. Changes in blood glucose during (C, D) ipGTT (n = 8-11) and (F, G) ipITT (n = 7-8). Total plasma glucose concentrations during (E) ipGTT and (H) ipITT expressed by the AUC. Data are means $\pm$ SEM; * different from C (P < 0.05); # different from R (P < 0.05).

Figure 4. Taurine supplementation improves glucagon and pyruvate-induced liver glucose output in obese mice. Changes in plasma glucose levels during **(A, B)** ipGITT (n = 5-7) and **(D, E)** ipPTT (n = 7-12) in C, CH, CHT, R, RH and RHT mice. Total plasma glucose concentrations during **(C)** ipGITT and **(F)** ipPTT expressed by the AUC. **(G)** Liver glycogen content (n = 4). Data are means $\pm$ SEM; * different from C (P < 0.05); # different from R (P < 0.05).

Figure 5. Taurine supplementation enhances insulin signaling in normal protein and AMPK phosphorylation in malnourished obese mice. **(A)** p-Akt^{ser473}/Akt protein expression in the liver from insulin-stimulated (100 μ L; 10⁻⁶ M) C, CH, CHT, R, RH and RHT mice (n = 4-6). **(B)** p-AMPK^{thr172}/AMPK protein expression in the liver from fasted C, CH, CHT, R, RH and RHT mice (n = 9-10). **(C)** Plasma adiponectin (n = 7-8). Data are means $\pm$ SEM; * different from C (P < 0.05); # different from R (P < 0.05). \$ different from CH (P < 0.05).

Figure 6. Taurine supplementation increases arginine plasma levels. Plasma **(A)** TAU, **(B)** arginine, **(C)** leucine, **(D)** valine and **(E)** isoleucine in fasted C, CH, CHT, R, RH and RHT mice (n = 4). Data are means $\pm$ SEM; * different from C (P < 0.05); # different from R (P < 0.05). \$ different from CH (P < 0.05). & P < 0.05 vs RH.

Figure 1

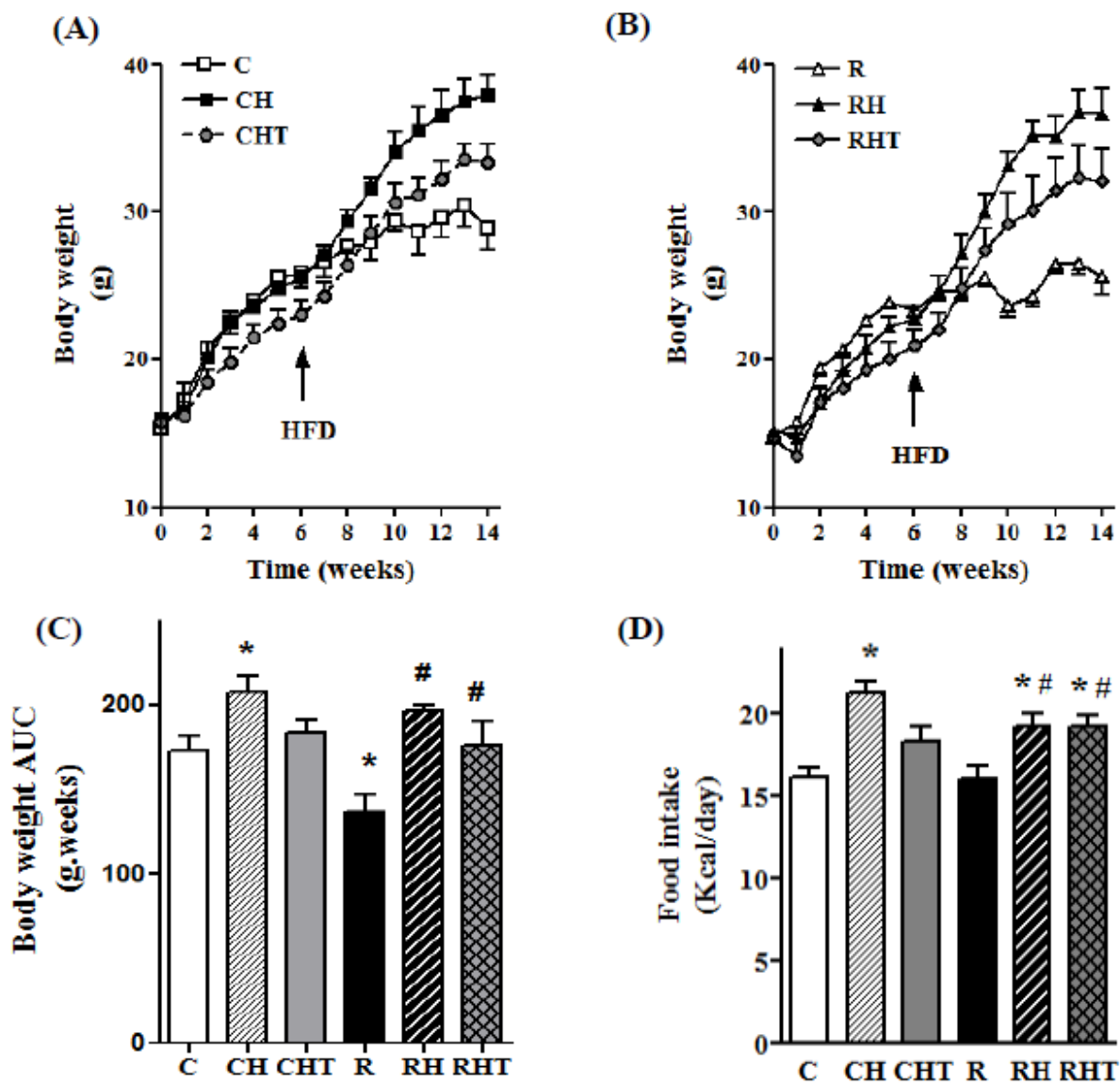


Figure 2

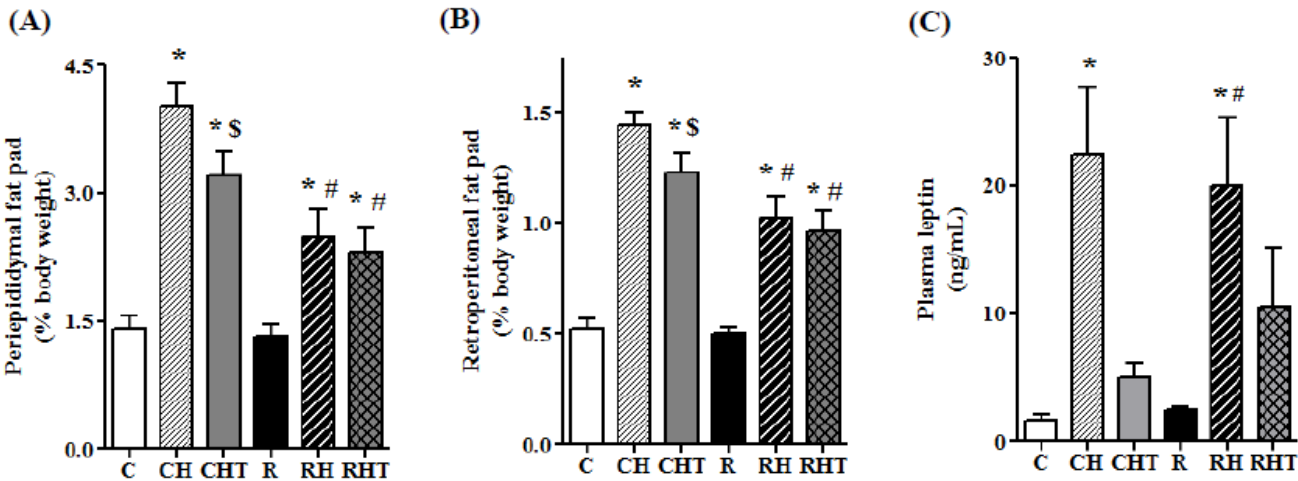


Figure 3

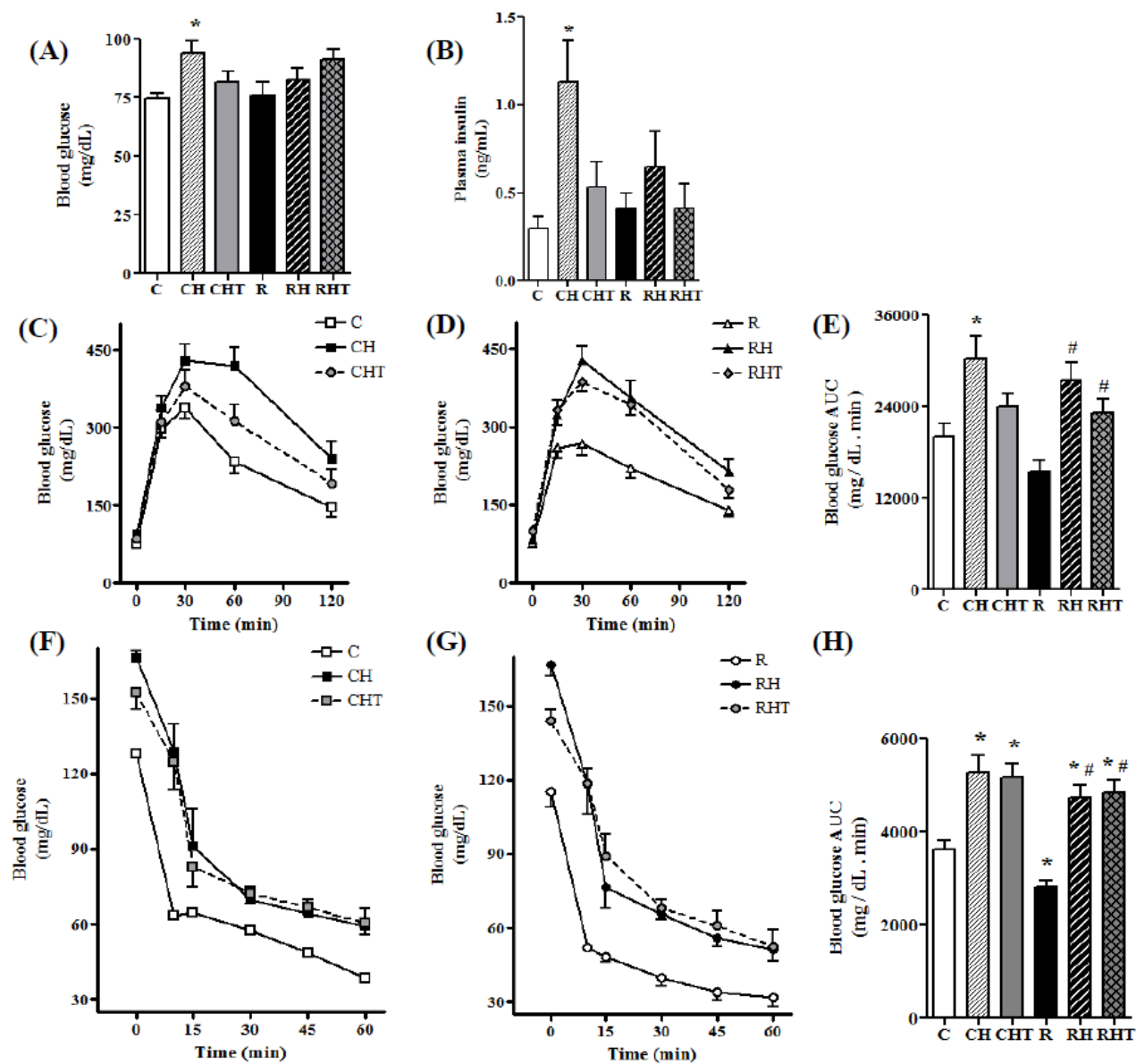


Figure 4

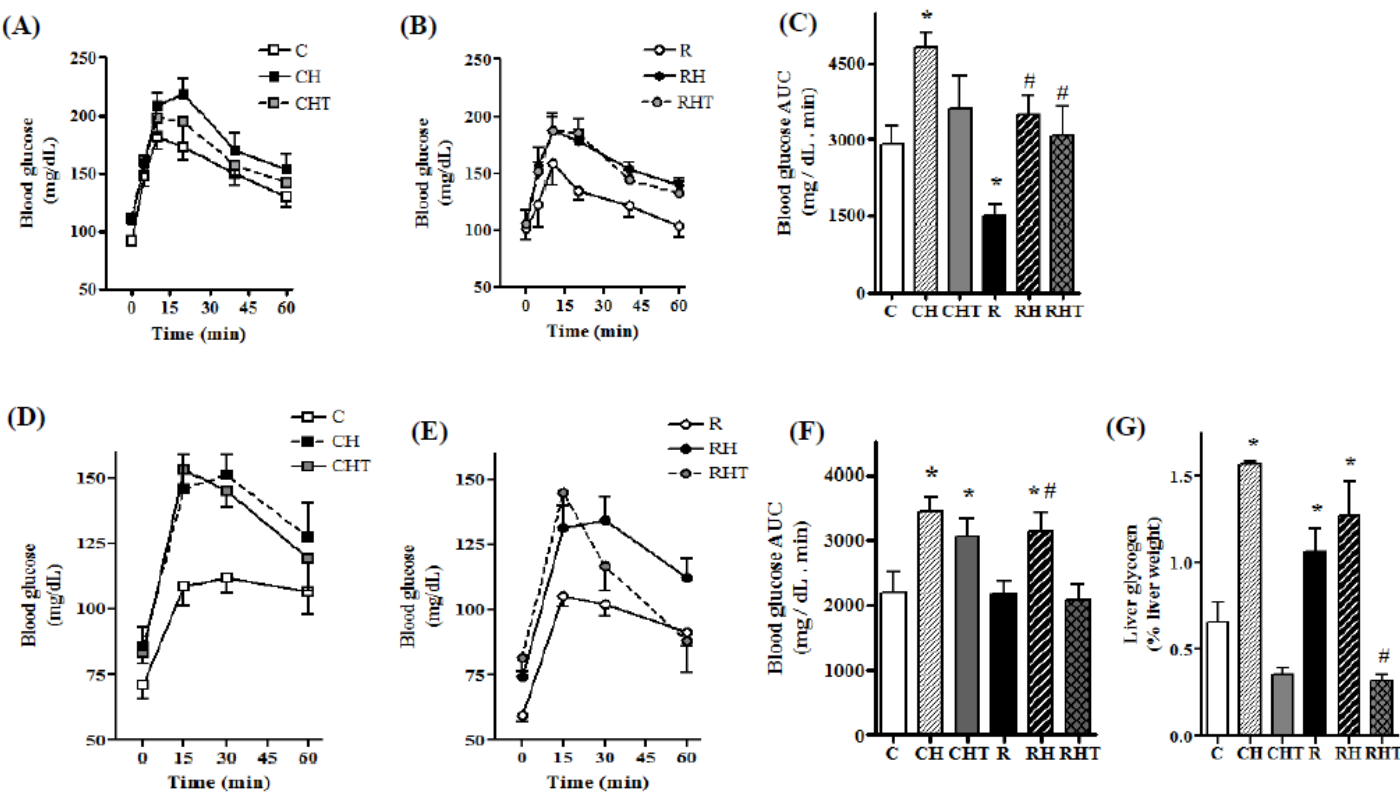


Figure 5

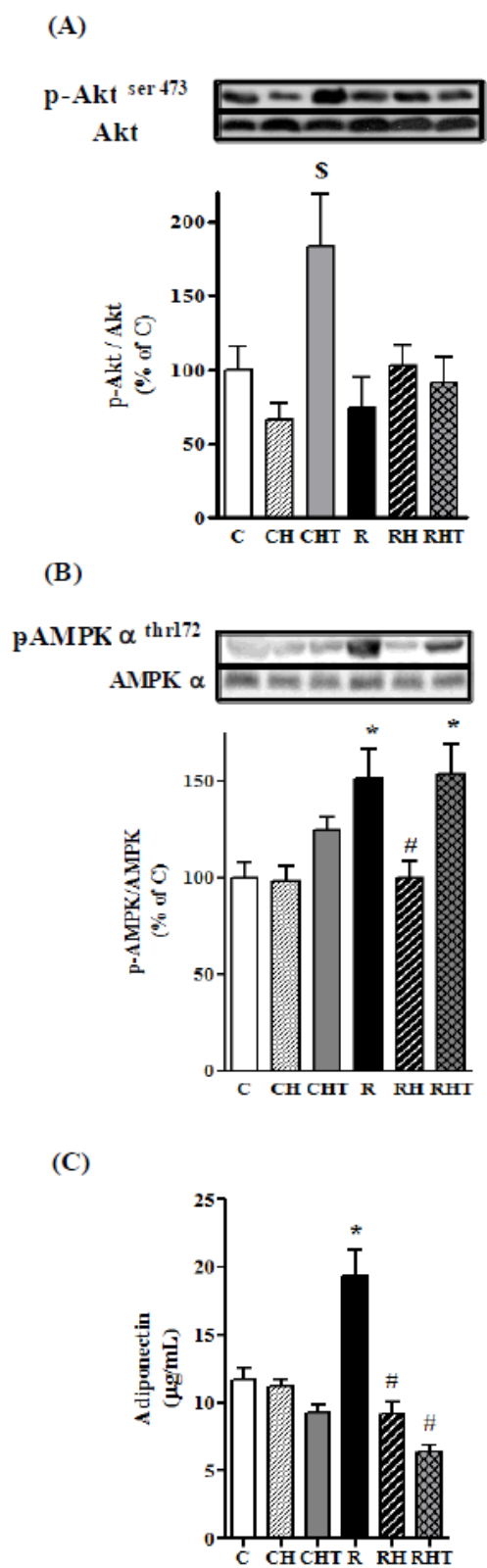
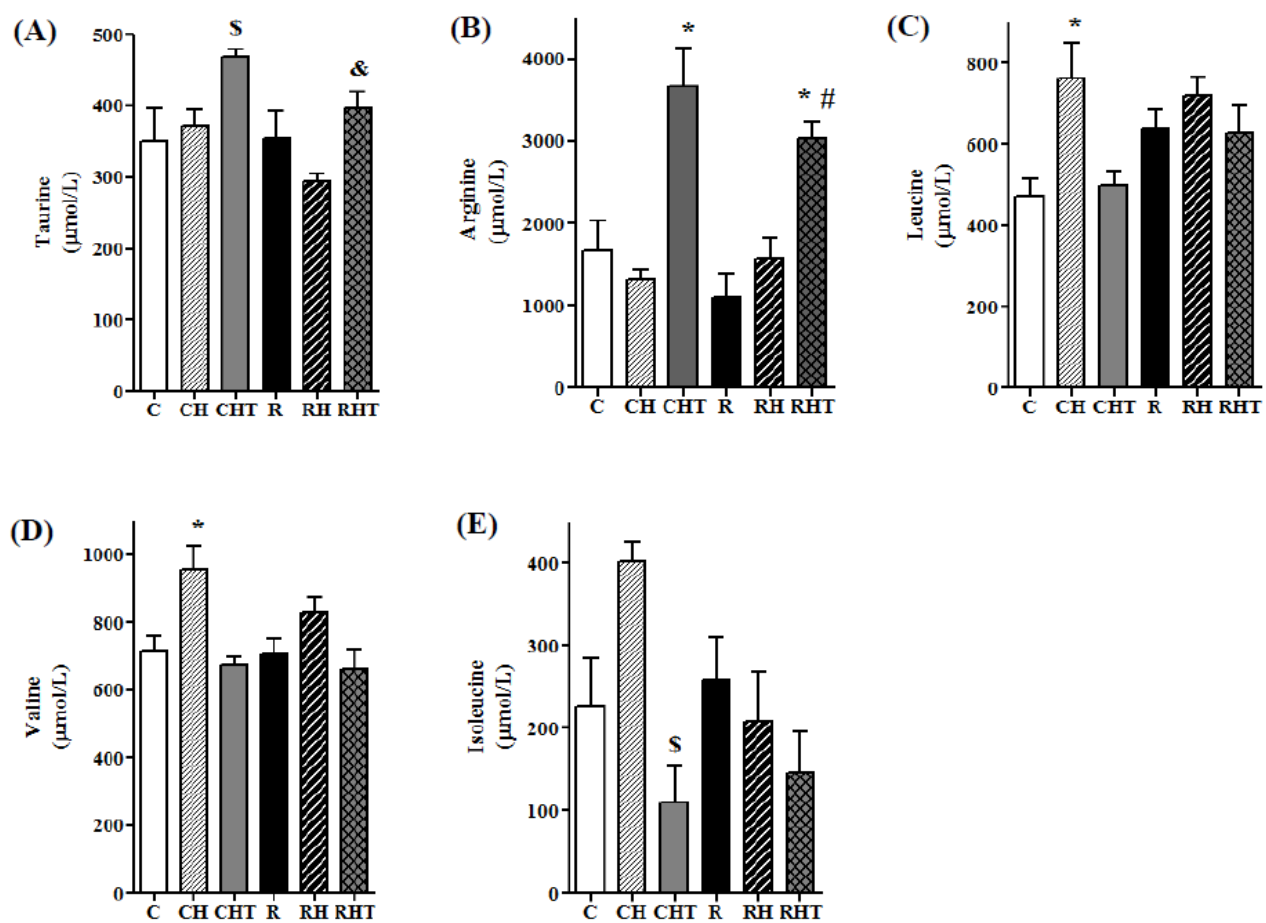


Figure 6



4.Artigo 2

MORFOLOGIA DO PÂNCREAS ENDÓCRINO E REGULAÇÃO DA SECREÇÃO DE INSULINA EM CAMUNDONGOS DESNUTRIDOS ALIMENTADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA E SUPLEMENTADOS COM TAURINA

Thiago M. Batista^{1*}, Rosane A. Ribeiro^{1, 2}, Priscilla M. R. da Silva¹, Rafael L. Camargo¹, Junia Carolina Santos-Silva¹, Jean Francisco Vettorazzi¹, Renato Chaves Souto Branco¹, Antonio C. Boschero¹ e Everardo M. Carneiro¹

¹Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil;

²Núcleo em Ecologia e Desenvolvimento Sócio-Ambiental de Macaé (NUPEM), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Macaé, RJ, Brasil;

4.1. Introdução

Em células β pancreáticas, o metabolismo da glicose gera sinais intracelulares que culminam na despolarização da membrana plasmática e abertura de canais de Ca^{2+} sensíveis a voltagem. O aumento do influxo de Ca^{2+} , por sua vez, ativa a maquinaria exocitótica levando à extrusão dos grânulos de insulina (Boschero & Malaisse, 1979; Hiriart & Aguilar-Bryan, 2008; Henquin, 2011).

Perturbações na disponibilidade de nutrientes durante a gestação comprometem o desenvolvimento de uma série de órgãos e sistemas como o eixo hipotálamo-hipófise, o fígado, músculos e tecido adiposo e o pâncreas endócrino (Remacle *et al.*, 2007). Essas alterações estão presentes mesmo após restauração das condições nutricionais e podem predispor ao desenvolvimento de doenças crônicas na vida adulta como a hipertensão, obesidade e o DM2 (Hales & Barker, 1992; Cherif *et al.*, 2001; Aubin *et al.*, 2012). Ilhotas pancreáticas de ratos desnutridos secretam menos insulina e aos 17 meses de idade a resistência a insulina e o DM2 estão instalados (Petry *et al.*, 2001; Reusens *et al.*, 2011; da Silva *et al.*, 2012). Estudos mostram que essas consequências da desnutrição estão associadas à redução da massa de células β e ao comprometimento de diversas etapas do mecanismo de secreção de insulina (Boujendar *et al.*, 2002; Zoppi *et al.*, 2010).

A taurina é um aminoácido semi-essencial envolvido na regulação da homeostase do Ca^{2+} e da secreção de insulina (Aerts & Van Assche, 2002; Carneiro *et al.*, 2009; Ribeiro *et al.*, 2012). Sua concentração se encontra reduzida no plasma de indivíduos diabéticos e ratos desnutridos (Franconi *et al.*, 1995; Cherif *et al.*, 1998; De Luca *et al.*, 2001). Dados de nosso grupo mostram que a suplementação com taurina normaliza a secreção de insulina em ratos desnutridos (Batista *et al.*, 2012) e previne a hipertrofia das ilhotas pancreáticas e a hipersecreção de insulina em camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica (Ribeiro *et al.*, 2012).

Nesse trabalho tivemos como objetivo investigar as alterações sobre a morfologia do pâncreas endócrino bem como a secreção de insulina e as oscilações de cálcio em ilhotas pancreáticas de camundongos desnutridos alimentados com dieta hiperlipídica. Também tivemos como objetivo determinar qual o papel da suplementação com taurina sobre o controle desse processo.

4.2. Materiais e métodos

4.2.1. Animais e dietas:

Em todos os experimentos foram utilizados camundongos *C57BL/6*, provenientes do Biotério Central da UNICAMP e foram divididos nos seguintes grupos:

- a) **Controle:** os animais receberam dieta normoprotéica/normocalórica logo após o desmame (30 dias de vida) por todo o período experimental (14 semanas).
- b) **Controle + Dieta Hiperlipídica (CH):** os animais receberam dieta normoprotéica/normocalórica logo após o desmame pelo período de 6 semanas e em seguida receberam dieta hiperlipídica por 8 semanas.
- c) **Controle + Dieta Hiperlipídica + Taurina (CHT):** os animais receberam dieta normoprotéica/normocalórica logo após o desmame pelo período de 6 semanas e em seguida receberam dieta hiperlipídica por 8 semanas. A suplementação com 5% de taurina na água de beber foi iniciada ao desmame.
- d) **Restritos (R):** os animais receberam dieta hipoprotéica/normocalórica logo após o desmame (30 dias de vida) por todo o período experimental (14 semanas).
- e) **Restritos + Dieta Hiperlipídica (RH):** os animais receberam dieta hipoprotéica/normocalórica logo após o desmame pelo período de 6 semanas e em seguida receberam dieta hiperlipídica por 8 semanas.
- f) **Restritos + Dieta Hiperlipídica + Taurina (RHT):** os animais receberam dieta hipoprotéica/normocalórica logo após o desmame pelo período de 6

semanas e em seguida receberam dieta hiperlipídica por 8 semanas. A suplementação com 5% de taurina na água de beber foi iniciada ao desmame.

Os camundongos foram mantidos no biotério setorial do departamento de Fisiologia, sob condição padronizada de iluminação (ciclo claro/escuro de 12 horas) e temperatura de 22 ± 2 °C.

As dietas descritas previamente foram adquiridas da empresa Pragsoluções (Jaú, SP). As dietas seguem as recomendações do Instituto Americano de Nutrição (AIN-93) para roedores na fase de manutenção e tiveram o teor de proteínas e lipídios manipulados de forma a gerarem as formulações hipoprotéica e hiperlipídica, respectivamente.

4.2.2. Histologia do pâncreas, imunohistoquímica para insulina e morfometria

A análise do aspecto histológico e da citoarquitetura do pâncreas endócrino dos animais dos diferentes grupos experimentais foi feita utilizando-se técnica histológica de rotina. Após o sacrifício dos camundongos por decapitação o pâncreas foi retirado, pesado e fixado em solução de Bouin (25% de formaldeído, 75% de ácido pícrico saturado e 5% de ácido acético) por 16h. Após a fixação, cada pâncreas foi desidratado em uma série ascendente de etanol e incluído em parafina (Histosec pastilhas, Merck). Em seguida foram obtidas secções semi-seriadas de 5 μ m (com espaçamento de 100 μ m entre cortes) até o esgotamento total do bloco. As lâminas obtidas e selecionadas foram processadas para imunohistoquímica.

A localização de células positivas para insulina foi realizada em cortes de pâncreas incluídos em parafina utilizando-se o método padrão de imunoperoxidase indireta. Resumidamente, os cortes de pâncreas (5 μ m) foram desparafinizados, hidratados e, após bloqueio da peroxidase endógena (com solução pronta do kit ImmunoCruz (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) e dos sítios inespecíficos (com 5% leite desnatado em TBS/Tween 20 0.1%), foram incubados

com anticorpo anti-insulina (Dako) (diluição 1:50 em TBS com 3% de leite desnatado) overnight à temperatura de 4°C. Após a imunorreação utilizando-se o kit adequado ImmunoCruz, as lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Ehrlich, desidratadas, diafinizadas e montadas em bálsamo sintético (Carvalho *et al.*, 2006).

As lâminas obtidas a partir da imunohistoquímica para insulina foram utilizadas para a análise morfométrica do pâncreas. Foram analisados os seguintes parâmetros: 1) área absoluta das ilhotas; 2) área absoluta de células β ; 3) área absoluta de células não β . Para tal, foram utilizados métodos estereológicos descritos na literatura, com pequenas modificações (Inuwa & El Mardi, 2005; Sone & Kagawa, 2005). Todas as ilhotas foram fotografadas com uma câmera digital (Nikon FDX-35) acoplada a um microscópio de luz (Nikon Elipse E800) e as imagens capturadas por um sistema de análise de imagens (Image Pro Plus for Windows). As medidas de área absoluta foram feitas utilizando o software livre ImageTool (<http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/itdesc.html>).

4.2.3. Isolamento de ilhotas pancreáticas de camundongos

Os camundongos foram sacrificados por decapitação e após incisão abdominal o fígado foi rebatido para expor a vesícula biliar e a porção proximal do ducto biliar comum. Utilizando-se de um fio cirúrgico o ducto pancreático foi obstruído à altura da ampola de Vater. Na porção distal do conduto biliar comum, abaixo da vesícula biliar foi realizada uma pequena incisão no ducto, para introduzir uma agulha de insulina, e em seguida a agulha foi fixada em sua posição por meio de um fio cirúrgico. Através dessa agulha foram injetados no pâncreas 2 a 3 ml de solução de Hanks com collagenase tipo V *Sigma* (0,8 mg/mL). O pâncreas foi retirado da cavidade abdominal por dissecação e transferido para um tubo de 15 ml. Em seguida foram adicionados mais 7 ml da solução de collagenase e o tubo foi mantido a 37°C durante 11 min. Ao final desse período, foi realizada uma pequena agitação de 30 segundos para facilitar a desagregação do tecido pancreático. A digestão do tecido foi interrompida

mediante a adição de Hanks a 4 °C. O conteúdo do tubo foi centrifugado e o sobrenadante desprezado 3 vezes para a remoção da collagenase e fragmentos celulares. As ilhotas, completamente separadas do tecido acinar, foram coletadas uma a uma, sob lupa, por aspiração com o auxílio de pipeta *Pasteur*, previamente estirada e siliconizada.

4.2.4. Fragmentação de DNA

Grupos de 20 ilhotas foram separados e o DNA íntegro e fragmentado foi separado e extraído pelo método trizol/triton (Santos *et al.*, 2011). Ambas as frações foram quantificadas a partir de uma curva padrão de DNA utilizando o corante fluorescente Sybr-green. Os dados de fragmentação são expressos como porcentagem de DNA fragmentado em relação ao DNA total, calculado pela soma da fração íntegra e fragmentada.

4.2.5. Secreção estática de insulina

Grupos de 4 ilhotas pancreáticas dos diferentes grupos experimentais foram transferidas para placas de cultura com 24 poços contendo 0,5 ml de solução de Krebs acrescida de 0.3% de albumina bovina (m/v) e 5.6 mM de glicose. As placas foram acondicionadas em banho-maria a 37°C e mantidas em ambiente controlado (umidificado e gaseificado com 95% O₂/5% CO₂) por 45 min. A solução de pré-incubação foi rapidamente removida e substituída por nova solução de incubação contendo 2.8, 11.1 ou 22.2 mM de glicose. Após 60 min de incubação, as placas tiveram o sobrenadante removido, transferido para tubos de ensaio e armazenado a -20 °C para posterior dosagem de insulina por radioimunoensaio (Ribeiro *et al.*, 2009).

4.2.6. Registro do cálcio citoplasmático em ilhotas pancreáticas

Ilhotas pancreáticas isoladas dos grupos estudados foram lavadas em solução de Krebs e incubadas em 2 ml de Krebs contendo 5.6 mM de glicose durante 1 h. Em seguida foi adicionado 1 µM fura-2/AM dissolvido em DMSO (0.1%) e mantido por 2 h adicionais em estufa gaseificada com 95% O₂/5% CO₂ a 37°C. Posteriormente, uma ilhota foi transferida para uma lâmina de vidro

previamente tratada com poli-lisina e perfundida na presença de glicose nas concentrações de 2.8 e 11.1 mM. Os registros das oscilações de Ca^{2+} foram obtidos por sistema de análise de imagem apropriado. As ondas excitatórias de 340 e 380 nm foram selecionadas por uma fonte de luz de xenônio e a emissão será de 510 nm. A mudança no Ca^{2+} citoplasmático foi detectada como uma mudança na proporção F340/F380 (Quesada *et al.*, 2002).

4.2.7. Western blot

Ilhotas pancreáticas foram homogenizadas com o auxílio de um sonificador (Brinkmann Instruments, Westbury, NY, USA), em tampão de extração contendo Tris pH 7.5 100 mmol/L, pirofosfato de sódio 10 mmol/L, fluoreto de sódio 100 mmol/L, EDTA 10 mmol/L, ortovanadato de sódio 10 mmol/L, PMSF 2 mmol/L e Triton X-100 1%. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 12,000 rpm por 15 min. Do sobrenadante coletado, uma alíquota foi utilizada para quantificação protéica pelo método de Bradford (1976). As amostras foram então incubadas a 100 °C por 5 min em 25% do volume de Tampão de Laemmli 5X (Azul de bromofenol 0.1%, fosfato de sódio 1M, glicerol 50%, SDS 10%). Para corrida eletroforética foi utilizado gel bifásico: gel de empilhamento (EDTA 4mM, SDS 2%, Trisma base 750mM, pH 6.7) e gel de resolução (EDTA 4mM, SDS 2%, Trisma base 50mM, pH 6.7). A corrida foi efetuada a 90V por aproximadamente 180min com Tampão de Corrida (Trisma base 200mM, glicina 1.52M, EDTA 7.18mM e SDS 0.4%), diluído 1:4. As amostras foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (BioRad). A transferência foi realizada durante 120min a 120V em gelo, banhada com Tampão de Transferência (Trisma base 25mM, glicina 192mM). Após transferência, as membranas foram bloqueadas com 5% de leite desnatado em solução de TBS/T por 2h a temperatura ambiente ou *overnight* a 4°C. Em seguida as membranas foram lavadas 3 vezes por 5 minutos e incubadas *overnight* a 4°C com soluções de TBS/T acrescida de 3% de albumina bovina sérica contendo os seguintes anticorpos primários: PCNA (1:1000; Cell Signaling), p-Akt^{thr 308} (1:1000; Santa Cruz); Akt (1:1000; Santa Cruz); p-ERK_{1/2} (1:1000; Santa Cruz), ERK_{1/2} (1:1000; Santa Cruz), p-STAT3 (1:1000; Cell Signaling) e STAT3

(1:1000; Cell Signaling). A detecção foi realizada após 2h de incubação com anticorpo secundário conjugado com horseradish peroxidase (diluição 1:10000 em TBS/T com 5% de leite desnatado). A intensidade das bandas foi avaliada por densitometria pelo programa Image J (NIH, USA) e os valores foram expressos em % em relação ao grupo controle (C). As proteínas fosforiladas foram normalizadas pela sua forma total e a PCNA foi normalizada pela densidade óptica do padrão de bandas após coloração com a solução de Ponceau-S (Sigma).

4.2.8. Interleucina (IL)-6 plasmática

A concentração de IL-6 plasmática foi determinada utilizando kit comercial Milliplex baseado na tecnologia Luminex xMAP (Millipore; Billerica, USA) de acordo com as instruções do fabricante.

4.2.9. Análise dos resultados

Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão e foram analisados pela análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do *post test* de Duncan utilizando o software STATISTICA 5.0. O nível de significância adotado foi de $P < 0,05$.

4.3. Resultados

4.3.1 Peso e composição corporal

A tabela 1 mostra o peso corpóreo e o peso absoluto e relativo do pâncreas e cérebro dos diferentes grupos experimentais ao final do tratamento. O peso corpóreo dos camundongos R foi menor em relação a C ($P < 0,05$). Os grupos CH e RH tiveram maior peso em relação a C e a R, respectivamente ($P < 0,001$). Camundongos CHT tiveram o peso semelhante a C enquanto que o peso de RHT foi significativamente elevado em relação a R ($P < 0,001$). O peso absoluto e relativo do pâncreas dos camundongos R foi menor em relação a C ($P < 0,001$ e $P < 0,01$, respectivamente) e o peso absoluto desse órgão em CH e RH foi maior que em C e R, respectivamente ($P < 0,01$ e $P < 0,001$). Não houve diferenças no peso absoluto do cérebro entre os grupos, porém camundongos R apresentaram

maior peso relativo desse órgão em relação a C ($P < 0,001$). Ainda com relação ao cérebro, verificou-se menor peso relativo nos CH e RH em relação aos seus respectivos controles ($P < 0,01$ e $P < 0,001$, respectivamente). Não houve influência da suplementação com taurina sobre esses parâmetros.

4.3.2. Avaliação morfométrica do pâncreas endócrino

A figura 1A-F ilustra cortes histológicos do pâncreas dos diferentes grupos experimentais após marcação das células positivas para insulina. A análise morfométrica indica somente aumento na área total das ilhotas do grupo CHT em relação a C ($P < 0,05$; Fig 1G). A maior área das ilhotas de CHT foi acompanhada de aumento tanto de células β quanto de células não- β ($P < 0,05$; Fig 1H-I). Ainda, a comparação somente entre dois grupos, analisada por teste t de Student, revela aumento da área de células β no grupo CH em relação a C ($P < 0,05$; Fig 1H).

4.3.3. Fragmentação e conteúdo total de DNA

O percentual de DNA fragmentado foi menor nas ilhotas isoladas de camundongos R em relação às ilhotas do grupo C ($P < 0,001$; Fig 2A). Contudo, ilhotas do grupo RH apresentaram maior fragmentação de DNA quando comparadas com ilhotas R ($P < 0,05$). A suplementação com taurina reduziu a fragmentação do DNA nas ilhotas CHT ($P < 0,05$) e RHT ($P < 0,001$) em relação às ilhotas C. O conteúdo total de DNA nas ilhotas não diferiu entre os grupos experimentais (Fig 2B).

4.3.4. Expressão da PCNA em ilhotas pancreáticas

Em seguida avaliamos a expressão do antígeno nuclear de células em proliferação (PCNA), um marcador de proliferação celular, nas ilhotas dos grupos em estudo (Fig 3). A expressão da PCNA foi maior nos grupos CH e CHT em relação a C ($P < 0,05$).

4.3.5. Secreção e conteúdo de insulina em ilhotas isoladas

A figura 4A ilustra a secreção de insulina normalizada pelo conteúdo de DNA em ilhotas isoladas e estimuladas com 2,8, 11,1 e 22,2 mM de glicose. Em todas as concentrações de glicose avaliadas, a secreção de insulina foi menor no

grupo R em relação ao C ($P < 0,05$). Ilhotas isoladas de camundongos R submetidos à dieta hiperlipídica hipersecretaram insulina em todas as concentrações de glicose avaliadas ($P < 0,05$). Contudo, ilhotas CH apresentaram hipersecreção somente em resposta a 22.2 mM de glicose ($P < 0,05$). Nessa concentração de glicose, a hipersecreção foi prevenida em CHT que apresentou valores similares às ilhotas C. Em todas as concentrações de glicose avaliadas, a secreção foi semelhante entre R e RHT.

Além da secreção, o conteúdo total de insulina foi menor nas ilhotas R quando comparado às C ($P < 0,05$; Fig 4B). O tratamento com dieta hiperlipídica promoveu aumento do conteúdo de insulina nos grupos RH e RHT quando comparado com R ($P < 0.05$).

4.3.6. Oscilações de Ca^{2+} citoplasmático em ilhotas isoladas

Na presença de alta concentração de glicose (11.1 mM), as ilhotas apresentaram um aumento transiente de Ca^{2+} , seguido por oscilações cujas características variaram de acordo com o grupo experimental (Fig 5A-F). Ilhotas de camundongos R apresentaram maior frequência de oscilações em relação a C ($P < 0.01$; Fig 5G). Em todos os grupos alimentados com dieta hiperlipídica houve redução na frequência de oscilações (Fig. 5G; $P < 0.01$), sem influência da suplementação com taurina. A amplitude das oscilações apresentadas por R foram significativamente menores que em C ($P = 0.01$; Fig 5H). Os grupos alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram maior amplitude das oscilações ($P < 0.05$), com exceção de CHT que teve amplitude semelhante a C.

4.3.7. Fosforilação e expressão da Akt e $ERK_{1/2}$ em ilhotas pancreáticas

Análise de expressão protéica por western blot revelou que o conteúdo fosforilado e total da proteína quinase homóloga ao oncogene viral de timoma murino (Akt) e da proteína quinase regulada por sinais extracelulares ($ERK_{1/2}$) não diferiu entre os grupos experimentais (Figura 6).

4.3.8. Fosforilação da Stat 3 e IL-6 plasmática

A fosforilação do fator de transcrição Stat 3, foi cerca de 2 vezes maior nas ilhotas de camundongos CH e CHT em relação a C ($P < 0,05$; Fig 7A). A concentração plasmática de IL-6 foi maior no plasma de CH em relação a todos os grupos ($P < 0,05$; Fig 7B).

Tabela 1. Peso absoluto e relativo do pâncreas e cérebro de camundongos C, CH, CHT, R, RH e RHT.

	C	CH	CHT	R	RH	RHT
Peso Corpóreo (g)	26,34± 0,4	36,02± 1,8*	32,47± 1,4	19,61± 0,8*	30,51± 1,4 [#]	32,43± 1,4 [#]
Pâncreas (mg)	202,8± 6,9	261,4± 15,6*	249,7± 14,8*	95,33± 3,7*	186,0± 8,5 [#]	201,8± 12,4 [#]
Pâncreas (%)	0,77± 0,02	0,73± 0,05	0,73± 0,03	0,48± 0,02*	0,61± 0,03	0,62± 0,04
Cérebro (mg)	432,0±4,88	451,6±6,35	458,9±7,48	414,7±1,85	434,1±9,70	448,8±9,75
Cérebro (%)	1,64±0,03	1,27±0,06*	1,36±0,04*	2,12±0,08*	1,44±0,08 [#]	1,39±0,06 [#]

Valores representam média ± EPM, n = 3-7. * P < 0,05 em relação a C, # P < 0,05 em relação a R (ANOVA de uma via e pós-teste de Duncan).

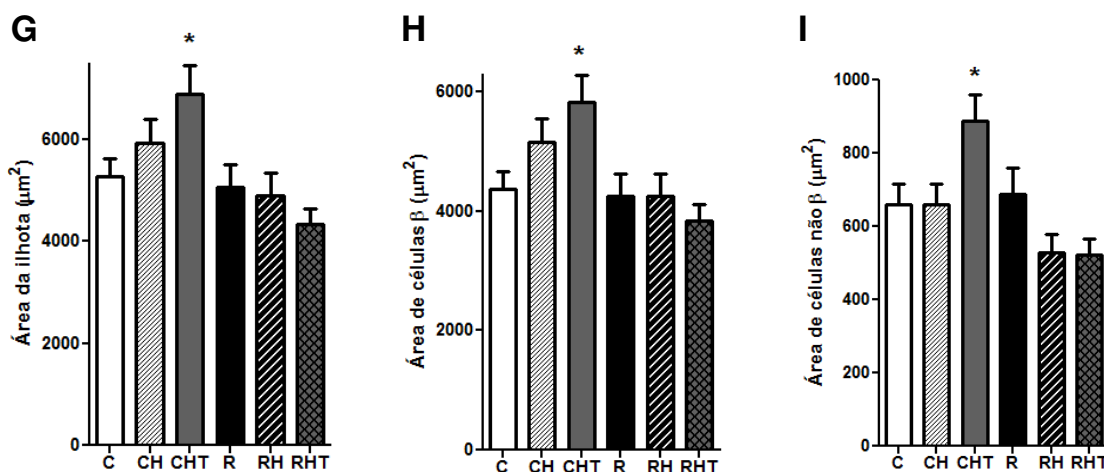
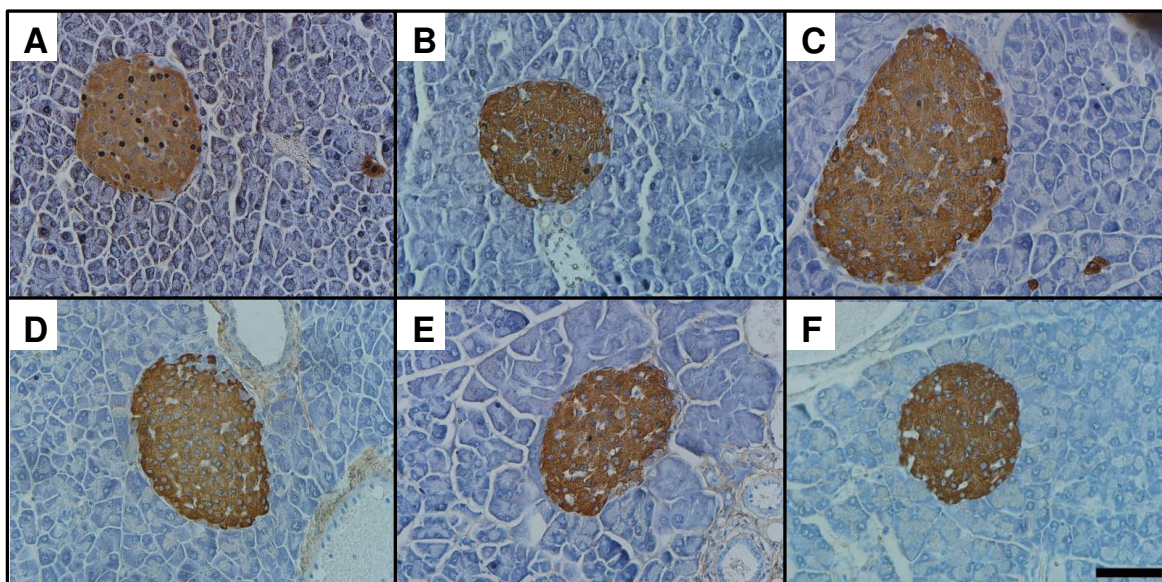


Figura 1. Análise morfométrica do pâncreas de camundongos **A)** C (n = 464 ilhotas), **B)** CH (n = 507), **C)** CHT (n = 574), **D)** R (n = 265), **E)** RH (n = 490) e **F)** RHT (n = 644). Após imonohistoquímica para insulina, foram calculadas a **G)** área total das ilhotas, **H)** Área de células β e **I)** Área de células não- β . Valores representam média $\pm$ EPM; * P < 0,05 em relação a C (ANOVA de uma via e pós-teste de Duncan). Barra de escala: 50 μm ; Aumento: 40x.

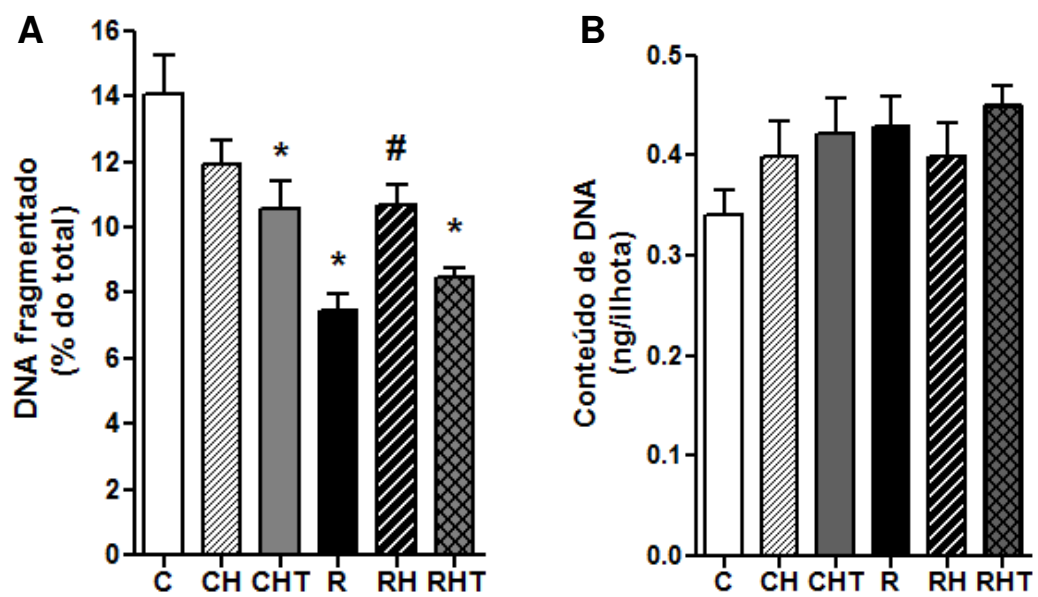


Figura 2. **A)** Conteúdo total de DNA por ilhota e **B)** Porcentagem de fragmentação. Valores representam média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ em relação a C; # $P < 0,05$ em relação a R (ANOVA de uma via e pós-teste de Duncan).

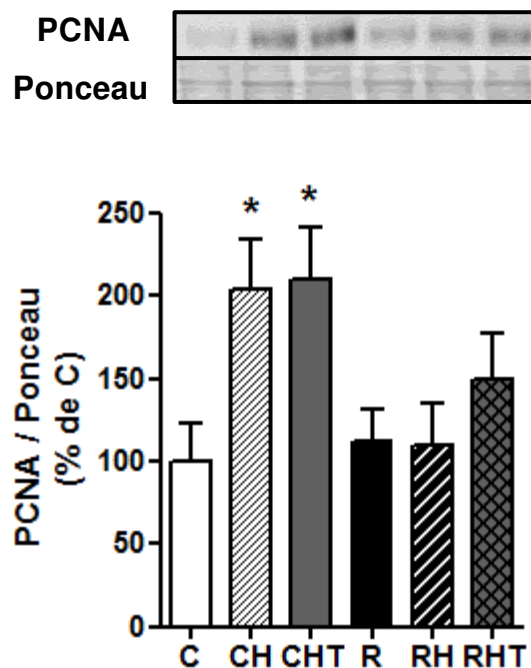


Figura 3. Expressão da PCNA em ilhotas pancreáticas de camundongos C, CH, CHT, R, RH e RHT. Os dados de PCNA foram normalizados pelo padrão de bandas obtido com o corante Ponceau-S. Valores representam média $\pm$ EPM, * $P < 0,05$ em relação a C, $n = 4-6$. (ANOVA de uma via e pós-teste de Duncan).

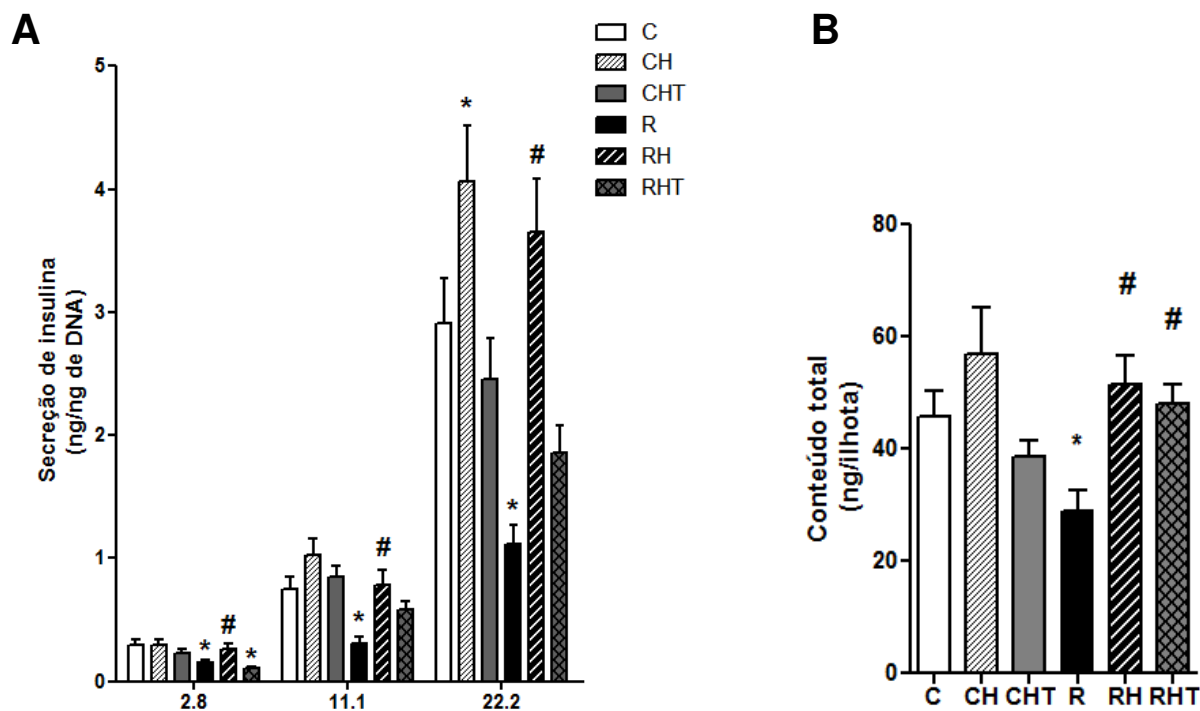


Figura 4. A) Secreção estática de insulina de camundongos C, CH, CHT, R, RH e RHT. As ilhotas foram pré-incubadas em solução de Krebs contendo 5.6 mM de glicose durante 30 min. Após a retirada do líquido de pré-incubação, as ilhotas foram expostas à solução de Krebs contendo 2.8, 11.1 e 22.2 mM de glicose; n = 18 grupos de 4 ilhotas por condição **B)** Conteúdo total de insulina por ilhota; n = 18 grupos de 4 ilhotas. Valores representam média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ em relação a C; # $P < 0,05$ em relação a R (ANOVA de uma via e pós-teste de Duncan).

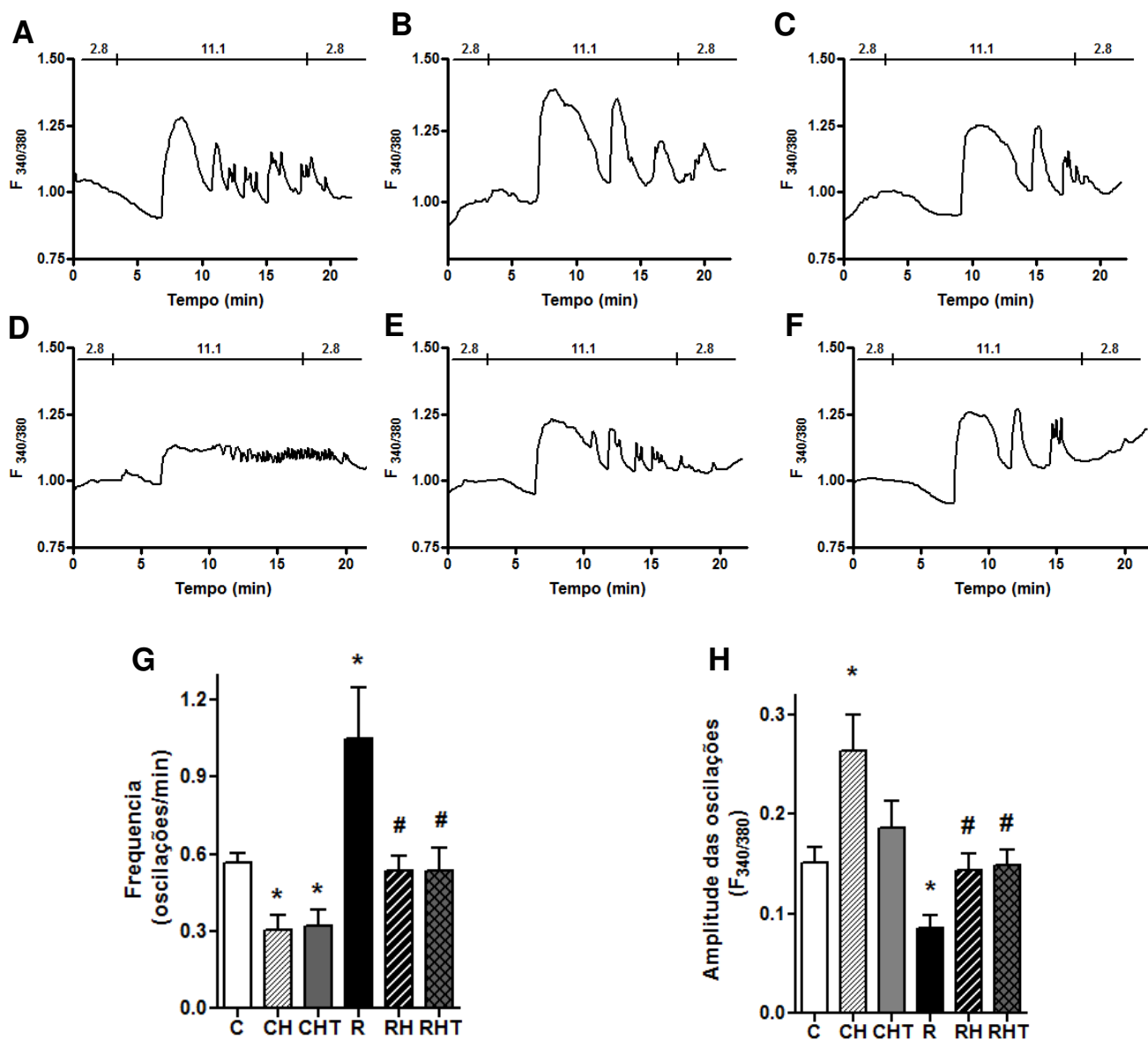


Figura 5. Mudanças na razão de fluorescência para cálcio intracelular em ilhotas isoladas de camundongos **A)** C, **B)** CH, **C)** CHT, **D)** R, **E)** RH e **F)** RHT. Barras acima dos traços representam início da perfusão com 2.8 e 11.1 mM de glicose. **G)** Frequência e **H)** Amplitude das oscilações durante estímulo com glicose 11.1 mM. Valores representam média $\pm$ EPM, $n = 6-7$. * $P < 0,05$ em relação a C; # $P < 0,05$ em relação a R; (ANOVA de uma via e pós teste de Duncan).

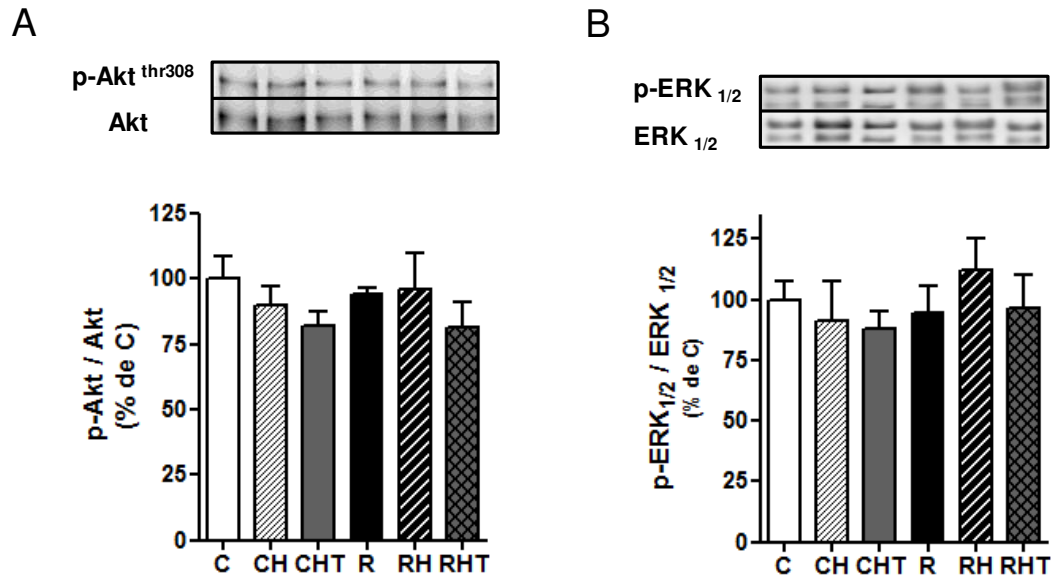


Figura 6. Fosforilação da **A)** Akt (p-Akt^{thr308}) e **B)** ERK_{1/2} (p-ERK_{1/2}) em ilhotas pancreáticas de camundongos C, CH, CHT, R, RH e RHT. Os dados de p-Akt^{thr308} e p-ERK_{1/2} foram normalizados pela Akt total e pela ERK_{1/2} total, respectivamente. Valores representam média ± EPM, n = 4-6. P > 0,05 (ANOVA de uma via).

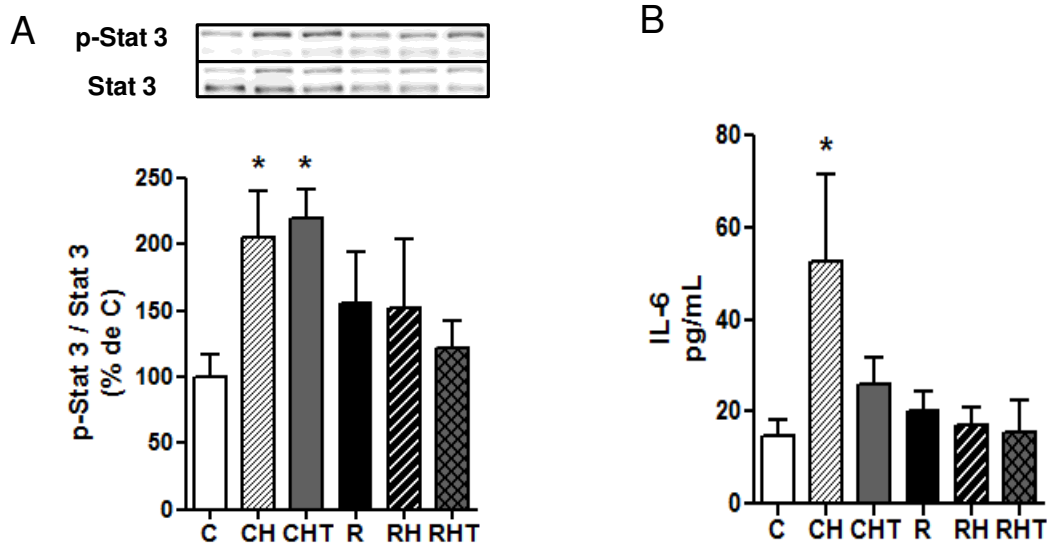


Figura 7 A) Fosforilação da Stat 3 (p-Stat 3) em ilhotas pancreáticas de camundongos C, CH, CHT, R, RH e RHT, n = 4-6. Os dados p-Stat 3 foram normalizados pela Stat 3 total. **B)** IL-6 plasmática de camundongos em jejum, n = 7-13. Valores representam média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ em relação a C (ANOVA de uma via e pós teste de Duncan).

4.4. Discussão

Vários estudos já correlacionaram o baixo peso ao nascer e a má nutrição em estágios iniciais da vida com maior risco para o desenvolvimento de doenças crônicas na vida adulta (Hales & Barker, 1992; Cianfarani *et al.*, 1999; Sawaya *et al.*, 2003). Perturbações nutricionais durante a gestação ativam uma reprogramação *in utero* em que tecidos mais nobres como o cérebro são favorecidos à custa de outros como músculos, rins e o pâncreas endócrino (Hales & Barker, 1992). Nesse sentido, o tecido muscular de indivíduos adultos que tiveram baixo peso ao nascer apresentou maior expressão de IRS-1, porém menor expressão e fosforilação da Akt após infusão de insulina (Jensen *et al.*, 2008). Nossos achados sugerem que essa reprogramação possa estar presente na restrição protéica após o desmame uma vez que a massa cerebral relativa foi maior nos camundongos desnutridos e o peso do pâncreas foi reduzido (Tabela 1).

Anteriormente descrevemos pela primeira vez no modelo animal de desnutrição pós-desmame seguido de obesidade induzida por dieta hiperlipídica, o desenvolvimento de intolerância a glicose, resistência a insulina e alterações no controle da produção hepática de glicose (Batista *et al.*, Artigo 1). Embora essas características tenham se instalado na mesma magnitude que a observada nos grupos alimentados com dieta normoprotéica, os camundongos desnutridos apresentaram duas características distintas que foram o padrão de crescimento compensatório, ou *catch up growth* (Fig 1C, Artigo 1), e a ausência de hiperinsulinemia (Fig 3B, Artigo 1). Sabe-se que a resistência periférica a insulina pode ser compensada por longos períodos com a expansão da massa de células β e da secreção de insulina e que o DM2 efetivamente se instalará nos indivíduos que apresentarem falhas nesse mecanismo compensatório (Prentki & Nolan, 2006; Remacle *et al.*, 2007). Portanto, tivemos como objetivo nesse estudo realizar a caracterização morfológica e funcional do pâncreas endócrino dos grupos em estudo.

Menor secreção de insulina estimulada por glicose e aminoácidos já foi descrita em ilhotas fetais de ratos submetidos a desnutrição intrauterina (Cherif *et*

al., 1998; Cherif *et al.*, 2001). Esses efeitos já foram associados com menor massa de células β decorrente de menor relação entre proliferação celular e apoptose (Boujendar *et al.*, 2002). Em nosso estudo não identificamos alterações morfológicas nas ilhotas de camundongos desnutridos e a fragmentação de DNA se mostrou reduzida nessas ilhotas, sugerindo menor taxa de morte celular. Esses contrastes com os achados em ilhotas de ratos submetidos a desnutrição intrauterina mostram que a restrição protéica durante o desenvolvimento traz repercussões mais severas para a estrutura e o funcionamento do pâncreas endócrino e isso pode refletir em maior predisposição ao desenvolvimento de doenças crônicas. Outros estudos mostraram em ilhotas de ratos submetidos a restrição protéica após o desmame, ao contrário do observado em nosso estudo, redução na área e massa de células β bem como menor fosforilação da proteína mitogênica ERK_{1/2} (Giozzet *et al.*, 2008; Rafacho *et al.*, 2009). Até o momento podemos somente especular que as adaptações morfológicas induzidas pelo mesmo protocolo de restrição protéica possam diferir entre espécies. Contudo, as ilhotas dos camundongos R apresentaram menor secreção e conteúdo de insulina. Nesse sentido, nosso grupo já demonstrou que a desnutrição protéica altera diversas etapas do mecanismo de secreção de insulina incluindo o metabolismo da glicose, a extrusão dos grânulos e a expressão dos componentes das vias de amplificação da secreção (Giozzet *et al.*, 2008; Amaral *et al.*, 2010; Soriano *et al.*, 2010; Batista *et al.*, 2012).

A análise morfométrica revelou hipertrofia das ilhotas no grupo CHT (Fig 1G-I) e maior expressão do marcador de proliferação, a PCNA (Fig 3). Evidências da literatura corroboram esses achados mostrando que em diferentes situações a taurina altera as características morfológicas das ilhotas pancreáticas. A suplementação de camundongos controle com 0.05% de taurina por 4 semanas foi suficiente para induzir aumento no tamanho e número de ilhotas pancreáticas (El Idrissi *et al.*, 2009). Em camundongos não obesos diabéticos (NOD), a suplementação com 2.5% de taurina aumentou a área de células β e a massa de ilhotas pancreáticas. Esses achados foram combinados com maior marcação imunohistoquímica para o antígeno nuclear de células em proliferação (PCNA) e

do fator de crescimento semelhante a insulina – II (IGF-II) e com menor número de células apoptóticas (Arany *et al.*, 2004). Em outro modelo de diabetes espontâneo, o rato OLETF, a suplementação com taurina promoveu aumento da massa de células β e redução da apoptose e fibrose nas ilhotas desses roedores (Lee *et al.*, 2011). A redução da fragmentação de DNA encontrada nos grupos CHT e RHT (Fig 2B) também vai ao encontro desses achados de redução da apoptose em roedores suplementados com taurina.

Embora nossos achados corroborem outros estudos envolvendo suplementação com taurina e proliferação celular, o mecanismo pelo qual esse aminoácido regula esses processos ainda é obscuro. Um possível mecanismo envolvido com o aumento da proliferação celular observado é o aumento da fosforilação do fator de transcrição Stat3 (Fig 7A). Em células β , a expressão de uma forma constitutivamente ativa da Stat3 leva ao aumento da proliferação e da secreção de insulina (Tsukiyama *et al.*, 2006). Os fatores de transcrição da família Stat estão envolvidos com a sinalização de uma ampla classe de fatores de crescimento, citocinas e hormônios. Em nosso estudo, camundongos CH, apresentaram aumento na concentração plasmática de IL-6 (Fig 7B) que poderia, portanto, explicar o aumento da fosforilação da Stat3. O grupo CHT, no entanto, apresentou níveis normais de IL-6 no plasma. Uma possibilidade para a maior fosforilação da Stat3 em CHT seria pela ativação do receptor de insulina pela taurina como já demonstrado anteriormente (Maturo *et al.*, 1980; Carneiro *et al.*, 2009). Embora não tenham sido observadas alterações na ativação/expressão da Akt e ERK (Fig 6), dois efetores *downstream* da via de sinalização da insulina, já foi demonstrado que esse hormônio pode levar à ativação da Stat3 de maneira independente da ativação dos ramos da PI3K e das proteínas quinase ativadas por mitógenos (MAPK) que compõem essa via (Coffer *et al.*, 1997).

Em nosso estudo, a hipertrofia das ilhotas em CHT foi associada ao aumento de células β e não- β (Fig 1H-I). O envolvimento da taurina com os demais tipos celulares da ilhota pancreática é menos conhecido. A taurina se encontra acumulada cerca de 5 vezes mais nas ilhotas de Langerhans em relação

à porção exócrina do pâncreas. Dentro das ilhotas, esse aminoácido está localizado primariamente nas células α e δ (Bustamante *et al.*, 2001).

Camundongos suplementados com taurina apresentaram maior concentração plasmática de glucagon e maior secreção desse hormônio em ilhotas isoladas (Ribeiro *et al.*, 2009). Dessa forma, os efeitos insulíntrópicos da taurina poderiam, em parte, ser explicados por regulação parácrina através do estímulo da secreção de glucagon.

Tendo em vista a importância do influxo citoplasmático de Ca^{2+} sobre a secreção de insulina, avaliamos em seguida as oscilações de Ca^{2+} induzidas por 11.1 mM de glicose em ilhotas isoladas (Fig 5). Em nosso estudo verificamos que ilhotas de camundongos R apresentam maior frequência de oscilações com menor amplitude. Estudos eletrofisiológicos em ilhotas isoladas de camundongos desnutridos mostram que no estado basal (3 mM glicose) há hiperpolarização da membrana plasmática provocada por maior atividade do canal K_{ATP} . Na presença de 8 mM de glicose, o fechamento desses canais foi significativamente menor em ilhotas de camundongos desnutridos. Nessas ilhotas a expressão da subunidade regulatória SUR1 do K_{ATP} foi significativamente maior (Soriano *et al.*, 2010). Ainda, menor expressão da subunidade β_2 do canal Ca^{2+}_v também já foi descrita em ilhotas de camundongos desnutridos (Amaral *et al.*, 2010). Em conjunto, esses estudos demonstraram alterações na homeostase do Ca^{2+} em ilhotas de camundongos desnutridos por mecanismos que envolvem tanto o canal K_{ATP} quanto o Ca^{2+}_v .

Observamos que o tratamento com dieta hiperlipídica também produziu alterações na homeostase do Ca^{2+} . Ilhotas isoladas de camundongos CH e RH apresentaram maior amplitude e menor frequência nas oscilações citoplasmáticas de Ca^{2+} . Em ilhotas de camundongos que não expressam o receptor de leptina (*db/db*), observam-se oscilações na presença de 4-6 mM de glicose enquanto que ilhotas controle só começam a oscilar a partir de 8 mM de glicose. Na presença de 12 mM de glicose as ilhotas dos camundongos diabéticos *db/db* não apresentam a redução inicial da concentração citoplasmática de Ca^{2+} $[\text{Ca}^{2+}]_c$ bem como o padrão oscilatório da $[\text{Ca}^{2+}]_c$ em resposta à glicose, observando-se somente um

aumento sustentado do Ca^{2+} citoplasmático (Roe *et al.*, 1994). Essas alterações estão associadas com menor expressão e atividade da Ca^{2+} -ATPase do retículo endoplasmático (SERCA), cuja função é transportar ativamente o cátion para o interior do retículo, regulando a $[\text{Ca}^{2+}]_c$. A redução da concentração de glicose necessária para o início das oscilações de Ca^{2+} e a menor capacidade de estoque desse cátion nas organelas intracelulares poderia contribuir para maior ativação da maquinaria de exocitose e a maior secreção de insulina observada nos grupos CH e RH.

É necessário ressaltar que na obesidade a maior concentração circulante de citocinas inflamatórias tem papel importante tanto na progressão da resistência a insulina quanto na disfunção das células β (Ehses *et al.*, 2008). Em ilhotas tratadas com mistura das citocinas: $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ e $\text{IFN-}\gamma$ ocorre aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_c$ em baixas concentrações de glicose e as ilhotas não apresentam oscilações da $[\text{Ca}^{2+}]_c$ quando estimuladas por nutrientes (Dula *et al.*, 2010). O mesmo foi verificado em ilhotas de camundongos *db/db*, que apresentavam $\text{IL-1}\beta$ significativamente aumentada no plasma (Dula *et al.*, 2010). Em nosso estudo, a maior mobilização de cálcio em CH indicada por maior amplitude das oscilações (Fig 5H) pode estar associada à maior concentração plasmática de IL-6 (Fig 7B) e, possivelmente, de outras citocinas inflamatórias. De fato, a incubação de células HIT-T 15 com IL-6 leva ao aumento da secreção e expressão gênica da insulina por um mecanismo dependente de Ca^{2+} (Shimizu *et al.*, 2000).

Finalmente, em nosso estudo observamos que CHT apresentou amplitude das oscilações semelhante a C. Esse efeito pode ser devido à regulação da $[\text{Ca}^{2+}]_c$ promovida pela taurina. A ação da taurina na homeostase desse cátion já está bem estabelecida em músculo e cardiomiócitos (Schaffer *et al.*, 2010). Acredita-se que os efeitos da taurina sobre a contratilidade muscular ocorram pelo aumento nos estoques de Ca^{2+} no interior do retículo endoplasmático mediado pelas SERCAs (Rapundalo, 1998). Nosso grupo de pesquisa já demonstrou que a suplementação com taurina aumenta a expressão da SERCA 3 e da subunidade β_2 do canal Ca^{2+}_v em ilhotas pancreáticas (Ribeiro *et al.*, 2009; Batista *et al.*,

2012). Acreditamos, portanto que a preservação da homeostase do Ca^{2+} nas ilhotas de CHT possa ocorrer por modulação da mobilização do pool extra e intracelular do cátion via regulação da expressão e atividade das SERCAs e do canal Ca^{2+}_v .

4.5. Conclusões

A secreção de insulina se encontra reduzida em camundongos submetidos a restrição proteica pós-desmame e essa menor demanda funcional está associada com alterações no perfil de oscilação de íons Ca^{2+} e menor fragmentação de DNA. Essas características foram independentes de alterações na morfologia do pâncreas endócrino.

O tratamento desses camundongos com dieta hiperlipídica levou ao aumento da secreção de insulina em ilhotas isoladas mesmo na ausência de hiperinsulinemia, sugerindo que outros fatores sistêmicos influenciem a concentração de insulina circulante. A maior capacidade funcional das ilhotas desse grupo foi associada com o aumento da fragmentação de DNA e pode constituir um fator de risco para a falência precoce das células β e o aparecimento do DM2.

A suplementação com taurina promoveu hipertrofia das ilhotas pancreáticas, normalizou a secreção de insulina e movimentos de Ca^{2+} citoplasmático. Esses achados em conjunto com a menor fragmentação de DNA sugerem que a suplementação com taurina possa ser benéfica para melhor compensar a resistência periférica a insulina e, portanto, prevenir o aparecimento do DM2.

Por fim, podemos concluir que as alterações morfológicas e funcionais descritas no pâncreas dos grupos em estudo foram independentes da via mitogênica $\text{ERK}_{1/2}$. Estudos para determinar a contribuição de vias de crescimento e proliferação celular como Akt e PCNA, respectivamente, estão em andamento para melhor compreensão das adaptações morfológicas e funcionais do pâncreas endócrino nesse modelo experimental.

5.Considerações finais

A idealização deste projeto baseou-se em dois pontos principais: 1) Existe uma correlação entre a má nutrição nos estágios iniciais da vida e o desenvolvimento de doenças crônicas na vida adulta (Hales & Barker, 1992; Aubin *et al.*, 2012); 2) O Brasil e outros países em desenvolvimento passam atualmente por um processo de transição nutricional em que os hábitos alimentares são caracterizados pelo consumo de gêneros com alta densidade energética e índice glicêmico (Sawaya *et al.*, 2003).

Tendo em vista essas prerrogativas, neste estudo analisamos o crescimento, adiposidade, sensibilidade periférica a insulina e a funcionalidade das ilhotas pancreáticas em camundongos submetidos a restrição proteica após o desmame e em seguida, alimentados com dieta hiperlipídica.

A resistência a insulina é inicialmente compensada com o aumento da secreção de insulina e em indivíduos que apresentem falhas nesse mecanismo de compensação, se instalará o DM2 (Prentki & Nolan, 2006). Portanto as abordagens terapêuticas atuais para o DM2 devem apontar para a redução da resistência periférica a insulina e a preservação da massa funcional de células β . Nesse sentido, nosso grupo já demonstrou que a suplementação com taurina potencializa os efeitos dos nutrientes sobre a secreção de insulina (Carneiro *et al.*, 2009; Ribeiro *et al.*, 2009) e também reduz a resistência a insulina induzida por dieta hiperlipídica (Ribeiro *et al.*, 2012). Neste projeto avaliamos os efeitos da suplementação com taurina sobre a progressão da obesidade, resistência a insulina e função do pâncreas endócrino.

Com base em nossos achados, podemos concluir pontualmente que:

- Camundongos desnutridos apresentam maior tolerância a glicose e sensibilidade a insulina. Esses efeitos podem decorrer da maior concentração plasmática de adiponectina e conteúdo de p-AMPK no fígado
- Em camundongos desnutridos, o tratamento com dieta hiperlipídica produz um fenótipo típico de obesidade e resistência a insulina, com mesma magnitude que nos camundongos controle, porém sem hiperinsulinemia.

- A suplementação com taurina promove melhorias nos parâmetros de obesidade e reduz a intolerância a glicose somente em camundongos alimentados com dieta normoprotéica. Possivelmente esses efeitos ocorrem pela maior fosforilação da Akt no fígado.
- A suplementação com taurina normaliza a produção hepática de glicose induzida por piruvato em camundongos desnutridos obesos possivelmente pelo maior conteúdo de p-AMPK no fígado.
- O tratamento com taurina normaliza a concentração plasmática de aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs) e aumenta a concentração de arginina, que pode servir como um precursor para a síntese de óxido nítrico e ativar a AMPK.
- A secreção e o conteúdo total de insulina estão reduzidos em camundongos desnutridos, porém o tamanho das ilhotas pancreáticas e a proporção de células β estão preservados.
- Os movimentos de Ca^{2+} citoplasmático se encontram alterados em ilhotas de camundongos desnutridos com um padrão de alta frequência e menor amplitude das oscilações.
- Em ilhotas isoladas de camundongos desnutridos obesos ocorre hipersecreção de insulina e aumento na mobilização de Ca^{2+} sem alterações na morfologia do pâncreas. O aumento da demanda funcional induzida pela dieta hiperlipídica está associado a maior fragmentação de DNA no grupo RH.
- A suplementação com taurina promove hipertrofia das ilhotas (células β e não- β) e reduz a fragmentação de DNA.
- A secreção de insulina em ilhotas de camundongos suplementados com taurina é reduzida aos níveis dos respectivos controles de cada grupo.
- As alterações morfofisiológicas observadas não dependem da ativação da Akt e da proteína mitogênica $\text{ERK}_{1/2}$, porém se correlacionam com a maior ativação da Stat3.

6. Referências Bibliográficas

- Aerts L & Van Assche FA (2002) Taurine and taurine-deficiency in the perinatal period. *J Perinat Med* **30**, 281-286.
- Amaral AG, Rafacho A, Machado de Oliveira CA, Batista TM, Ribeiro RA, Latorraca MQ, Boschero AC & Carneiro EM (2010) Leucine supplementation augments insulin secretion in pancreatic islets of malnourished mice. *Pancreas* **39**, 847-855.
- Arantes VC, Teixeira VP, Reis MA, Latorraca MQ, Leite AR, Carneiro EM, Yamada AT & Boschero AC (2002) Expression of PDX-1 is reduced in pancreatic islets from pups of rat dams fed a low protein diet during gestation and lactation. *J Nutr* **132**, 3030-3035.
- Arany E, Strutt B, Romanus P, Remacle C, Reusens B & Hill DJ (2004) Taurine supplement in early life altered islet morphology, decreased insulinitis and delayed the onset of diabetes in non-obese diabetic mice. *Diabetologia* **47**, 1831-1837.
- Aubin HJ, Berlin I & Reynaud M (2012) Early life origins of adult disease and maternal smoking during pregnancy. *Am J Public Health* **102**, e12.
- Barthel A & Schmoll D (2003) Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **285**, E685-692.
- Batista TM, Ribeiro RA, Amaral AG, de Oliveira CA, Boschero AC & Carneiro EM (2012) Taurine supplementation restores glucose and carbachol-induced insulin secretion in islets from low-protein diet rats: involvement of Ach-M3R, Synt 1 and SNAP-25 proteins. *J Nutr Biochem* **23**, 306-312.
- Bol V, Desjardins F, Reusens B, Balligand JL & Remacle C (2010) Does early mismatched nutrition predispose to hypertension and atherosclerosis, in male mice? *PLoS One* **5**.
- Boschero AC & Malaisse WJ (1979) Stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. XXIX. Regulation of 86Rb^+ efflux from perfused islets. *Am J Physiol* **236**, E139-146.
- Boujendar S, Reusens B, Merezak S, Ahn MT, Arany E, Hill D & Remacle C (2002) Taurine supplementation to a low protein diet during foetal and early postnatal life restores a normal proliferation and apoptosis of rat pancreatic islets. *Diabetologia* **45**, 856-866.
- Brissova M, Fowler MJ, Nicholson WE, Chu A, Hirshberg B, Harlan DM & Powers AC (2005) Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. *J Histochem Cytochem* **53**, 1087-1097.
- Bustamante J, Lobo MV, Alonso FJ, Mukala NT, Gine E, Solis JM, Tamarit-Rodriguez J & Martin Del Rio R (2001) An osmotic-sensitive taurine pool is localized in rat pancreatic islet cells containing glucagon and somatostatin. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **281**, E1275-1285.
- Carneiro EM, Latorraca MQ, Araujo E, Beltra M, Oliveras MJ, Navarro M, Berna G, Bedoya FJ, Velloso LA, Soria B & Martin F (2009) Taurine supplementation modulates glucose homeostasis and islet function. *J Nutr Biochem* **20**, 503-511.

- Carvalho CP, Martins JC, da Cunha DA, Boschero AC & Collares-Buzato CB (2006) Histomorphology and ultrastructure of pancreatic islet tissue during in vivo maturation of rat pancreas. *Ann Anat* **188**, 221-234.
- Cherif H, Reusens B, Ahn MT, Hoet JJ & Remacle C (1998) Effects of taurine on the insulin secretion of rat fetal islets from dams fed a low-protein diet. *J Endocrinol* **159**, 341-348.
- Cherif H, Reusens B, Dahri S & Remacle C (2001) A protein-restricted diet during pregnancy alters in vitro insulin secretion from islets of fetal Wistar rats. *J Nutr* **131**, 1555-1559.
- Cianfarani S, Germani D & Branca F (1999) Low birthweight and adult insulin resistance: the "catch-up growth" hypothesis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* **81**, F71-73.
- Cnop M, Igoillo-Esteve M, Hughes SJ, Walker JN, Cnop I & Clark A (2011) Longevity of human islet alpha- and beta-cells. *Diabetes Obes Metab* **13 Suppl 1**, 39-46.
- Coffer PJ, van Puijenbroeck A, Burgering B, Jonge MK, Kruiger W (1997) Insulin activates Stat3 independently of p21ras-ERK and PI3K signal transduction. *Oncogene* **15**, 2529-2539.
- da Silva PM, Batista TM, Ribeiro RA, Zoppi CC, Boschero AC & Carneiro EM (2012) Decreased insulin secretion in islets from protein malnourished rats is associated with impaired glutamate dehydrogenase function: effect of leucine supplementation. *Metabolism* **61**, 721-732.
- De Luca G, Calpona PR, Caponetti A, Romano G, Di Benedetto A, Cucinotta D & Di Giorgio RM (2001) Taurine and osmoregulation: platelet taurine content, uptake, and release in type 2 diabetic patients. *Metabolism* **50**, 60-64.
- Dula SB, Jecmenica M, Wu R, Jahanshahi P, Verrilli GM, Carter JD, Brayman KL & Nunemaker CS (2010) Evidence that low-grade systemic inflammation can induce islet dysfunction as measured by impaired calcium handling. *Cell Calcium* **48**, 133-142.
- Ehses JA, Boni-Schnetzler M, Faulenbach M & Donath MY (2008) Macrophages, cytokines and beta-cell death in Type 2 diabetes. *Biochem Soc Trans* **36**, 340-342.
- El Idrissi A, Boukarrou L & L'Amoreaux W (2009) Taurine supplementation and pancreatic remodeling. *Adv Exp Med Biol* **643**, 353-358.
- Ferreira F, Barbosa HC, Stoppiglia LF, Delghingaro-Augusto V, Pereira EA, Boschero AC & Carneiro EM (2004) Decreased insulin secretion in islets from rats fed a low protein diet is associated with a reduced PKA α expression. *J Nutr* **134**, 63-67.
- Ferreira F, Filiputti E, Arantes VC, Stoppiglia LF, Araujo EP, Delghingaro-Augusto V, Latorraca MQ, Toyama MH, Boschero AC & Carneiro EM (2003) Decreased cholinergic stimulation of insulin secretion by islets from rats fed a low protein diet is associated with reduced protein kinase calpha expression. *J Nutr* **133**, 695-699.
- Filiputti E, Ferreira F, Souza KL, Stoppiglia LF, Arantes VC, Boschero AC & Carneiro EM (2008) Impaired insulin secretion and decreased expression of

- the nutritionally responsive ribosomal kinase protein S6K-1 in pancreatic islets from malnourished rats. *Life Sci* **82**, 542-548.
- Filiputti E, Rafacho A, Araujo EP, Silveira LR, Trevisan A, Batista TM, Curi R, Velloso LA, Quesada I, Boschero AC & Carneiro EM (2010) Augmentation of insulin secretion by leucine supplementation in malnourished rats: possible involvement of the phosphatidylinositol 3-phosphate kinase/mammalian target protein of rapamycin pathway. *Metabolism* **59**, 635-644.
- Franconi F, Bennardini F, Mattana A, Miceli M, Ciuti M, Mian M, Gironi A, Anichini R & Seghieri G (1995) Plasma and platelet taurine are reduced in subjects with insulin-dependent diabetes mellitus: effects of taurine supplementation. *Am J Clin Nutr* **61**, 1115-1119.
- Gao Z, Young RA, Li G, Najafi H, Buettger C, Sukumvanich SS, Wong RK, Wolf BA & Matschinsky FM (2003) Distinguishing features of leucine and alpha-ketoisocaproate sensing in pancreatic beta-cells. *Endocrinology* **144**, 1949-1957.
- Gavete ML, Martin MA, Alvarez C & Escrivá F (2005) Maternal food restriction enhances insulin-induced GLUT-4 translocation and insulin signaling pathway in skeletal muscle from suckling rats. *Endocrinology* **146**, 3368-3378.
- Giozzet VA, Rafacho A, Boschero AC, Carneiro EM & Bosqueiro JR (2008) Dexamethasone treatment in vivo counteracts the functional pancreatic islet alterations caused by malnourishment in rats. *Metabolism* **57**, 617-624.
- Grover Z & Ee LC (2009) Protein energy malnutrition. *Pediatr Clin North Am* **56**, 1055-1068.
- Hales CN & Barker DJ (1992) Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* **35**, 595-601.
- Henquin JC (2011) The dual control of insulin secretion by glucose involves triggering and amplifying pathways in beta-cells. *Diabetes Res Clin Pract* **93 Suppl 1**, S27-31.
- Hiriart M & Aguilar-Bryan L (2008) Channel regulation of glucose sensing in the pancreatic beta-cell. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **295**, E1298-1306.
- Inuwa IM & El Mardi AS (2005) Correlation between volume fraction and volume-weighted mean volume, and between total number and total mass of islets in post-weaning and young Wistar rats. *J Anat* **206**, 185-192.
- Jensen CB, Martin-Gronert MS, Storgaard H, Madsbad S, Vaag A & Ozanne SE (2008) Altered PI3-kinase/Akt signalling in skeletal muscle of young men with low birth weight. *PLoS One* **3**, e3738.
- Joosten KF & Hulst JM (2008) Prevalence of malnutrition in pediatric hospital patients. *Curr Opin Pediatr* **20**, 590-596.
- Latorraca MQ, Carneiro EM, Mello MA & Boschero AC (1999) Reduced insulin secretion in response to nutrients in islets from malnourished young rats is associated with a diminished calcium uptake. *J Nutr Biochem* **10**, 37-43.
- Latorraca MQ, Reis MA, Carneiro EM, Mello MA, Velloso LA, Saad MJ & Boschero AC (1998) Protein deficiency and nutritional recovery modulate insulin secretion and the early steps of insulin action in rats. *J Nutr* **128**, 1643-1649.

- Lee E, Ryu GR, Ko SH, Ahn YB, Yoon KH, Ha H & Song KH (2011) Antioxidant treatment may protect pancreatic beta cells through the attenuation of islet fibrosis in an animal model of type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* **414**, 397-402.
- Li C, Buettger C, Kwagh J, Matter A, Daikhin Y, Nissim IB, Collins HW, Yudkoff M, Stanley CA & Matschinsky FM (2004) A signaling role of glutamine in insulin secretion. *J Biol Chem* **279**, 13393-13401.
- Marroqui L, Batista TM, Gonzalez A, Vieira E, Rafacho A, Colleta SJ, Taboga SR, Boschero AC, Nadal A, Carneiro EM & Quesada I (2012) Functional and Structural Adaptations in the Pancreatic alpha-Cell and Changes in Glucagon Signaling During Protein Malnutrition. *Endocrinology*.
- Martin MA, Fernandez E, Pascual-Leone AM, Escriva F & Alvarez C (2004) Protein calorie restriction has opposite effects on glucose metabolism and insulin gene expression in fetal and adult rat endocrine pancreas. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **286**, E542-550.
- Maturo J, Kulakowski EC (1988) Taurine binding to the purified insulin receptor. *Biochem Pharmacol* **37** 3755-3760.
- McClenaghan NH (2007) Physiological regulation of the pancreatic {beta}-cell: functional insights for understanding and therapy of diabetes. *Exp Physiol* **92**, 481-496.
- Michael MD, Kulkarni RN, Postic C, Previs SF, Shulman GI, Magnuson MA & Kahn CR (2000) Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. *Mol Cell* **6**, 87-97.
- Milanski M, Arantes VC, Ferreira F, de Barros Reis MA, Carneiro EM, Boschero AC, Collares-Buzato CB & Latorraca MQ (2005) Low-protein diets reduce PKA α expression in islets from pregnant rats. *J Nutr* **135**, 1873-1878.
- Nakaya Y, Minami A, Harada N, Sakamoto S, Niwa Y & Ohnaka M (2000) Taurine improves insulin sensitivity in the Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rat, a model of spontaneous type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr* **71**, 54-58.
- Nesher R, Anteby E, Yedovizky M, Warwar N, Kaiser N & Cerasi E (2002) Beta-cell protein kinases and the dynamics of the insulin response to glucose. *Diabetes* **51 Suppl 1**, S68-73.
- Orci L (1985) The insulin factory: a tour of the plant surroundings and a visit to the assembly line. The Minkowski lecture 1973 revisited. *Diabetologia* **28**, 528-546.
- Ozanne SE, Dorling MW, Wang CL & Nave BT (2001) Impaired PI 3-kinase activation in adipocytes from early growth-restricted male rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **280**, E534-539.
- Pawellek I, Dokoupil K & Koletzko B (2008) Prevalence of malnutrition in paediatric hospital patients. *Clin Nutr* **27**, 72-76.
- Pelletier DL (1994) The potentiating effects of malnutrition on child mortality: epidemiologic evidence and policy implications. *Nutr Rev* **52**, 409-415.
- Petrik J, Reusens B, Arany E, Remacle C, Coelho C, Hoet JJ & Hill DJ (1999) A low protein diet alters the balance of islet cell replication and apoptosis in the fetal and neonatal rat and is associated with a reduced pancreatic expression of insulin-like growth factor-II. *Endocrinology* **140**, 4861-4873.

- Petry CJ, Dorling MW, Pawlak DB, Ozanne SE & Hales CN (2001) Diabetes in old male offspring of rat dams fed a reduced protein diet. *Int J Exp Diabetes Res* **2**, 139-143.
- Prentki M & Nolan CJ (2006) Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest* **116**, 1802-1812.
- Quesada I, Rovira JM, Martin F, Roche E, Nadal A & Soria B (2002) Nuclear KATP channels trigger nuclear Ca(2+) transients that modulate nuclear function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 9544-9549.
- Rafacho A, Giozzet VA, Boschero AC, Abrantes JL, Cestari TM, Carneiro EM & Bosqueiro JR (2009) Reduced pancreatic beta-cell mass is associated with decreased FoxO1 and Erk1/2 protein phosphorylation in low-protein malnourished rats. *Braz J Med Biol Res* **42**, 935-941.
- Rao RH (1995) Adaptations in glucose homeostasis during chronic nutritional deprivation in rats: hepatic resistance to both insulin and glucagon. *Metabolism* **44**, 817-824.
- Rapundalo ST (1998) Cardiac protein phosphorylation: functional and pathophysiological correlates. *Cardiovasc Res* **38**, 559-588.
- Rasschaert J, Reusens B, Dahri S, Sener A, Remacle C, Hoet JJ & Malaisse WJ (1995) Impaired activity of rat pancreatic islet mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase in protein malnutrition. *Endocrinology* **136**, 2631-2634.
- Reis MA, Carneiro EM, Mello MA, Boschero AC, Saad MJ & Velloso LA (1997) Glucose-induced insulin secretion is impaired and insulin-induced phosphorylation of the insulin receptor and insulin receptor substrate-1 are increased in protein-deficient rats. *J Nutr* **127**, 403-410.
- Remacle C, Dumortier O, Bol V, Goosse K, Romanus P, Theys N, Bouckenooghe T & Reusens B (2007) Intrauterine programming of the endocrine pancreas. *Diabetes Obes Metab* **9 Suppl 2**, 196-209.
- Reusens B, Theys N, Dumortier O, Goosse K & Remacle C (2011) Maternal malnutrition programs the endocrine pancreas in progeny. *Am J Clin Nutr* **94**, 1824S-1829S.
- Ribeiro RA, Bonfleur ML, Amaral AG, Vanzela EC, Rocco SA, Boschero AC & Carneiro EM (2009) Taurine supplementation enhances nutrient-induced insulin secretion in pancreatic mice islets. *Diabetes Metab Res Rev* **25**, 370-379.
- Ribeiro RA, Santos-Silva JC, Vettorazzi JF, Cotrim BB, Mobiolli DD, Boschero AC & Carneiro EM (2012) Taurine supplementation prevents morpho-physiological alterations in high-fat diet mice pancreatic beta-cells. *Amino Acids*.
- Roe MW, Philipson LH, Frangakis CJ, Kuznetsov A, Mertz RJ, Lancaster ME, Spencer B, Worley JF, 3rd & Dukes ID (1994) Defective glucose-dependent endoplasmic reticulum Ca²⁺ sequestration in diabetic mouse islets of Langerhans. *J Biol Chem* **269**, 18279-18282.
- Santos GJ, Oliveira CA, Boschero AC & Rezende LF (2011) CNTF protects MIN6 cells against apoptosis induced by Alloxan and IL-1 β through downregulation of the AMPK pathway. *Cell Signal* **23**, 1669-1676.

- Sawaya AL, Martins P, Hoffman D & Roberts SB (2003) The link between childhood undernutrition and risk of chronic diseases in adulthood: a case study of Brazil. *Nutr Rev* **61**, 168-175.
- Schaffer SW, Jong CJ, Ramila KC & Azuma J (2010) Physiological roles of taurine in heart and muscle. *J Biomed Sci* **17 Suppl 1**, S2.
- Shimizu H, Ohtani K, Kato Y, Mori M (2000) Interleukin-6 increases insulin secretion and preproinsulin mRNA expression via Ca²⁺-dependent mechanism. *J Endocrinol* **166**, 121-126
- Snoeck A, Remacle C, Reusens B & Hoet JJ (1990) Effect of a low protein diet during pregnancy on the fetal rat endocrine pancreas. *Biol Neonate* **57**, 107-118.
- Sone H & Kagawa Y (2005) Pancreatic beta cell senescence contributes to the pathogenesis of type 2 diabetes in high-fat diet-induced diabetic mice. *Diabetologia* **48**, 58-67.
- Soriano S, Gonzalez A, Marroqui L, Tuduri E, Vieira E, Amaral AG, Batista TM, Rafacho A, Boschero AC, Nadal A, Carneiro EM & Quesada I (2010) Reduced Insulin Secretion in Protein Malnourished Mice Is Associated with Multiple Changes in the {beta}-Cell Stimulus-Secretion Coupling. *Endocrinology* **151**, 3543-3554.
- Straub SG & Sharp GW (2002) Glucose-stimulated signaling pathways in biphasic insulin secretion. *Diabetes Metab Res Rev* **18**, 451-463.
- Tsuboyama-Kasaoka N, Shozawa C, Sano K, Kamei Y, Kasaoka S, Hosokawa Y & Ezaki O (2006) Taurine (2-aminoethanesulfonic acid) deficiency creates a vicious circle promoting obesity. *Endocrinology* **147**, 3276-3284.
- Tsukiyama S, Matsushita M, Matsumoto S, Morita T, Kobayashi S, Tamura H, Kamashi H, Ozaki M, Todo S (2006) Transduction of Exogenous Constitutively Activated Stat3 into Dispersed Islets Proliferation of Rat pancreatic b cells. *Tiss Eng* **12** (1), 131-140.
- Um SH, Frigerio F, Watanabe M, Picard F, Joaquin M, Sticker M, Fumagalli S, Allegrini PR, Kozma SC, Auwerx J & Thomas G (2004) Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature* **431**, 200-205.
- Xiao C, Giacca A & Lewis GF (2008) Oral taurine but not N-acetylcysteine ameliorates NEFA-induced impairment in insulin sensitivity and beta cell function in obese and overweight, non-diabetic men. *Diabetologia* **51**, 139-146.
- Yabaluri N & Bashyam MD (2010) Hormonal regulation of gluconeogenic gene transcription in the liver. *J Biosci* **35**, 473-484.
- Yous JG (2011) The role of alpha-, delta- and F cells in insulin secretion and action. *Diabetes Res Clin Pract* **93 Suppl 1**, S25-26.
- Zoppi CC, Silveira LR, Oliveira CA, Boschero AC, Curi R, Carneiro EM (2010) Insulin release, peripheral insulin resistance and muscle function in protein malnutrition: a role of tricarboxylic acid cycle anaplerosis. *Br J Nutr* **103**(9):1237-50.

7. Anexos

Publicação do Artigo 1

23-Oct-2012

Dear Miss Ribeiro,

I am pleased to inform you that your manuscript, "TAURINE SUPPLEMENTATION IMPROVES LIVER GLUCOSE CONTROL IN NORMAL PROTEIN AND MALNOURISHED MICE FED A HIGH FAT DIET", is now acceptable for publication in Molecular Nutrition & Food Research.

With the acceptance of your manuscript the final uploaded version in MS-Central will be used for copy-editing and the subsequent production process.

Thank you for your fine contribution.

Sincerely,

Prof. Hans-Ulrich Humpf
Editor-in-Chief, Molecular Nutrition & Food Research

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado/tese de Doutorado intitulada "Mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento da resistência a insulina em camundongos desnutridos submetidos a obesidade experimental":

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

() CIBio – Comissão Interna de Biossegurança, projeto No. _____, Instituição: _____

(X) CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais, projeto No. 1942-1

Instituição: Unicamp

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. _____, Instituição: _____

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*



Aluno: Thiago Martins Batista

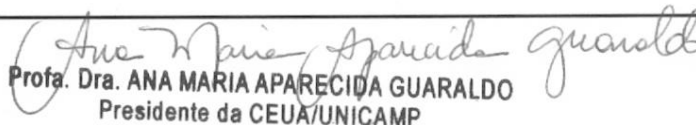


Orientador: Everardo Magalhães Carneiro

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura



Profa. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO
Presidente da CEUA/UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura