

Rafael Ludemann Camargo

**Taurine supplementation in malnourished obese animals:
Analysis of the molecular mechanisms of hypothalamic
action of insulin and leptin and the repercussion upon energy
metabolism**

**Suplementação de Taurina em animais desnutridos
obesos: Análise dos mecanismos moleculares da ação
hipotalâmica da insulina e leptina e repercussões no
metabolismo energético**

CAMPINAS
2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

Rafael Ludemann Camargo

Taurine supplementation in malnourished obese animals:
Analysis of the molecular mechanisms of hypothalamic action of
insulin and leptin and the repercussion upon energy metabolism

Suplementação de Taurina em animais desnutridos obesos:
Análise dos mecanismos moleculares da ação hipotalâmica da
insulina e leptina e repercussões no metabolismo energético

Thesis presented to the Institute of Biology of the
University of Campinas in partial fulfillment of the
requirements for the degree of Doctor in Functional and
Molecular Biology, in the area of PHYSIOLOGY

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor
em Biologia Funcional e Molecular na área de
FISIOLOGIA

Supervisor/Orientador: Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA
TESE DEFENDIDA PELO ALUNO RAFAEL LUDEMANN
CAMARGO, E ORIENTADA PELO PROF. DR. EVERARDO
MAGALHÃES CARNEIRO



CAMPINAS
2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

C14t Camargo, Rafael Ludemann, 1986-
Taurine supplementation in malnourished obese animals : analysis of the molecular mechanisms of the hypothalamic action of insulin and leptin and the repercussion upon energy metabolism / Rafael Ludemann Camargo. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

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

1. Taurina. 2. Hipotálamo. 3. Leptina. 4. Insulina. I. Carneiro, Everardo Magalhães. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Suplementação de taurina em animais desnutridos obesos : análise dos mecanismos moleculares da ação hipotalâmica da insulina e leptina e repercussões no metabolismo energético

Palavras-chave em inglês:

Taurine
Hypothalamus
Leptin
Insulin

Área de concentração: Fisiologia

Titulação: Doutor em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Everardo Magalhães Carneiro [Orientador]
Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira
Patrícia Cristina Lisboa da Silva
Maria Lucia Bonfleur
Marciane Milanski Ferreira

Data de defesa: 26-06-2014

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 26 de junho de 2014

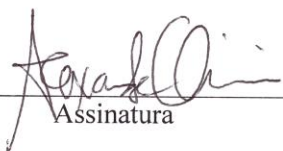
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro (orientador)



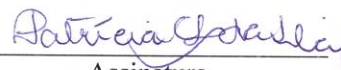
Assinatura

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira



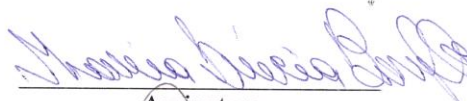
Assinatura

Profa. Dra. Patrícia Cristina Lisboa da Silva



Assinatura

Profa. Dra. Maria Lucia Bonfleur



Assinatura

Profa. Dra. Marciane Milanski Ferreira



Assinatura

Profa. Dra. Ana Paula Couto Davel

Assinatura

Profa. Dra. Silvana Auxiliadora Bordin da Silva

Assinatura

Dra. Patricia de Oliveira Prada

Assinatura

ABSTRACT

The energy balance is mainly controlled by hypothalamic regions that receive afferent information arising from the periphery. Energy stocks sensitize hypothalamic neurons that control food intake and energy expenditure, thus regulating body weight. Malnutrition and obesity are related to an imbalance of energy homeostasis. Evidence shows that consumption of high-fat diet (HFD) activates inflammatory pathways in the hypothalamus that affect the actions of insulin in the control of energy balance. Moreover, consumption of HFD also impairs anorexigenic actions of leptin and its hypothalamic signaling. In this study, we evaluated the consumption and energy expenditure, as well as the molecular and genetic mechanisms involved in insulin and leptin signaling in the hypothalamus and its control over the food and metabolic pattern of malnourished mice fed with HFD. Furthermore, we verified the possible beneficial effects of supplementation with the amino acid taurine (Tau) associated with HFD in molecular and physiological profiles analyzed in this study. Thereunto, mice were fed a control (14% protein-C) or a protein-restricted (6% protein - R) diet. After 6 weeks, both groups either received or not HFD for 8 weeks (CH and RH). Half of the HFD groups were supplemented with 5% TAU in their drinking water from the time of weaning until the end of experiment (CHT and RHT). Animals subjected to protein restriction had a higher peripheral insulin sensitivity, despite the deficiency of this hormone in hypothalamic sensitivity. The study groups showed changes in hypothalamic expression of genes related to cellular defense, apoptosis, endoplasmic reticulum stress and the control of food intake. There was a higher gene expression of orexigenic neuropeptides in mice subjected to protein restriction, featuring a hyperphagia despite a normal caloric intake. HFD mice showed hypophagia and reduced gene expression of anorexigenic neuropeptides. However, consumption of HFD in controls and malnourished animals provided higher caloric intake, leading to weight gain and fat stores. HFD mice also exhibited an impaired anorexigenic effect of leptin. In addition, there was an increase in protein expression of uncoupling protein 1 (UCP1) in brown adipose tissue (BAT) and respiratory quotient (RQ) during the dark period in mice subjected to protein malnutrition. On the other hand, there was a decrease in the protein expression of UCP1 in the BAT and RQ in HFD fed mice. There was a decrease in energy expenditure (EE) in HFD animals only during the light phase. In conclusion, mice subjected to protein restriction showed an impairment of insulin action in the hypothalamus

and an increase of the orexigenic neuropeptides gene expressions as well as food intake. Moreover, consumption of HFD promoted obesity, hypercholesterolemia, glucose intolerance, increased caloric intake and impaired hypothalamic action of insulin and leptin. However, Tau supplementation prevented alterations in glucose homeostasis, caloric intake and hypothalamic action of insulin and leptin signaling in HFD mice. Moreover, the improvement in these metabolic patterns was less effective in mice subjected to protein restriction. Finally, the impairment of energy expenditure in obese animals and spontaneous locomotor activity were not restored by supplementation of Tau.

RESUMO

O balanço energético é preponderantemente controlado por regiões hipotalâmicas que recebem informações aferentes oriundas da periferia. Os estoques de energia sensibilizam neurônios hipotalâmicos que controlam a ingestão e o gasto energético, regulando assim o peso corporal. A desnutrição e a obesidade estão relacionadas ao desequilíbrio da homeostase energética. Evidências mostram que o consumo de dieta hiperlipídica (DHL) ativa vias inflamatórias no hipotálamo que prejudicam ações da insulina no controle do balanço energético. Além disso, o consumo de DHL também prejudica ações anorexigênicas da leptina e sua sinalização hipotalâmica. Neste estudo, avaliamos o consumo e o gasto energético, bem como os mecanismos moleculares e genéticos envolvidos na sinalização da insulina e leptina hipotalâmica e seu controle sobre o padrão alimentar e metabólico de camundongos submetidos à restrição protéica e alimentados com DHL. Além disso, verificamos os possíveis efeitos benéficos da suplementação com o aminoácido taurina (Tau), associado a DHL, nos perfis moleculares e fisiológicos analisados neste estudo. Para isso, camundongos foram alimentados com dieta padrão (14% de proteína -C) ou hipoprotéica (6% de proteína -R). Após 6 semanas, os grupos receberam ou não DHL durante 8 semanas (CH e RH). Metade dos grupos DHL foram suplementados com 5% TAU na água de beber, desde o desmame até o final do experimento (CHT e RHT). Animais submetidos a restrição protéica apresentaram maior sensibilidade periférica a insulina, apesar da deficiência na sensibilidade hipotalâmica deste hormônio. Os grupos em estudo apresentaram modificações na expressão de genes hipotalâmicos relacionados a defesa celular, apoptose, *stress* do retículo endoplasmático e controle da ingestão alimentar. Houve maior expressão gênica dos neuropeptídeos orexigênicos em camundongos submetidos a restrição protéica, caracterizando hiperfagia, apesar de uma ingestão calórica normal. Camundongos DHL apresentaram hipofagia e menor expressão gênica dos neuropeptídeos anorexigênicos. Entretanto, o consumo de DHL em animais controles e desnutrido, propiciou maior ingestão calórica, culminando com aumento de peso e dos estoques de gordura. Camundongos DHL apresentaram também comprometimento da ação anorexigênica da leptina. Além disso, houve aumento da expressão protéica da *uncoupling protein 1* (UCP1) no tecido adiposo marrom (TAM), assim como do quociente respiratório (QR) durante o período escuro em camundongos submetidos a restrição protéica. Por outro lado, houve diminuição da expressão

protéica da UCP1 no TAM e do QR em camundongos DHL. Houve diminuição no gasto energético (GE) de animais DHL apenas na fase clara. Em conclusão, camundongos submetidos a restrição protéica apresentaram comprometimento da ação da insulina no hipotálamo, aumento da expressão dos neuropeptídeos orexigênicos e do consumo alimentar. Além disso, o consumo de DHL promoveu obesidade, hipercolesterolemia, intolerância a glicose, aumento da ingestão calórica e prejuízo na ação da insulina e leptina. Entretanto, a suplementação com Tau preveniu alterações na homeostase glicêmica, no consumo calórico, na ação hipotalâmica da insulina e leptina em camundongos DHL. Por outro lado, a melhora desses padrões metabólicos mostrou-se menos eficaz em camundongos submetidos a restrição protéica. Por fim, o comprometimento do gasto energético e da atividade locomotora em animais obesos não foram restabelecidos com a suplementação de Tau.

SUMÁRIO

1. Introdução	1
1.1 Sinalização hipotalâmica da leptina e insulina	2
1.2 Controle hipotalâmico do consumo alimentar	3
1.3 Obesidade e Balanço energético	5
1.4 Desnutrição e Diabetes	6
1.5 Taurina	7
2. Objetivos	9
3. Artigo 1	11
<i>EFFECTS OF TAURINE SUPPLEMENTATION UPON FOOD INTAKE AND CENTRAL INSULIN SIGNALING IN MALNOURISHED MICE FED ON A HIGH FAT DIET</i>	12
3.1 Abstract	13
3.2 Introduction	14
3.3 Methods	15
3.3.1 Animals and diets	15
3.3.2 General nutritional parameters.....	16
3.3.3 Food intake	16
3.3.4 Intraperitoneal glucose tolerance tests (ipGTT)	16
3.3.5 Western Blot	16
3.3.6 Statistical analysis	17
3.4 Results	18
3.4.1 Mice features	18
3.4.2 Insulin-signaling proteins in hypothalamus	18
3.5 Discussion	19
3.6 Conclusion	21
3.7 Acknowledgements	21
3.8 Conflict of interest	21
3.9 References	21

4. Artigo 2	29
<i>TAURINE SUPPLEMENTATION PRESERVES HYPOTHALAMIC LEPTIN ACTION IN NORMAL AND PROTEIN-RESTRICTED MICE FED ON A HIGH-FAT DIET</i>	30
4.1 Abstract	31
4.2 Introduction	32
4.3 Materials and methods	33
4.3.1 Animals and diet	33
4.3.2 Biometric and nutritional parameters	34
4.3.3 Microarray analysis	34
4.3.4 Real Time quantitative RT-PCR	35
4.3.5 Evaluation of leptin action on food intake control	36
4.3.6 Western Blot	37
4.3.7 Statistical analysis	38
5. Results	38
5.1 Mice features	38
5.2 Food intake	39
5.3 Hypothalamic gene expression profile	40
5.4 Gene expression of neuropeptides involved in feeding behavior	43
5.5 Leptin-induced anorexigenic response and hypothalamic signaling	43
6. Discussion	44
7. Acknowledgements	49
8. References	50
9. Artigo 3	79
9.1 Introdução	80
9.2 Materiais e métodos	81
9.2.1 Avaliação da taxa metabólica basal (Respirometria)	81
9.2.2 Atividade Locomotora	81
9.2.3 Western Blot	81
9.2.4 Análise estatística dos resultados	82
10. Resultados e discussão	82
10.1 Taxa metabólica basal	82

11. Considerações finais	87
12. Conclusões	98
13. Sumário e Conclusões	99
13. Referências	101
14. Anexos	112

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha mãe Elvira Ludemann Camargo, ao meu pai Elias Camargo e a minha irmã Rafaelly Ludemann Camargo, por sempre me incentivar e apoiar meus estudos. Agradeço também pela compreensão da ausência e por sempre acreditar em meu potencial. Estendo esse parágrafo para agradecer minha namorada Tátilla que sempre esteve ao meu lado me incentivando e dando força nos momentos difíceis.

Ao Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro, pela orientação, amizade e oportunidade a mim cedida para trabalhar em seu laboratório. Ao prof. Dr. Antônio Carlos Boschero, pelo ensinamento de um verdadeiro doutor na arte da ciência.

Aos colegas de Laboratório do Pâncreas Endócrino e Metabolismo pela amizade, companheirismo, discussões científicas e também por me auxiliarem em vários procedimentos experimentais. A todos os co-autores dos dois trabalhos apresentados nesta tese, pela ajuda indispensável na realização dos artigos. Em especial gostaria de agradecer ao Thiago Martins Batista, por me ensinar a maioria das técnicas do laboratório e me supervisionar durante o período do doutorado. A professora Dr. Rosane Aparecido Ribeiro por me introduzir ao laboratório e me ajudar na elaboração do projeto e dos artigos. Aos grande amigos: Renato, Jean, Patrícia (Pate), Patrícia (HPLC), Roberta, Nayara, Junia e aos demais colegas de laboratório por me ajudarem nos momentos de dificuldades e também pelos momentos de descontração e *happy hour*, pois só assim para aguentar a rotina árdua do lab. 14.

As pessoas que não fazem parte do laboratório, porém me ajudaram muito na execução do trabalho. À Maria Lucia Bonfleur por me indicar ao laboratório do prof. Everardo e ajudar nos contatos. À Priscilla Muniz Ribeiro por me acompanhar na técnica do *microarray* e ensinar o PCR. À professora Dr. Íscia Cendes Lopes por ceder seu laboratório para experimento do *microarray*, bem como ao seu aluno de doutorado Alexandre por me acompanhar e ensinar a técnica. Ao laboratório de *microarray* (LMA) localizado no Laboratório Nacional de Luz Síncrona (LNLS) e a técnica Maria Eugênia Camargo por realizar a lavagem e escanamento dos chips de *microarray*. À Cristiane de Souza Rocha por realizar a quantificação dos chips.

À Marise Mello Carnellosi Brunelli pela grande ajuda na aquisição de matérias para o laboratório. A Priscila pelo apoio técnico nos procedimentos do laboratório. A todos os

funcionários do departamento de Biologia Estrutural e Funcional pelo trabalho árduo na organização do ambiente de trabalho e bem estar do animais no biotério.

Aos camundongos que doaram suas vidas a ciência, servindo de modelo experimental para a realização dos procedimentos aqui apresentados.

À FAPESP pela concessão da bolsa de doutorado e por seu suporte financeiro aos demais projetos do laboratório.

Agradeço a todos que tiveram direta ou indiretamente participação no desenvolvimento desse trabalho. Muito obrigado a todos e sucesso na vida de vocês!

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgRP – peptídeo relacionado ao gene agouti (*agouti-related peptide*)

AKT – proteína homóloga ao oncogene do timoma viral (protein homologous to thymoma viral oncogene)

ANOVA – *analysis of variance* (análise de variância)

ARC – núcleo arqueado (*arcuate nucleus*)

AUC – *area under curve*

BW – *body weight*

CART - transcrito relacionado à cocaína e à anfetamina (*cocaine-and-amphetamine-regulated transcript*)

CARTpt – *CART prepropeptide*

CHOL – *cholesterol*

CNPq - Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CNS - *central nervous system*

CRH - hormônio liberador da corticotrofina

DHL - dieta hiperlipídica

DM- núcleo dorsomedial

DM2 – diabetes mellitus tipo 2

DNA – *deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)

cDNA – *complementary DNA*

ER – *endoplasmic reticulum*

FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

FC- *fold change*

FOXO1 - *Forkhead box O1*

GE – gasto energético

GH – *growth hormone*

HFD – *high fat diet*

ICV – *intracerebroventricular*

IGF-I – *insulin-like growth factor I*

INCT - Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia

Ip - *intraperitoneal*

ip GTT - *intraperitoneal glucose tolerance tests*

IR – receptor de insulina

IRS-1/2 – substrato 1 e 2 do receptor de insulina

pIRS-1 - phosphorylated insulin receptor substrate 1

pAKT – phosphorylated AKT

IL-1 β – *interleukin 1 β*

IL-6 – *interleukin 6*

IL-8 - *interleukin 8*

JAK2 - janus quinase 2

LH – hipotálamo lateral (*lateral hypothalamus*)

LMA - *DNA microarray facility* (laboratório de *microarray*)

MCH - hormônio de concentração da melanina

MC3 e 4 - receptores de melanocortina 3 e 4

mTOR - *Mammalian target of rapamycin*

NF κ B - factor nuclear kappa B (*nuclear factor of kappa B*)

NPY - neuropeptídeo Y

ObR – receptor de leptina

ObRb - isoforma longa do receptor de leptina

OMS – organização mundial da saúde

Pfp - *percentage of false positives* (porcentagem de falso positivo)

PI3K – fosfatidil inositol 3-quinase (*phosphatidylinositol-3 kinase*)

POMC – proopiomelanocortina (*proopiomelanocortin*)

PVN – núcleo paraventricular (*paraventricular nucleus*)

PTP-1B - *protein-tyrosine phosphatase 1B*

QR - quociente respiratório

RNA - *ribonucleic acid* (ácido ribonucleico)

mRNA - *messenger RNA* (RNA mensageiro)

rlpl0 - *ribosomal protein large P0*

RT-PCR – *reverse transcriptase-polymerase chain reaction*

SEM – *stantard error of the mean* (erro padrão da média)

SNC – sistema nervoso central

SOCS 3 - supressora da sinalização de citocina 3 (*suppressor of cytokine signaling 3*)

STAT 3 – transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 (*Signal transducer and activator of transcription 3*)

TAM – tecido adiposo marrom

TAU – taurina (*taurine*)

TCA - *tricarboxylic acid cycle*

TG – *triglyceride*

TNF- α - *Tumor necrosis factor- α* (fator de necrose tumoral- α)

TRH -hormônio liberador da tirotrofina

T2D - *type 2 diabetes*

UCP-1 -*uncoupling protein 1*

Vo₂ - quantidade de oxigênio consumida

Vco₂ - produção de dióxido de carbono

α -MSH - hormônio de estimulação do melanócito α

Y1Y5^{-/-} – camundongos knockout para receptores do NPY

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Sinalização hipotalâmica da leptina e insulina

O balanço energético é estritamente regulado por populações neuronais localizadas no núcleo arqueado (ARC) do hipotálamo, os quais sensibilizam e integram sinais mediados por nutrientes, citocinas e hormônios tais como a leptina e insulina (Plum et al., 2006).

O hormônio insulina é secretado pelas células β pancreáticas e sua secreção é controlada de acordo com as flutuações da concentração de nutrientes circulantes, em especial, a glicose. O aumento na concentração de insulina plasmática induz ativação de processos anabólicos e inibe os catabólicos (Whiteman et al., 2002; Youngren, 2007).

A sinalização intracelular da insulina ocorre quando ela se liga a subunidade alfa do receptor de insulina (IR), promovendo autofosforilação nos resíduos de tirosina nas subunidades β do IR, bem como nos substratos do IR (IRs). Em sequência, a via da PI3K é ativada resultando na fosforilação da AKT (proteína homóloga ao oncogene do timoma viral) e subsequente fosforilação e extrusão nuclear da proteína FOXO1 (Forkhead box O1) (Tsai et al., 2003). A AKT quando fosforilada permite o transporte de glicose no músculo e no tecido adiposo, através da translocação de Glut-4 para a membrana celular. Esta proteína também fosforila várias outras proteínas, contribuindo para a síntese protéica, inativação da enzima glicogênio sintase quinase 3, estimulação da transcrição de enzimas relacionadas com a lipogênese, e, em contrapartida inibe a lipólise por ativar fosfodiesterases e desta forma inibe a lipase hormônio sensível (Pauli et al., 2009; Whiteman et al., 2002; Youngren, 2007). Simultaneamente, a fosforilação em tirosina dos IRs estabelece uma comunicação com a isoforma longa do receptor de leptina (ObRb), potencializando a via da proteína Janus quinase 2 e dos transdutores de sinais e ativadores de transcrição 3 (JAK2/STAT3) e seus efeitos sobre a atividade transcricional induzida por leptina (Carvalho et al., 2001; Saad et al., 1996).

A leptina é um hormônio peptídico de 16 kDa com 167 aminoácidos e é secretado principalmente pelo tecido adiposo, todavia também está presente em tecidos como a placenta, ovários entre outros (Mantzoros et al., 2011). O gene do receptor da leptina (ObR) possui seis isoformas, com seu domínio extracelular comum para todos eles. A isoforma longa desse receptor (ObRb) é a mais comum, sendo encontrada nas células β pancreática e no hipotálamo (Covey et al., 2006; Morioka et al., 2007).

Quando a leptina se liga aos receptores ObR, ela ativa a via da JAK2, levando a fosforilação e dimerização da STAT3, que são translocadas ao núcleo para atuar como regulador da transcrição gênica (Munzberg et al., 2005). Além disso, a ativação de JAK2 leva ao recrutamento e fosforilação do IRS1/2 (substrato 1 e 2 do receptor de insulina), o qual promove a ativação da enzima PI3K (fosfatidil inositol 3-quinase) que desempenha um papel relevante na transdução do sinal da leptina sob o controle da atividade neuronal e regulação da liberação de neuropeptídeos (Munzberg & Myers, 2005; Munzberg et al., 2004). Além de atuar como fator de transcrição, a STAT3 induz a expressão de proteínas supressoras da sinalização de citocinas (SOCS)-3, atuando como regulador negativo da via JAK/STAT (Frühbeck et al., 2006).

1.2 Controle hipotalâmico do consumo alimentar

Estudos indicam que a leptina possui um papel mais relevante do que a própria insulina no sistema nervoso central (SNC) para controle da homeostase energética. A deficiência da leptina causa obesidade severa, caracterizada por hiperfagia que persiste apesar de altos níveis de insulina (Schwartz et al., 2000).

No ARC existem subpopulações de neurônios que produzem peptídeos orexigênicos, tais como o neuropeptídeo Y (NPY) e o peptídeo relacionado ao gene agouti (AgRP); bem como neurônios produtores dos anorexigênicos, tais como o proopiomelanocortina (POMC) e o transcrito relacionado à cocaína e à anfetamina (CART) (Munzberg & Myers, 2005; Niswender, et al., 2004). Essas subpopulações são projetadas para os núcleos do hipotálamo lateral (LH) e do paraventricular (PVN). No LH duas subpopulações de neurônios produzem os neurotransmissores orexigênicos: Orexina e o antitermogênico: hormônio de concentração da melanina (MCH) (Sakurai et al., 1998; Elmquist et al., 1999), enquanto que no PVN outras 2 subpopulações de neurônios produzem os neurotransmissores anorexigênicos: hormônio liberador da corticotrofina (CRH) e protermogênico hormônio liberador da tirotrófina (TRH) (Flier 2004; Schwartz et al., 2000).

A sinalização hipotalâmica da insulina e leptina no ARC se dá através de sua interação com os receptores IR e Ob-R, respectivamente. Ambos os receptores estão interligados a via da PI3K, que por sua vez desencadeia uma redução na expressão e liberação de neuropeptídeos orexigênicos como o NPY e o AgRP e ativação dos neuropeptídeos anorexigênicos POMC e CART. Em seguida, neurônios do ARC comunicam-se através de sinapses com neurônio de

outros núcleos hipotalâmicos (Arora e Anubhuti 2006), estimulando o gasto energético e inibindo a ingestão alimentar.

O NPY encontra-se presente no sistema nervoso central e periférico, possuindo alta concentração no hipotálamo (Zhang et al., 2012). Trabalhos com camundongos *knockout* para receptores do NPY (Y1Y5^{-/-}) mostram uma redução no consumo alimentar associado à diminuição da expressão do NPY, sem alterar a expressão do POMC no ARC. Apesar da diminuição na ingestão alimentar, os camundongos continuam ganhando peso. Esse aumento de peso está associado à diminuição no gasto energético desses animais (Nguyen et al., 2012).

O AgRP é um neuropeptídeo orexigênico que age como antagonista do hormônio de estimulação do melanócito α (α -MSH) nos receptores de melanocortina MC3 e MC4. Esse neuropeptídeo é co-expresso em neuronônios NPY no ARC (Cone et al., 1999) e sua expressão é inibida na presença de leptina (Ollmann et al., 1997). O AgRP é considerado um peptídeo orexigênico mais robusto que o NPY, uma vez que uma única infusão intracerebroventricular (icv) aumenta de maneira contínua a ingestão calórica, quando comparado ao seu análogo NPY (Schwart et al., 2000).

O neuropeptídeo POMC sofre clivagem e dá origem ao α -MSH. Esse peptídeo exerce seu efeito ligando-se a família de receptores de melanocortina MC3 e MC4, gerando sinal de saciedade (Cone et al., 1996). Estudos têm demonstrado uma diferença na expressão do POMC e do NPY em animais resistentes e susceptíveis a dieta com alto teor de gordura (Bergen et al., 1999).

O neuropeptídeo CART está presente nos núcleos ARC, PVN, LH e no dorsomedial (DM) (Koylu et al., 1998; Elias et al., 2001; Kramer et al., 2007). A leptina pode elevar significativamente a expressão gênica desse neuropeptídeo. Todavia, um defeito na sinalização hipotalâmica desse hormônio, diminui a expressão gênica do CART (Kristensen et al., 1998). Muitos estudos têm demonstrado que, dependendo da linhagem genética e da condição nutricional, o CART pode ser expresso diferentemente em regiões específicas do cérebro responsável pelo balanço energético (Kristensen et al., 1998; Abbot et al., 2001; Sergeev et al., 2001; Robson et al., 2002). Além disso, sabe-se que o CART está virtualmente ausente no ARC, porém abundante em outros núcleos hipotalâmicos como o DM, em ratos Zucker e camundongos ob/ob (Kristensen et al., 1998).

1.3 Obesidade e Balanço energético

A Organização Mundial da Saúde (OMS) vem tratando a obesidade como uma epidemia mundial crescente a cada dia. Essa síndrome é uma desordem nutricional muito comum em populações ocidentais e ocorre devido a um crônico desbalanço entre o consumo e o gasto energético (Rosenbaum et al., 1997). A habilidade de controlar o ganho de peso depende da habilidade do organismo de aumentar o gasto e frear o consumo energético (Ziotopoulou et al., 2000).

O consumo de dieta hiperlipídica (DHL), por si só, é tão prejudicial que pode superar fatores genéticos promotores da obesidade e desordens metabólicas (Gorski et al., 2006). Na obesidade ocorrem alterações em diversos pontos da via de transdução do sinal da insulina, tanto nos tecidos periféricos quanto em neurônios responsáveis pela manutenção do peso corporal, levando a um círculo vicioso que desencadeia um maior ganho de peso contribuindo para o desenvolvimento do Diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (Schwartz e Jr. Porte, 2005).

Circuitos hipotalâmicos, além do seu papel sobre a ingestão alimentar, podem modular a sensibilidade à insulina e à leptina, no intuito de adaptar a condições metabólicas variadas de acordo com o estado nutricional (Heijboer et al., 2005).

Animais obesos induzidos por DHL apresentam prejuízo da ação anorexigênica da insulina e leptina em neurônios produtores de peptídeos anorexigênicos e termogênicos (De Souza et al., 2005; Prada et al., 2005; Moraes et al., 2009; Munzberg et al., 2004), caracterizando assim uma forte resistência central desses hormônios. Estes animais apresentam ativação da resposta inflamatória hipotalâmica, culminando com a resistência à insulina (De Souza et al., 2005; Munzberg et al., 2004; Zabolotny et al., 2008).

Existem várias evidências indicando o TAM como tecido regulador significativo do gasto energético corporal e também do acúmulo de gordura não apenas em roedores, como também em humanos (Saito., 2014) . Além deste papel regulatório, o TAM pode ser relevante para alguns distúrbios metabólicos (Saito., 2013). O grande número de mitocôndrias neste tecido possui proteínas desacopladora da cadeia respiratória, *uncoupling protein 1* (UCP1) (Né Chad et al., 1987). A atividade da UCP1 é controlada por inervação simpática neste tecido. A ativação simpática via receptores β -adrenérgicos, irá induzir lipólise e liberação de ácidos graxos, que irá ativar a UCP1 e simultaneamente servir como substrato para termogênese. Além disso, ativação prolongada nesse tecido induz hiperplasia e aumento nos níveis da UCP1 (Okamatsu-Ogura et al., 2011).

1.4 Desnutrição e Diabetes

Historicamente, a fome tem sido uma das maiores ameaças da humanidade, afetando cerca de 20-40 milhões de pessoas na China entre 1958-1961 e matando cerca de 4 milhões de pessoas na Índia em 1943. Atualmente, a fome continua sendo uma grande preocupação principalmente na região do Sahel na África, entretanto, muito menos pessoas vivem com fome hoje em dia do que no passado (Shekhar., 2013).

Crianças de mães grávidas que passaram por período longo de fome, tal como aconteceu no final da II guerra mundial “Dutch Famine” (1944–1945), eram mais susceptíveis a obesidade, diabetes e doenças cardiovasculares. Tal programação metabólica pode ser explicada pela hipótese do “Fenótipo Econômico”, o qual propõe que uma pobre nutrição fetal resulta em uma reprogramação fisiológica no intuito de permitir que a prole maximize a capacidade do corpo de estocar energia quando fora do útero (Hales e Ozane, 2003).

Condições nutricionais adversas encontradas durante o desenvolvimento fetal e na infância, são consideradas fatores de risco para o desenvolvimento de diversas doenças durante a vida adulta (Victora et al., 2008). Indivíduos neonatos com baixo peso corporal podem desenvolver obesidade, diabetes e hipertensão arterial na vida adulta (Barker et al., 1993).

Ratos submetidos à restrição protéica apresentam um aumento na sensibilidade a insulina no tecido muscular (Reis et al., 1997), além de outras alterações neuroendócrinas, muito pouco estudada neste modelo animal (Heilbronn e Ravussin, 2003). A restrição protéica durante a gestação e lactação leva a uma má formação em núcleos hipotalâmicos envolvidos no controle da ingestão alimentar (Plagemann et al., 2000).

Durante os primeiros estágios de desenvolvimento há uma janela de plasticidade neuronal e durante esse período o organismo tem um grande potencial de adaptação ao ambiente nutricional (Remmers et al., 2011; Metcalfe et al., 2001). O desenvolvimento de circuitos hipotalâmicos, que controlam o consumo e o gasto energético, ocorre durante este período. Sendo assim, perturbações nutricionais perinatais que possivelmente alterem os níveis de leptina podem ter consequências para a formação e função de circuitos regulatórios da ingestão alimentar durante a vida adulta (Bouret et al., 2004; Pinto et al., 2004).

Camundongos adultos, provenientes de mães submetidas à desnutrição protéica durante o período gestacional, apresentam várias características de diabetes, incluindo intolerância à glicose, aumento na adiposidade e alterações na fisiologia do ciclo circadiano relacionado à atividade

física e ao gasto energético (Sutton et al., 2010). No início desse século 171 milhões de pessoas foram estimadas serem diabéticas e acredita-se que no ano de 2030 esse número aumente para cerca de 366 milhões (Kahn et al., 2006). O DM2 caracteriza-se pela instalação de resistência periférica à insulina que em estágios iniciais é compensada pelo aumento da secreção de insulina por parte das células β pancreáticas. A progressão da resistência a esse hormônio leva à disfunção e morte das células β (Kahn et al., 2006).

Apesar de existirem muitas drogas no mercado para o tratamento do diabetes, diversas pesquisas vêm sendo realizadas no intuito de trazer novas terapias para a prevenção e tratamento de doenças relacionadas à síndrome metabólica, tal como o diabetes. Em modelo animal de desnutrição protéica fetal, a suplementação com o aminoácido taurina (Tau) preveniu uma redução tanto na proliferação das células β pancreáticas, como também na secreção de insulina (Kalbe et al., 2005). Sendo assim, a suplementação de aminoácidos está ganhando aceitação como uma importante terapia na prevenção e tratamento do diabetes e suas comorbidades. Mais precisamente, a suplementação com Tau vem sendo amplamente estudada na prevenção do aparecimento de diabetes mellitus em modelos experimentais dependentes ou não de insulina (Manna et al., 2013).

1.5 Taurina

A taurina (TAU) é um aminoácido contendo enxofre e está presente em altas concentrações em neonatos, principalmente no cérebro. A Tau é responsável pela manutenção do balanço osmótico intracelular (L'Amoreaux et al., 2010) e possui também um efeito neuroprotetivo (Albrecht e Schousboe 2005). Além disso, esse aminoácido é importante para o crescimento e desenvolvimento gestacional do feto (Desforgues et al., 2013), possuindo um papel importante no desenvolvimento fetal do cérebro, coração, rins, pâncreas, músculo esquelético e retina (Sturman 1988; Han et al., 2000; Heller-Stilb et al., 2002).

O tratamento *in vivo* com Tau aumenta tolerância à glicose e à insulina, bem como a captação de cálcio em ilhotas pancreáticas de camundongos (Ribeiro et al., 2009). Além disso, a suplementação com Tau em ratos desnutridos melhora a secreção de insulina induzida por nutrientes, bem como a tolerância à glicose desses animais (Batista et al., 2012). A suplementação com Tau em animais obesos reduz o acúmulo de gordura e níveis de leptina e

colesterol (Batista et al 2013b; You et al.,2013), além de diminuir o consumo exacerbado de calorias em animais alimentados com DHL (Camargo et al., 2013).

A concentração plasmática de Tau encontra-se reduzida em animais obesos com resistência à insulina. Por outro lado, a suplementação com esse aminoácido, reduz o ganho de peso corpóreo e de tecido adiposo induzido por DHL além de normalizar o metabolismo basal (Tsuboyama-Kasaoka et al., 2006). A suplementação materna de taurina durante o período gestacional e lactacional, melhora o metabolismo da glicose em ratos adultos provenientes de mães desnutrida (Tang et al., 2013). Além disso, a administração de Tau previne a ocorrência no desenvolvimento de nefropatias relacionada ao diabetes (Lin et al., 2009).

Quando administrada intracerebroventricular, assim como a insulina, esse aminoácido reduz a expressão do NPY hipotalâmico, além de potencializar o efeito anorexigênico da insulina (Solon et al., 2012). Além disso, animais suplementados com Tau apresentaram melhora na sensibilidade hipotâmica da insulina (Camargo et al., 2013). Sendo assim, a Tau pode interagir diretamente na via da sinalização hipotalâmica da insulina e leptina, como já descrito em tecidos periféricos (Carneiro et al, 2009).

A Tau regula a homeostase glicêmica/energética, atuando nos tecidos periféricos e regulando expressão de peptídeos hipotalâmicos. No entanto, os mecanismos pelos quais esse aminoácido atua ainda são pouco conhecidos.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Neste estudo tivemos como objetivo avaliar o efeito da suplementação de Taurina em modelo experimental de desnutrição protéica associado a dieta hiperlipídica na regulação da ingestão alimentar, sensibilidade hipotalâmica aos hormônios insulina e leptina, expressão dos neuropeptídeos controladores da fome e saciedade e no metabolismo energético em geral.

3. ARTIGO 1

Parte dos resultados obtidos durante a realização deste trabalho estão apresentados a seguir sob a forma de artigo científico publicado na revista *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2013;776:93-103.

EFFECTS OF TAURINE SUPPLEMENTATION UPON FOOD INTAKE AND CENTRAL INSULIN SIGNALING IN MALNOURISHED MICE FED ON A HIGH FAT DIET

Rafael L. Camargo¹, Thiago M. Batista¹, Rosane A. Ribeiro², Lício A. Velloso³, Antônio C. Boschero¹, Everardo M. Carneiro¹

¹Departamento de Biologia Funcional e Estrutural, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de 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 Clínica Médica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, SP, Brazil

*Correspondence to Rafael Ludemann Camargo

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

E-mail: rlcamargo.bio@gmail.com

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

3.1 Abstract

Feeding behavior is a major determinant of body composition, adiposity and glucose homeostasis. Both obesity and malnutrition are risk factors for the metabolic syndrome and are associated with altered food intake. Here we assessed the effects of taurine (TAU) supplementation upon adiposity, food intake and central insulin signaling in malnourished mice fed on a high-fat diet (HFD). Weaned male C57BL/6 mice were fed a control (14% protein-C) or a protein-restricted (6% protein-R) diet. After 6 weeks, both groups received or not HFD for 8 weeks (CH and RH). Half of the HFD groups were supplemented with 5% TAU (CHT and RHT). Both HFD groups were overweight and showed increased perigonadal and retroperitoneal fat pads. TAU supplementation attenuated obesity in CHT but not in RHT mice. HFD induced hypercholesterolemia and glucose intolerance, although only CH group presented fasting hyperglycemia. Tau supplementation also improved glucose homeostasis only in CHT mice. Western blot analysis showed a reduction of 55% in CH hypothalamic content of phosphorylated IRS-1 (pIRS-1) at basal condition compared with C. TAU treatment increased 35% Akt phosphorylation (pAkt) levels in CHT without modification in RHT hypothalamus. However, TAU supplementation did not alter hypothalamic pIRS-1 amount. CH and RH mice presented increased calorie intake that was normalized in CHT but not in RHT. In conclusion, mice fed on a HFD developed obesity, hypercholesterolemia, glucose intolerance and increased calorie intake. TAU promoted increased hypothalamic insulin action only in CH mice which was linked to prevention of overfeeding, obesity and glucose intolerance. Protein-restriction promoted metabolic damages that were not prevented by TAU supplementation.

Abbreviations: *Tau*, taurine; *ARC*, arcuate nucleus; *T2DM*, type 2 diabetes mellitus; *CNS*, central nervous system; *ICV*, intracerebroventricular; *TNF*, tumor necrosis factor.

Keywords: Hypothalamus; Insulin resistance; Malnutrition; Obesity; Taurine supplementation.

3.2 INTRODUCTION

The hypothalamic arcuate nucleus (ARC) control feeding behavior and sympathetic/parasympathetic tones modulating body metabolism (Plum et al., 2006; Schwartz et al., 2000).

Insulin crosses the blood-brain barrier and binds to its receptor (IR) located in the ARC. IR activated phosphorylates itself and its substrates (IRS) and leads to phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) activation and increase Akt phosphorylation (pAkt) (Tsai et al., 2003). Central activation of this pathway inhibits the synthesis of orexigenic neuropeptides, such as the neuropeptide Y (NPY) and the agouti peptide (AgRP); and stimulates the secretion of anorexigenic neuropeptides, proopiomelanocortin (POMC) and the cocaine-and-amphetamine-regulated transcript (CART) (Morton et al., 2006; Badman and Flier, 2005). Therefore, the hypothalamic activation of insulin signaling regulates food intake in order to maintain an adequate body weight. Obesity is a factor linked to peripheral and central insulin resistance leading to type 2 diabetes (T2DM) (Kahn et al., 2006). Impaired central action of insulin in the obesity results in a vicious circle which provides an increase in weight gain (Schwartz and Jr. Porte, 2005).

Protein-malnutrition during gestation is a frequent cause of low birth weight, and is associated with increased susceptibility for developing chronic diseases (Barker et al., 1993). Previous reports showed no alteration in IRS1/2 and Akt protein content in the cerebral cortex from caloric restricted rats (Mollinedo et al., 2010). Disrupted insulin signaling in the central nervous system (CNS) reflects on food intake and may link malnutrition in early life and development of T2DM in adulthood (Orozco-Solis et al., 2010).

Taurine (TAU), is a sulfur containing amino acid present in high concentration in newborn mice brain. This amino acid is responsible for the maintenance of intracellular osmotic balance (L'Amoreaux et al., 2010). TAU treatment during mice development causes increase of size and number of pancreatic islets without altering exocrine function (El Idrissi et al., 2009). Central administration of TAU exerts an anorexigenic effect, decreasing the expression of orexigenic neuropeptides and reducing food intake (Solon et al., 2012). As occurs in peripheral tissues (Carneiro et al., 2009), TAU also potentiates insulin action in hypothalamus (Solon et al., 2012). In this way, little is known about TAU effects upon malnutrition and obesity in hypothalamic insulin action and food intake regulation. Here we show that TAU supplementation improved body glucose control and enhanced central insulin sensitivity, resulting in decreased caloric intake that reduces body fat deposition in the obesity.

3.3 METHODS

3.3.1 Animals and diets

All experiments were approved by the ethics committee at UNICAMP. The studies were carried out on weaned 30-day old male C57Bl/6J mice obtained from the breeding colony at UNICAMP and maintained at $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$, on a 12h light-dark cycle, with free access to food and water intake. The mice were fed a control (14% protein-C) or a protein-restricted (6% protein - R) diet. After 6 weeks, both groups received or not HFD for 8 weeks (CH and RH). Half of the HFD groups were supplemented with 5% TAU in their drinking water since the weaning time until the end of experiment (CHT and RHT groups).

3.3.2 General nutritional parameters

Body weight (BW) was measured at the end of experimental period. In the last week of HFD treatment both mice groups were placed in metabolic cages and had their food intake monitored, as previously reported (Morrison & Campbell, 1960). At the end of the experimental period (14 weeks), fasted mice were decapitated, had their blood collected and plasma was stored at -20°C. Commercial kits were used according to the manufacturer's instructions for quantification of total plasma cholesterol (Roche/Hitachi; Indianapolis, USA). Plasma glucose was measured using a glucose analyzer (Accu-Chek Advantage, Roche Diagnostic, Switzerland).

3.3.3 Food intake

Food intake was monitored during the last week of treatment (8th week) using metabolic cages as previously reported (Morrison & Campbell, 1960).

3.3.4 Intraperitoneal glucose tolerance tests (ipGTT)

For ipGTT, blood glucose levels (time 0) were measured in overnight fasted mice using a glucose analyzer (Accu-Chek Advantage, Roche Diagnostic, Switzerland). A glucose load of 2 g/Kg body weight was then administered by ip injection and additional blood samples were collected at 15, 30, 60 and 120 min.

3.3.5 Western Blot

For protein expression experiments, after 12h of fasting the hypothalamus from all mice groups were removed and immediately homogenized 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

12,000 rpm at 4°C for 40 min to remove insoluble material. The protein concentration was assayed using the Bradford dye method (Bradford, 1976), 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 to 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), pIRS1 (1:1000, cat abcam-4888), IRS-1 (1:100, cat abcam-653-200). Detection was performed after 2 h incubation with a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (1:10,000, Invitrogen, São 5 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-IRS-1) were normalized by total protein expression (Akt and IRS-1), as previously described (Batista *et al.*, 2012; Ribeiro *et al.*, 2012).

3.3.6 Statistical analysis

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

3.4 RESULTS

3.4.1 Mice features

The low protein diet promoted lower body weight (BW) in R mice compared to C ($P < 0.05$; Fig1a). HFD increased BW as well as perigonadal and retroperitoneal fat pads ($P < 0.05$; Fig. 1a-c). TAU supplementation prevented obesity and adiposity in CHT but not in RHT group. HFD treatment also increased fasting plasma glucose and cholesterol which were reduced in CHT but not in RHT group (Tab.1).

Both CH and RH groups were glucose intolerant as indicated by a higher area under glycemic curve (AUC) during the ipGTT (Fig. 2c). Blood glucose levels peaked at 30 min for all experimental groups but its decay was impaired in CH and RH mice. TAU supplementation improved glucose tolerance in CHT but not in RHT group as indicated by the AUC (Fig. 2c).

Both groups treated with HFD increased energy intake and TAU supplementation decreased the caloric intake only in CHT group (Fig. 3).

3.4.2 Insulin-signaling proteins in hypothalamus

Malnourished mice showed a 38% lower pIRS-1 hypothalamic amount compared to C mice ($P < 0.05$; Fig 4a). HFD reduced basal hypothalamic pIRS-1 in CH and CHT mice compared to C ($P < 0.05$). In RH mice, despite a decrease of 17% in pIRS-1 protein content in the hypothalamus, no statistical significant difference was observed when compared to R mice (Fig. 4a). Akt phosphorylation did not differ in both types of mice groups fed on a HFD compared with their respective controls (Fig 4b). However, TAU supplementation increased 35% pAkt hypothalamic content in CHT mice compared to CH ($P < 0.05$; Fig 4b).

3.5 DISCUSSION

Fetus that underwent a protein restriction *in utero*, showed poor islet vascularization as well as increased apoptosis (Snoeck et al., 1900; Boujendar et al., 2002). Rats submitted to protein restriction during gestation become diabetic at 17 months of age (Petry et al., 2001). In addition these rodents showed neuroendocrine and sympathetic action alterations, changing growth hormone (GH)–insulin-like growth factor I (IGF-I) axis (Heilbronn and Ravussin, 2003). Our results indicate an increase of adiposity and glucose intolerance in malnourished mice submitted to HFD. These evidences demonstrate that fetal and early life stages are critical periods where nutrient deprivation may provoke long-lasting effects favoring diseases in adult life.

Previous reports showed that TAU plasma concentrations are reduced in different types of experimental obese rodents. TAU supplementation prevented body weight gain and adiposity induced by HFD (Tsuboyama-Kasaoka et al., 2006). Here, we also show that TAU supplementation prevented body fat accumulation, hypercholesterolemia and hyperglycemia caused by HFD in normal-protein mice (Tab. 1 and Fig 1). Nardelli et al. (2011) also show reduction in body adiposity and plasma lipid concentration in obese rats supplemented with TAU, decreasing hepatic lipid storage that may low liver lipid synthesis and secretion as well as transport to the tissues.

In addition, TAU improved glucose tolerance in obese normal-protein mice (Fig.2). This effect may be due to a possible interaction of TAU with the IR (Maturo and Kulakowski, 1988; Carneiro et al., 2009). Also, TAU treatment normalizes islet-cells proliferation and insulin secretion in fetal protein-restricted rodents (Kalbe et al., 2005). Restoration of insulin secretory capacity was observed in rats submitted to protein restriction started at weaning and treated with TAU (Batista et al., 2012).

Recently, Solon et al. (2012) showed that TAU dose-dependently had an anorexigenic effect upon hypothalamus. Intracerebroventricular (icv) of TAU reduce NPY expression without modifying the amount of POMC, decreasing food intake in rats. This TAU effect was accompanied by enhanced hypothalamic content of pAkt. In addition, TAU increase insulin hypothalamic sensitivity via Akt/FOXO1, JAK2, STAT3 and mTOR activation (Solon et al., 2012), suggesting a direct interaction of the amino acid with this pathway in CNS as already described in peripheral tissues (Carneiro et al., 2009). Our study is in accordance with the observations above since TAU supplementation also decreased food intake and increased hypothalamic pAkt in control mice fed on a HFD.

Few studies reported CNS insulin action in malnutrition. Mollinedo et al. (2010) described no significant difference in the IRS-1/2 and Akt protein content in the cerebral cortex of rats submitted to caloric restriction. On the other hand, microarray analysis in the hypothalamus of rats born to protein-restricted dams revealed increased expression of several genes involved in insulin signaling such as IRS-1, PI3K and Akt (Orozco-Solís et al., 2010). However, in our study we observed lower pIRS-1 without modification on pAkt hypothalamic content in protein restricted mice (Fig. 4).

It is known that rats fed on a HFD presented high levels of tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin-1 β (IL-1 β) and interleukin-6 (IL-6) in the hypothalamus (De Souza et al., 2005). Hypothalamic TNF- α impairs the anorexigenic action induced by insulin and leptin, via serine phosphorylation of IRS-1, inactivating and inhibiting subsequent events of hypothalamic insulin signaling (Romanatto et al., 2007; Amaral et al., 2006; De Souza et al., 2005). Moreover, others proteins as SOCS3 and PTP-1B are activated and promote degradation or dephosphorylation of the IRS (Pirola et al., 2004; Zabolotny et al., 2008; Bence et al., 2006). In accordance with these studies, our model of obesity induced by HFD also showed a decreased hypothalamic content of

pIRS-1 indicating central insulin action impairment. TAU supplementation enhanced pAkt and decreased food intake only in CHT mice (Fig. 3 and 4), showing that malnutrition leads to hypothalamic dysfunction that was not prevented by TAU.

3.6 CONCLUSION

In conclusion our results show that mice fed a HFD developed obesity, hypercholesterolemia, glucose intolerance and calorie intake disturbances both in control and malnourished mice. TAU promoted increased hypothalamic insulin action which prevented overfeeding and obesity. Protein-restriction promoted metabolic disturbs that were not restored by TAU supplementation showing enhanced risk to develop metabolic syndrome.

3.7 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).

3.8 CONFLICT OF INTEREST

The authors have no conflicts of interest.

3.9 REFERENCES

Amaral ME, Barbuio R, Milanski M, Romanatto T, Barbosa HC, Nadruz W, Bertolo MB, Boschero AC, Saad J, Franchini KG, Velloso LA (2006). Tumor necrosis factor- α activates signal transduction in hypothalamus and modulates the expression of pro-inflammatory proteins and orexigenic/anorexigenic neurotransmitters, *J Neurochem* 98:203–212.

Badman MK, Flier JS (2005). The gut and energy balance: visceral allies in the obesity wars, *Science* 307: 1909–1914.

Barker DJ, Martyn CN, Osmond C, Hales CN, Fall CH (1993). Growth in utero and serum cholesterol concentrations in adult life, *BMJ* 307:1524–1527.

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.

Bence KK, Delibegovic M, Xue B, Gorgun CZ, Hotamisligil GS, Neel BG, Kahn BB (2006). Neuronal PTP1B regulates body weight, adiposity and leptin action, *Nat Med* 12: 917–924.

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.

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* 2008; 1-9.

De Souza CT, Araujo EP, Bordin S, Ashimine R, Zollner RL, Boschero AC, Saad MJ, Velloso LA (2005). Short-term inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha expression reverses diet-induced diabetes mellitus and hepatic steatosis in mice., *Endocrinology* 146: 4192–4199.

El Idrissi A, Boukarrou L, L'Amoreaux WJ (2009). Taurine supplementation and pancreatic remodeling. *Adv Exp Med Biol* 643:353-358.

Heilbronn LK, Ravussin E (2003). Calorie restriction and aging: review of the literature and implications for studies in humans, *Am J Clin Nutr* 78:361–9.

Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM (2006). Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes, *Nature* 444: 840-846.

Kalbe L, Leunda A, Sparre T, Meulemans C, Ahn MT, Orntoft T, Kruhoffer M, Reusens B, Nerup J, Remacle C (2005). Nutritional regulation of proteases involved in fetal rat insulin secretion and islet cell proliferation, *Br J Nutr* 93:309–16.

L'Amoreaux WJ, Cuttitta C, Santora A, Blaize JF, Tachjadi J, Idrissi A El (2010). Taurine regulates insulin release from pancreatic beta cell lines, *Journal of biomedical science* 17(Suppl 1):S11, 1-8.

Maturo J, Kulakowski EC (1988). Taurine binding to the purified insulin receptor, *Biochem Pharmacol.* 1;37(19):3755-60.

Mollinedo EL, Millán EF, Santos LM, Honduvilla CJM, Alvarez C, Escrivá FJ (2010) Early undernutrition increases glycogen content and reduces the activated forms of GSK3, AMPK, p38 MAPK, and JNK in the cerebral cortex of suckling rats, *Neurochem* 112: 123–133.

Morrison AB & Campbell JA (1960). Evaluation of protein in foods. V. Factors influencing the protein efficiency ratio of foods, *J Nutr* 70, 112-118.

Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW (2006). Central nervous system control of food intake and body weight, *Nature* 2006 443: 289–295.

Nardelli TR, Ribeiro RA, Balbo SL, Vanzela EC, Carneiro EM, Boschero AC, Bonfleur ML (2011). Taurine prevents fat deposition and ameliorates plasma lipid profile in monosodium glutamate-obese rats, *Amino Acids* Oct;41(4):901-8.

Orozco-Solís R, Matos RJ, Guzmán-Quevedo O, Lopes de Souza S, Bihouée A, Houlgatte R, Manhães de Castro R, Bolaños-Jiménez F (2010). Nutritional programming in the rat is linked to long-lasting changes in nutrient sensing and energy homeostasis in the hypothalamus, *PLoS One*. 2010 Oct 21;5(10):e13537.

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* 2:139–43.

Pirola L, Johnston AM, Van Obberghen E (2004). Modulation of insulin action. *Diabetologia* 47: 170–184.

Plum L, Belgardt BF, Bruining JC (2006). Central insulin action in energy and glucose homeostasis., *J Clin Invest* 116:1761–1766.

Ribeiro RA, Batista TM, Coelho FM, Boschero AC, Lopes GS, Carneiro EM (2012). Decreased beta-cell insulin secretory function in aged rats due to impaired Ca²⁺ handling, *Exp Physiol* Apr 27.

Romanatto T, Cesquini M, Amaral ME, Roman EA, Moraes JC, Torsoni MA, Cruz-Neto AP, Velloso LA (2007). TNF- α acts in the hypothalamus inhibiting food intake and increasing the respiratory quotient--effects on leptin and insulin signaling pathways, *Peptides* 28: 1050–1058.

Schwartz MW, Jr. Porte D (2005). Diabetes, obesity, and the brain. *Science* 307: 375-379.

Schwartz MW, Woods SC, Porte Jr. D, Seeley RJ, Baskin DG (2000). Central nervous system control of food intake., *Nature* 404:661-71.

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.

Solon C, Franci D, Souza LMI, Romanatto T, Roman ER, Arruda A, Torsoni A, Carneiro EM, Velloso L (2012). Taurine enhances the anorexigenic effects of insulin in the hypothalamus of rats. *Amino Acids* 42(6):2403-10.

Tsai WC, Bhattacharyya N, Han LY, Hanover JA, Rechler MM (2003). Insulin inhibition of transcription stimulated by the forkhead protein Foxo1 is not solely due to nuclear exclusion, *Endocrinology*; 144: 5615–5622.

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.

Zabolotny JM, Kim YB, Welsh LA, Kershaw EE, Neel BG, Kahn BB (2008). Protein-tyrosine phosphatase 1B expression is induced by inflammation in vivo, *J Biol Chem* 283: 14230–14241.

Yun Yong Lee¹, Hwa-Jung Lee¹, Seung-Sook Lee², Jae Soo Koh², Cheng Ji Jin³, Sung-Hye Park⁴, Ka Hi Yi¹, Kyong Soo Park^{3,5} and Hong Kyu Lee (2011). Taurine supplementation restored the changes in pancreatic islet mitochondria in the fetal protein-malnourished rat, *British Journal of Nutrition* Oct;106(8):1198-206.

Table 1. Plasma cholesterol and blood glucose of fasted C, CH, CHT, R, RH and RHT mice.

	C	CH	CHT	R	RH	RHT
Glucose (mg/dL)	68.75±6.51	98.50±11.18*	80.43±3.84* [#]	78.67±6.73	86.67±5.47 ^{&}	93.86±5.14 ^{&}
Cholesterol (mg/dL)	108.2±11.64	146.7±6.5*	117.2±11.24 [#]	98.27±10.61	142.4±9.19 ^{&}	130.9±8.28 ^{&}

Values are means ± SEM. * P < 0.05 compared to C, # compared to CH, & compared to R. N=6-12

FIGURE LEGENDS

Figure 1. (A) Body weight; (B) retroperitoneal and (C) perigonadal fat pads in C, CH, CHT, R, RH and RHT mice. Values are means $\pm$ SEM. * $P < 0.05$ compared to C, # compared to CH, & compared to R. N=6-12.

Figure 2. Glucose tolerance test (GTT). (A) groups C, CH and CHT; (B) groups R, RH and RHT; (C) Area under curve. Bars represent means $\pm$ SEM of the area under curve. * $p < 0.05$ compared to C, # compared to CH, & compared to R. N=6.

Figure 3. Food intake (Kcal/dia) of C, CH, CHT, R, RH and RHT mice. Values are mean $\pm$ SEM. * $P < 0.05$ compared to C, # compared to CH and & compared to R groups. N=7.

Figure 4. Protein Expression. (A) Ratio of pIRS-1 by IRS-1 total content [pIRS-1/IRS-1]; (B) Ratio of pAKT by AKT total content [pAKT/AKT]. Data represents proteins expression in the hypothalamus of animals C, CH, CHT, R, RH and RHT. Bars represent means $\pm$ SEM. * $P < 0.05$ compared to C. N=4-8.

Figure 1

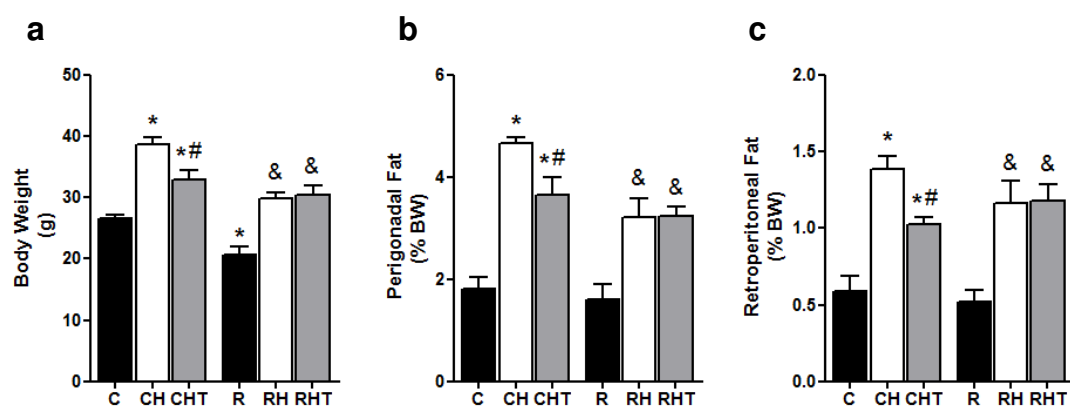


Figure 2

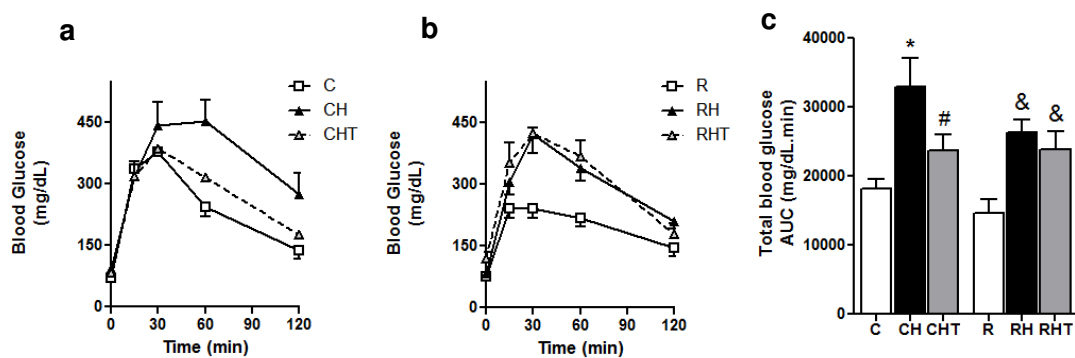


Figure 3

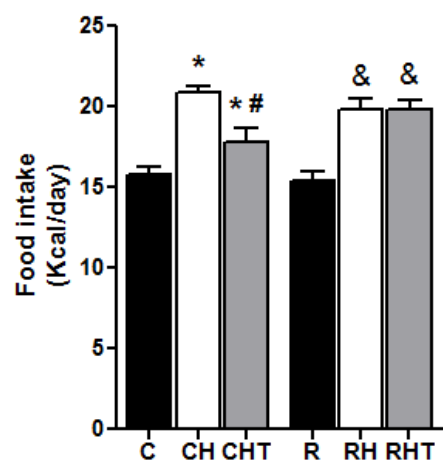
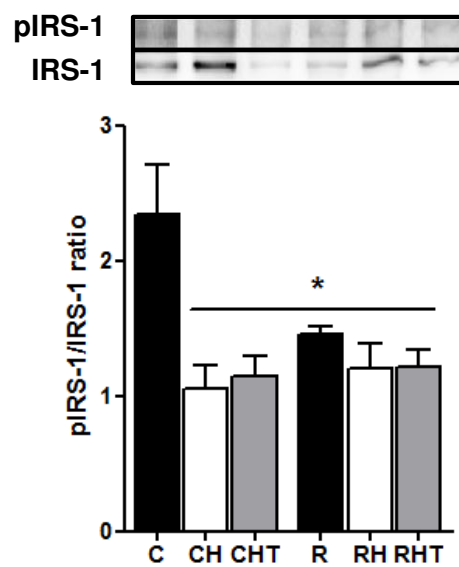
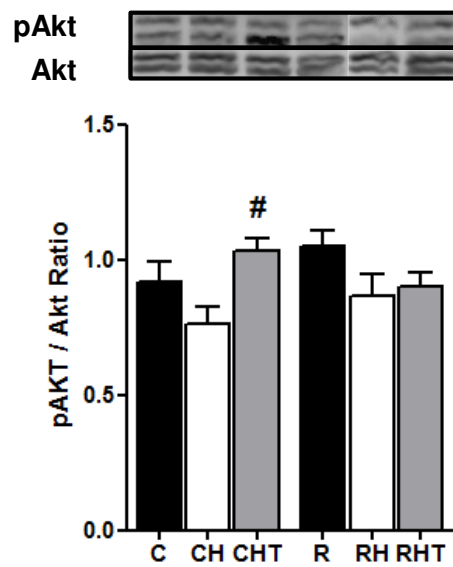


Figure 4

a



b



4. ARTIGO 2

Parte dos resultados obtidos durante a realização deste trabalho estão apresentados a seguir sob a forma de artigo científico, submetido para revista *Neuroendocrinology*.

**TAURINE SUPPLEMENTATION PRESERVES HYPOTHALAMIC LEPTIN ACTION
IN NORMAL AND PROTEIN-RESTRICTED MICE FED ON A HIGH-FAT DIET**

^{1*}Rafael L. Camargo, ¹Thiago M. Batista, ²Rosane A. Ribeiro, ¹Renato C. S. Branco, ¹Priscila M. R. Da Silva, ³Alexandre H. B. Matos, ³Cristiane S. Rocha, ³Iscia Lopes-Cendes, ¹Antônio C. Boschero, ^{1*}Everardo M. Carneiro

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

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

³Departamento de Genética Médica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, SP, Brazil

Corresponding author and address for proofs:

Dr. Everardo M. Carneiro and Rafael L. Camargo

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

E-mail: emc@unicamp.br and rlcamargo.bio@gmail.com

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

Short title: TAU preserves leptin action in normal and protein-restricted mice fed on a HFD

Key words: Food intake, High-fat diet, Hypothalamus, Neuropeptides, Protein-restriction, Taurine supplementation.

4.1 ABSTRACT

Malnutrition programs the neuroendocrine axis by impairing food intake control, leading to obesity. Taurine (Tau) is neuroprotective and improves hypothalamic anorexigenic action. Here, we evaluated the hypothalamic gene expression profile and food intake control in protein-malnourished mice that received a high-fat diet (HFD) and Tau supplementation. Male mice were fed a control (14% protein - C) or a protein-restricted diet (6% protein – R). Thereafter, mice received or not HFD for 8 weeks (CH and RH). Half the HFD groups were supplemented with 5% Tau since weaning (CHT and RHT). The study groups showed changes in hypothalamic expression of genes related to cellular defense, apoptosis, endoplasmic reticulum (ER) stress and the control of food intake. R mice exhibited hyperphagia as well as higher hypothalamic gene expression of orexigenic neuropeptides, which was reduced in HFD mice. Furthermore, HFD also showed hypophagia and reduced hypothalamic gene expression of anorexigenic neuropeptides. Tau increased hypothalamic gene expression of Pomc (proopiomelanocortin) and CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) only in RHT. There was an impairment in hypothalamic leptin signaling in CH and RH, which was prevented with Tau supplementation in CHT and RHT. However, the total caloric intake during the experimental period was normalized only in the CHT mice. Higher orexigenic neuropeptides in the hypothalamus of R mice enhanced food intake. HFD induced reduction in orexigenic neuropeptides, despite leptin resistance. Obesity cause hypothalamic leptin-resistance, which was reversed with Tau supplementation, despite of not improve in food intake of RHT.

4.2 INTRODUCTION

Nutrients, cytokines and hormones, such as leptin and insulin, regulate neuronal populations within the arcuate nucleus (ARC) of the hypothalamus [1]. The ARC contains neurons that produce the orexigenic peptides neuropeptide Y (NPY) and agouti-related peptide (AgRP) and anorexigenic neurons that synthesize proopiomelanocortin (Pomc) and the cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) [2, 3]. These neurons, together with the lateral (LH) and paraventricular (PVN) nucleus of the hypothalamus, control feeding behavior and whole-body energy expenditure [4-8].

The adipocytokine leptin crosses the blood-brain barrier and acts on the hypothalamus by increasing the synthesis of anorexigenic neuropeptides and suppressing the orexigenic neuropeptides, which results in the inhibition of food intake [9], [10].

Obesity is a worldwide epidemic that contributes to the development of insulin resistance and type 2 diabetes (T2D) [11]. Disruption in the actions of the central nervous system (CNS) may contribute to obesity onset [12]. In rodents submitted to high-fat diet (HFD), the hypothalamic anorexigenic effect of insulin and leptin is diminished [13-16]. A HFD was shown to increase inflammatory markers in the hypothalamus that impair food intake control, contributing to adiposity [13, 14, 17].

In addition, malnutrition during early life programs the neuroendocrine axis to favor the optimal growth of key organs at the expense of others and nutrient storage [18]. Maternal nutrient restriction alters hypothalamic neuropeptide mRNA levels in the offspring favoring orexigenic pathways [19]. However, little is known about the possible adaptations in hypothalamic leptin signaling in rodents that undergo protein-restriction after weaning.

Taurine (Tau) is a semi-essential amino acid present in high concentrations in the brain and is responsible for the maintenance of intracellular osmotic balance [20]. Tau suppresses the

activation of the ER stress response in the CNS [21, 22]. In the hypothalamus, Tau decreases NPY expression and enhances the anorexigenic effects of insulin [23]. In the periphery, Tau also improves insulin secretion [24, 25], increases insulin receptor phosphorylation [26] and prevents adiposity [27, 28] . Here, using a microarray analysis, we verified that several genes involved in the hypothalamic control of food intake are altered in malnourished mice. The association of malnutrition and HFD also changes the profile of hypothalamic mRNA expression. These alterations contribute to impairments in food intake control in malnutrition and obesity, and malnourished-mice that underwent HFD were associated with lower hypothalamic leptin action. Tau supplementation prevented the disruption of leptin signaling induced by HFD and modulated the expression of several hypothalamic genes.

4.3 MATERIALS AND METHODS

4.3.1 Animals and diets

All experiments were approved by the ethics committee at UNICAMP (protocol number: 2826-1). Weaned 30-day old male C57Bl/6J mice were obtained from the breeding colony at UNICAMP and maintained at $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ on a 12h light-dark cycle with free access to food and water. The mice were randomly assigned to the following groups: mice fed a control (14% protein - C group) or a protein-restricted diet (6% protein – R group). After 6 weeks, both groups either received or not HFD for 8 weeks (CH and RH groups). Half of the HFD groups were supplemented with 5% TAU in their drinking water from the time of weaning until the end of experiment (CHT and RHT groups).

Diets were prepared according to AIN-93 guidelines [29] and as previously described [28].

4.3.2 Biometric and nutritional parameters

During the 8 weeks of HFD treatment, all the mice in each group were placed in a metabolic cage and had their food intake and body weight (BW) measured [28]. At the end of the experimental period (14 weeks), final BW and nasoanal length were measured to obtain the Lee Index [from the ratio of BW (g)^{1/3}/nasoanal length (cm) x 1000], which was used as a predictor of obesity in rodents [30]. Fasted mice were euthanized in a CO₂ chamber followed by decapitation. The retroperitoneal and perigonadal fat pads and brain were removed and weighed. The blood was collected in heparinized tubes (1:1000) and centrifuged at 2,655 g for 15 min, and the plasma was stored at -20°C. Commercial kits were used according to the manufacturer's instructions for the quantification of triglycerides (TG), cholesterol (CHOL) (Roche/Hitachi; Indianapolis, USA) and plasma total proteins (Laborlab, Guarulhos, SP, BRA). Plasma glucose was measured using a glucose analyzer (Accu-Chek Advantage, Roche Diagnostic, Switzerland), and insulin was measured by radioimmunoassay using human insulin radiolabelled with ¹²⁵I as tracer, rat insulin as standard (Crystal Chem Inc., Downers Grove, IL, USA) and rat insulin antibody (donated by Dr Leclercq-Meyer, Free University of Brussels, Brussels, Belgium). The charcoal–dextran method was used to separate free insulin from antibody-bound [¹²⁵I]insulin [31].

4.3.3 Microarray analysis

Global hypothalamic gene expression was measured using the microarray GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 Array from Affymetrix® Company (Santa Clara, CA, USA), which contains 45,000 probe sets that analyze the expression level of over 39,000 transcripts and variants from over 34,000 well-characterized mouse genes. Total RNA was extracted using Trizol® (Invitrogen, São Paulo, SP, BRA). A total of 200 ng of RNA was used for cDNA synthesis,

which was processed with the 3' IVT Express Kit Assay. The hybridization, washing and revelation steps with streptavidin-PE were performed using the Hybridization, Wash and Stain kit according to the manufacturer's instructions. The arrays were analyzed using an Affymetrix® GeneChip® Scanner 3000 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) at the DNA microarray facility (LMA) - Brazilian Synchrotron Light Laboratory – Campinas – SP. Scanned images were analyzed in the R environment using the Affy and RankProd packages from Bioconductor using the algorithm MAS 5. We normalized the arrays and then calculated the signal intensity and the detection (presence or absence of expression). For statistical analysis, we used the Rank Product test, which is biologically motivated and designed to test and detect differentially expressed genes in replicated microarray experiments. This is a simple non-parametric statistical method based on ranks of fold changes. We used a p-value < 0.04 and a percentage of false positives (pfp) < 0.1 in order to consider a given transcript as differentially expressed. The number of probe sets in each comparison is shown in table 3. Pathway enrichment analysis was conducted using the MetaCore™ platform (<http://www.genego.com/metacore.php>, GeneGo, St. Joseph, MI, USA) [32-35].

4.3.4 Real Time quantitative RT-PCR

The microarray analysis of the hypothalamic neuropeptides was confirmed by real time quantitative RT-PCR. The hypothalamic mRNA extraction was performed using Trizol® according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, São Paulo, SP, BRA). A sample of 2 µg of each RNA was used for each reverse transcription reaction (RT) with random primers using DTT (100 mM), a dNTP mix (10 mM) and the enzyme SuperScript II (200U; Invitrogen, São Paulo, SP, BRA). The samples were then incubated for 50 min at 42°C to obtain the cDNAs. The PCR reactions were completed with a final volume of 20 µl and contained 4 µl cDNA (0.1

$\mu\text{g}/\mu\text{l}$), 10 pmol/l of NPY (Forward 5'TACTCCGCTCTGCGACACTA3', Reverse 5'TCTTCAAGCCTTGTTCTGGG3'), or AgRP (Forward 5'GAGTTCCCAGGTCTAAGTCTGAATG3', Reverse 5'ATCTAGCACCTCCGCCAAAG3'), or Pomc (Forward 5'GGCTTGCAAACCTCGACCTC3', Reverse 5'TGACCCATGACGTACTTCCG3') or CART (Forward 5'ACCTTTGCTGGGTGCCCCGTG3', Reverse 5' TGCAACGCTTCGATCAGCTCC3') primers and SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, São Paulo, SP, BRA). The transcripts were detected using the 7000 real time PCR system (Applied Biosystems, São Paulo, SP, BRA), and the threshold cycle values were used to calculate the number of cycles required to first detect a statistically significant increase in fluorescence intensity due to the binding of SYBR Green to a molecule of double-stranded DNA. The values were normalized by the values of control gene: rplp0 (ribosomal protein large P0, or 36B4) (Forward 5'GAGGAATCAGATGAGGATATGGGA3', Reverse 5'AAGCAGGCTGACTTGGTTGC3') and were shown as relative expression over the control group level ($2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$).

4.3.5 Evaluation of leptin action on food intake control

After acclimatization in the metabolic cages, mice of all groups were fasted for 6h (1:00 pm to 7:00 pm). At the end of this period, an intraperitoneal (ip) injection of saline (0.9% NaCl) was administered once daily. The same protocol was repeated for two consecutive days. Food intake was measured 12h after saline infusion each day and the diet consumption was calculated using the average of the two consecutive days. On the fourth and fifth days, the same mice were fasted again for 6 h (1:00 pm to 7 pm) and, at the end of this period, the mice received an ip injection of leptin (500 ng/g BW; recombinant mouse leptin from ©Merck - Calbiochem cat. #429705, Darmstadt, Germany) once daily according to Marroquí et al. (2010) with minor modifications.

Again, food intake was measured 12h after leptin infusion each day and the diet consumption was calculated using the average of the two consecutive days.

4.3.6 Western Blot

The hypothalamic leptin action was evaluated in all mice of all groups. Conscious mice received an ip injection of leptin (500 ng/g BW) or saline (0.9% NaCl). After 45 min, the mice were euthanized by decapitation, and the hypothalamus was removed and immediately homogenized in antiprotease buffer containing 100 mM Tris pH 7.5, 10 mM sodium pyrophosphate, 100 mM sodium fluoride, 10 mM EDTA, 10 mM sodium vanadate, 2 mM PMSF and 1% Triton X-100. The extracts were then centrifuged at 15,294 g at 4°C for 40 min to remove insoluble material. The protein concentration was determined by the Bradford dye method [36], using BSA as a standard curve. For PAGE and western blot analysis, the samples were treated with a Laemmli sample buffer containing dithiothreitol. After heating to 95°C for 5 min, the proteins were separated by electrophoresis (70 µg protein/lane, 10% gels). Following electrophoresis, the proteins were transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were treated with a blocking buffer (5% non-fat dried milk, 10 mM Tris, 150 mM NaCl, and 0.02% Tween 20) and were subsequently incubated overnight with a polyclonal antibody against the phospho signal transducer and activator of transcription 3 (pSTAT3; 1:1000, cat. #9131S) or total STAT3 (1:1000, cat. # 4904S). Both primary antibodies were from Cell Signaling Technology® (Danvers, MA, USA). Detection was performed after a 2h incubation period using a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (1:10000, Invitrogen, São Paulo, SP, BRA). The band intensities were quantified by optical densitometry using the free software Image J Tool (<http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/itdesc.html>). The densitometry values obtained from pSTAT3 were normalized by STAT3 protein expression. After assaying the target proteins, Western blotting

was repeated using a rabbit polyclonal antibody to the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase protein (GAPDH; 1:1,000; cat. n° sc-25778, Santa Cruz Biotechnologies, CA, USA) as an internal control.

4.3.7 Statistical analysis

The results are presented as means $\pm$ SEM for the number of samples (n) indicated. The statistical analyses were carried out using a Student's *t* test (to compare results from saline and leptin-stimulated conditions, Fig. 3) or one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's post-test with the Statistica 5.0 software (Stantsoft, Tulsa, OK, USA), and the level of significance was set at $P < 0.05$. Prior to ANOVA analysis, a Gaussian distribution of the samples was assumed based on the Kolmogorov-Smirnov normality test using Graph-Pad Prism version 5.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

5. RESULTS

5.1 Mice features

At the end of the experimental period, R mice showed a lower body weight and nasoanal length (BW) compared with C mice ($P < 0.05$; Tab. 1). The HFD treatment increased BW and body length in the CH and RH groups ($P < 0.05$). Tau supplementation reduced BW in the CHT group when compared with the CH mice ($P < 0.05$). HFD efficiently induced obesity, as the CH and RH groups showed a higher Lee index and retroperitoneal and perigonadal fat pads in comparison with the C and R groups, respectively ($P < 0.05$; Tab. 1). Tau supplementation decreased fat deposition only in the CHT mice ($P < 0.05$), but the treatment efficiently normalized the Lee index in both the RHT and CHT groups (Tab. 1). The R mice exhibited an enhanced ratio between brain weight and BW when compared with the C mice ($P < 0.05$). All HFD-fed groups,

regardless of Tau supplementation, showed a decrease in the brain/BW ratio in comparison with their respective controls ($P < 0.05$; Tab. 1).

All HFD mice showed higher fasting glycaemia when compared with their respective controls ($P < 0.05$; Tab. 2). Only in CHT group Tau treatment normalized glycaemia (Tab. 2). Whereas, at fed conditions no alterations in plasma glucose levels were observed between the groups (Tab. 2). In addition, only the CH mice developed hyperinsulinemia in both fasted and fed states when compared with the C mice ($P < 0.05$; Tab. 2). Tau supplementation normalized plasma insulin in the CHT mice (Tab. 2). The plasma lipid profile was also modulated by the nutritional interventions. The TG levels were unaltered during fasting but were higher in the RH and RHT fed mice when compared with R ($P < 0.05$; Tab. 2). The HFD treatment increased plasma CHOL in the normal protein and malnourished mice in both nutritional states ($P < 0.05$; Tab. 2). Tau supplementation promoted CHOL reduction only in the fasted CHT mice when compared with the CH mice ($P < 0.05$; Tab.2). In addition, the low-protein diet treatment efficiently induced malnutrition in R mice, as the total plasma proteins were lowered compared with the C group ($P < 0.05$; Tab. 2). The HFD treatment recovered plasma proteins in all groups (Tab. 2).

5.2 Food intake

Figure 1 shows the weekly ratio between food consumption and BW. Malnourished mice showed enhanced food intake, as judged by the higher area under the curve (AUC) when compared with the C group ($P < 0.05$; Fig. 1C). All the HFD-mice had a lower food intake than the C mice ($P < 0.05$; Fig. 1C).

During the last week of treatment, the R mice were persistently hyperphagic ($P < 0.05$; Fig. 1D), but their calorie intake was matched to that of the C mice (Fig. 1E). In addition, although the RH and CH groups showed a lower amount of food intake when compared with their respective

controls ($P < 0.05$; Fig. 1D), the calorie intake was higher due to the hypercaloric nature of the diet ($P < 0.05$; Fig. 1E). Tau supplementation modified the total food intake only in the CHT mice ($P < 0.05$; Fig. 1D) and decreased the total calorie intake when compared with the CH mice (Fig. 1E). However, the RHT mice persistently showed a hypercaloric intake at the end of the experiment (Fig. 1E). Protein intake in the malnourished mice remained low despite an increase in food intake (Fig. 1F and 1D). The low food intake in the HFD mice also favors a lower protein intake; however, the CHT mice show an increase in protein intake when compared with the CH mice (Fig. 1F).

5.3 Hypothalamic gene expression profile

The altered food consumption observed in the malnourished mice and the hypercaloric intake observed in the RH and RHT groups suggests a deleterious action of the low-protein diet upon the hypothalamic control of food intake. Hence, we performed a microarray analysis of the hypothalamus in order to gain insight into the possible mechanisms responsible for these alterations.

The low-protein diet significantly changed the expression of 787 probe sets, 54% of which were up-regulated and 46% were down-regulated in the R mice. Furthermore, in the CH hypothalamus the expression of 769 probe sets was modified, 56% of which were up-regulated and 44% down-regulated in comparison with the C group. The malnourished mice fed a HFD showed a down-regulation of 55% of probe sets and an up-regulation of 45% of the probe sets when compared with R mice. Finally, Tau supplementation altered the expression of 429 probe sets, with an up-regulation of 32% and down-regulation of 68% in the CHT mice when compared with the CH group. Moreover, in the RHT mice, there was an alteration of 540 probe sets, where 26% were up-regulated and 74% down-regulated when compared with the RH group (Tab. 3).

Microarray analysis showed that hypothalamic neuropeptides involved in the control of food intake are regulated by diet and/or Tau treatment (Tab. 4). In the R group, NPY and AgRP gene expression was higher when compared with the C group ($P < 0.0004$ and $P < 0.04$; Tab. 4). Both the CH and RH mice showed a significant decrease in these orexigenic neuropeptides when compared with the C mice ($P < 0.0002$ and $P < 0.0001$) and R mice ($P < 0.0001$), respectively (Tab. 4). Tau supplementation decreased the NPY mRNA content in the RHT group when compared with the RH mice ($P < 0.0001$; Tab. 4), whereas it did not modify AgRP mRNA expression between the other groups. In addition, in the R mice there was a decrease in CART prepropeptide (CARTpt) expression when compared with the C mice ($P < 0.0001$) without an alteration in Pomc mRNA. Malnourished mice fed the HFD diet showed a higher expression of Pomc and CARTpt genes in comparison with the R group ($P < 0.0001$; Tab. 4). In the CH mice, only the expression of CARTpt was increased ($P < 0.0007$). A close inspection of the microarray data revealed an upregulation of POMC in CH group when compared with C with a P-value of 0.0024, but a pfp higher than 0.1. Tau supplementation increased the gene expression of these anorexigenic neuropeptides only in the RHT group (Tab. 4).

In addition to genes related to food intake, we also verified that malnutrition, HFD and/or Tau treatment modified the expression of several genes involved in different metabolic pathways in the hypothalamus (Tab. 5, 6 and 7).

The genes involved in the tricarboxylic acid cycle (TCA), glycolysis/gluconeogenesis and oxidative phosphorylation are shown in table 5. Microarray analysis showed that 5 genes that play a role in glycolysis/gluconeogenesis were down-regulated in the R group when compared with the C group (Tab. 5). In the hypothalamus of the CH group, 5 genes were up-regulated and 3 down-regulated. In the RH group, however, 1 gene increased, and the mRNA content for 4 genes was reduced (Tab. 5). Tau treatment restored some alterations induced by HFD. Aldoc and Tpi1

in the CHT group and *Mdh1* and *Ldhd* in the RHT group showed an inverse profile from that observed in the CH and RH groups (Tab. 5). For oxidative phosphorylation, 17 genes were down-regulated by malnutrition (Tab. 5). The HFD-treatment reduced the expression of 8 genes and increased the expression of 12 mRNAs in the hypothalamus of CH mice. In RH, 11 genes were down-regulated and 10 genes were up-regulated (Tab. 5). Tau prevented the HFD-induced alterations in genes involved in oxidative phosphorylation, as 9 genes showed an inverted pattern of expression compared with the CH group (Tab. 5). Supplementation in the RHT group only reversed the expression of 3 genes (Tab. 5).

Genes involved in the unfolded protein response, apoptosis and ER stress pathway were also modified between the groups and are shown in table 6. Among the 28 genes involved in these processes that were modified by diet and/or Tau treatment, in the hypothalamus of R mice, 12 were down-regulated and 7 were up-regulated when compared with the C mice (Tab. 6). Eleven genes in the CH and 7 genes in the RH mice were expressed higher than in their respective controls (Tab. 6). Tau treatment reversed the HFD-induced gene expression alteration in 6 mRNAs in the CH and 7 mRNAs in the RH mice that are involved in cellular defense and apoptosis (Tab. 6).

The insulin and leptin-signaling and inflammatory pathways were also altered in hypothalamus by diet and/or Tau supplementation and are shown in table 7. In the R group, 18 genes involved in these pathways were up-regulated in comparison with the C group (Tab. 7). HFD consumption lowered the content of 12 and 14 hypothalamic genes in the CH and in the RH group, respectively (Tab. 7). In the CHT and RHT mice, the expression of 6 and 2 genes, respectively, was reversed by Tau supplementation (Tab. 7).

Other genes involved in oxidative stress, inflammatory response, protein synthesis and degradation, lipid biosynthesis, neuropeptide signaling pathways and transcriptional regulation were also altered by diet or supplementation and are shown in the supplementary data.

5.4 Gene expression of neuropeptides involved in feeding behavior

Figure 2 shows the gene expressions of the orexigenic and anorexigenic neuropeptides that were detected at significant levels in microarray analyses and were modified by diet and/or Tau supplementation. The hypothalamus from the R mice showed an increase in the gene expression of NPY and AgRP by 37% and 60% when compared with the C group ($P < 0.05$; Fig. 2A and 2B). Conversely, in the CH mice, decreases in NPY and AgRP by 46% and 42%, respectively, were observed compared with the C mice ($P < 0.05$; Fig. 2A and 2B). In the RH group, there was a 31% decrease in the mRNA content of NPY and AgRP compared with the R mice ($P < 0.05$; Fig. 2A and 2B). Tau did not alter the HFD-induced alterations in the expression of orexigenic neuropeptides (Fig. 2A and 2B).

The mRNA content of Pomc and CART did not differ between the R and C mice (Fig. 2C and 2D). HFD treatment increased the expression of Pomc and CART in the CH mice ($P < 0.05$; Fig. 2C and 2D). In the RH mice, no modification in anorexigenic neuropeptides was observed in the hypothalamus. Tau supplementation did not modify these parameters in the CHT group (Fig. 2C and 2D); however, Pomc and CART mRNA was significantly increased in the RHT group ($P < 0.05$; Fig. 2C and 2D).

5.5 Leptin-induced anorexigenic response and hypothalamic signaling

Finally, the hypothalamic control of food consumption was evaluated using leptin in all groups (Fig. 3). Leptin administration significantly reduced the 12h food intake in the R and C mice ($P <$

0.03 and $P < 0.004$; Fig. 3A). This response was abolished in normal protein and malnourished HFD-treated mice. The anorexigenic response to leptin was restored in both Tau-supplemented groups ($P < 0.04$ in CHT and $P < 0.03$ in RHT; Fig. 3A). In the same mice, the effect of leptin on the hypothalamus was confirmed by the ratio of phosphorylated STAT3 (pSTAT3) to STAT3 total protein after an acute ip leptin administration (Fig. 3B). Leptin induced a 79% and 56% increase in the pSTAT3/STAT3 protein expression in the C and R groups, respectively, ($P < 0.008$ and $P < 0.04$; Fig. 3B). No modification in pSTAT3/STAT3 content was observed for the RH and CH mice after leptin administration. Tau supplementation increased pSTAT3/STAT3 hypothalamic protein content in the CHT and RHT mice by 69% and 81%, respectively ($P < 0.02$ and $P < 0.002$; Fig. 3B). No alteration in hypothalamic STAT3 protein expression was observed between the groups (Fig. 3C).

6. DISCUSSION

Malnourished mice showed lower BW, body-length, and total protein levels and a higher brain to BW ratio (Tab. 1 and 2), which are characteristics of malnutrition induced by a low-protein diet [25, 28, 37]. The HFD treatment effectively induced obesity in normal and restricted-protein mice by increasing BW, fat stores, and the plasma levels of CHOL and TG. In accordance with a previous report [28], we also verified that Tau supplementation only prevented fat deposition in normal-protein HFD mice (Tab. 1).

Protein-malnutrition during early life may lead to obesity and glucose intolerance in adulthood [38]. Recently, our laboratory demonstrated that protein-malnourished mice that are fed a HFD developed obesity, hyperleptinemia, glucose intolerance and insulin resistance. These features were associated with increased calorie intake [28]. Here, using the same rodent model, we aimed to extend these findings through a comprehensive evaluation of food intake, gene expression

profile and central leptin signaling in the hypothalamus. In addition, we investigated whether Tau supplementation modulated these processes, as central administration of this amino acid exerts anorexigenic effects [23].

Mice that were fed a low-protein isocaloric diet showed increased food consumption, yet calorie intake was matched to normal-protein mice (Fig. 1E). This effect was associated with an increase in the expression of NPY and AgRP (Fig. 2 and Tab. 4). In fact, a low-protein diet was reported to result in reduced activation of satiety centers, leading to increased food intake [39]. In offspring of dams submitted to a protein-restricted diet, during gestation and lactation, hyperphagia associated with an increased expression of NPY and AgRP in the hypothalamus was described [40, 41]. In peripheral tissues, offspring of dams fed a low-protein diet during gestation showed increased insulin sensitivity at 3 months of age [42]; however, at 17 months, insulin resistance and diabetes were established [43]. In addition, rats that underwent protein-malnutrition during lactation showed a lower hypothalamic STAT3 protein expression [44] and reduced leptin-induced anorexigenic effects [45]. In contrast to this study, the adaptive gene expression of hypothalamic neuropeptides during protein-malnutrition observed in our study was not due to impairment of hypothalamic leptin action, as leptin administration efficiently suppressed food consumption and increased pSTAT3/STAT3 protein expression in the R mice (Fig. 3A and 3B). However, we previously demonstrated that R mice showed a lower pIRS (phosphorylated insulin receptor substrate)-1 protein content in the hypothalamus [26], which may contribute to central insulin resistance and increased orexigenic neuropeptide expression.

In a previous work [28] and in this study, hypophagia was observed during the experimental period in both the RH and CH mice, whereas increased caloric intake was verified in the last week of HFD treatment. It is known that HFD modifies hypothalamic neuropeptide expression during the treatment period. Increased NPY mRNA content in the ARC was observed during the

first 2 weeks in diet-induced obesity rats, whereas at 12 weeks, these rats showed a decrease in NPY gene expression [46]. Here, we also observed a reduction in the expression of NPY and AgRP in the hypothalamus of RH and CH mice by microarray and PCR analysis (Fig. 2A and 2B). Levin and Dunn-Meynell (2002) suggested that an increase in orexigenic neuropeptide may contribute to obesity onset; however, the adaptive reduction of this neuropeptide with the prolongation of high energy intake may act to combat weight gain. Here, we observed increased mRNA content of CART and POMC in hypothalamus of normal protein obese mice, whereas this response was blunted in protein-restricted mice fed a HFD (Fig. 2C and 2D). A similar neuropeptides expression profile was previously observed in normal protein rodents fed a HFD [47, 48] . Thus, the protein restriction background may lead to differential adaptive responses to the HFD.

Hyperleptinemia was also reported in normal and protein restricted-HFD mice, which was decreased when supplemented with TAU only in CHT, using the same experimental rodent model [28]. Here, we observed that the impairment in hypothalamic leptin signaling may be partially involved in caloric food intake and hypothalamic gene expression alterations in the RH and CH mice, as neither these mice groups showed an increase in pSTAT3/STAT3 protein expression (Fig. 3B) or inhibition of food intake (Fig. 3A) after leptin administration. Hypothalamic leptin resistance occurs in HFD rodents [13], [16, 49]. An HFD was shown to increase the expression of inflammatory markers in the hypothalamus [14]. This pathway was involved in the desensitization of the leptin action in the hypothalamus [50, 51]. In addition, it is important to mention that in the hypothalamus of RH and CH mice, a decrease in pIRS-1/IRS-1 protein expression was shown to occur [26], which probably contributed to alteration in hypothalamic gene expression and feed behavior in these groups.

In a previous study, the sulphated amino acid Tau demonstrated anorexigenic effects by decreasing NPY gene expression and enhancing insulin action [23]. Here, despite Tau supplementation did not prevent alterations in orexigenic neuropeptides genes that were induced by HFD (Tab. 4 and Fig. 2) in the hypothalamus of RHT mice, Tau increased Pomc and AgRP mRNA (Fig. 2C and Fig. 2D). Also, Tau only reduced caloric consumption in the CHT group (Fig. 1E), whereas Tau efficiently preserves leptin hypothalamic action in both RHT and CHT mice, as both groups exhibited inhibition of food intake (Fig. 3A) and increased pSTAT3/STAT3 (Fig. 3B) protein expression after leptin injection. Solon et al. (2012) reported that Tau intracerebroventricular administration increased JAK2/STAT3 pathway activation. This amino acid also shows anti-inflammatory properties by decreasing cytokine levels in the brain and peripheral tissues [52-54]. In addition, hypothalamic pAkt/Akt protein content was higher in the CHT mice [26]. This evidence suggests that the preservation of leptin signaling in the hypothalamus partially controls food intake in RHT, as Tau did not improve hypothalamic pAkt expression during basal conditions in this group [26], which did not promote fully normalization of the hypothalamic control of food intake in the RHT group.

The microarray analyses also demonstrated that the diet and/or Tau supplementation also alters the expression of mRNA related to TAC, glycolysis/gluconeogenesis and oxidative phosphorylation (Tab. 5); unfolded protein response, apoptosis and ER stress pathway (Tab. 6); and leptin and insulin signaling and inflammatory pathways (Tab. 7).

Our results showed that in the R hypothalamus, there is a reduction in several genes involved in glycolysis/gluconeogenesis, TAC and oxidative phosphorylation. Previously, modifications in TCA and mitochondrial oxidative phosphorylation genes were reported by microarray analysis in islets isolated from fetal protein-restricted rats [55]. In *Zucker-fatty* rats, the enhanced protein expression of several mitochondrial subunits of the respiratory chain in the hypothalamus leads to

a neural glucose hypersensitivity, which impairs the redox signaling, promoting oxidative stress and more hypothalamic damage [56]. In accordance with our results (Tab. 6), the HFD groups also had an increase in the expression of genes related to the unfolded protein response and ER stress. This pathway is involved in leptin desensitization in the hypothalamus, which may enhance NPY and AgRP mRNA levels, promoting hyperphagia [57].

Tau shows antioxidant properties and regulates mitochondrial function. Tau normalized the expression of genes involved in TCA, glycolysis, cellular defense, cellular growth and proliferation in fetal pancreatic islets from protein-restricted dams [55]. In PC12 cells, Tau decreased the ER stress activation induced by peroxide [21]. Tau also reduced superoxide production in the mitochondria of cardiomyocytes by enhancing electron transport chain activity [58]. Malnourished mice supplemented with Tau showed better redox balance and insulin signaling in the liver and a reduction in ER stress markers such as p-PERK and BIP [28, 59, 60]. In accordance with all these studies, here, Tau supplementation decreased the fold change in genes related to the unfolded protein response, apoptosis and the ER stress pathway in the hypothalamus of the RHT and CHT mice (Tab. 5 and 6), which may contribute to better leptin signaling in these groups.

In summary, malnourished mice showed a higher food intake in order to compensate for the lack of protein in their diet. This adaptive process is accompanied by a hypothalamic increase in NPY and AgRP expression. However, the consumption of HFD for 8 weeks reduced orexigenic and increased the expression of anorexigenic neuropeptides genes in the hypothalamus of RH and CH mice, despite the leptin resistance that was established. Tau supplementation prevented the impairment in hypothalamic leptin signaling in the RHT and CHT mice. However, the total caloric intake during the experimental period was normalized only in the CHT mice.

7. ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by grants from the following Brazilian foundations: Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). We also thank Maria Eugenia R. Camargo and Prof. Dr. Jörg Kobarg from Brazilian Synchrotron Light Laboratory for help and technical assistance in the manipulation of microarray chips.

8. REFERENCES

- 1 Plum L, Belgardt BF, Brüning JC: Central insulin action in energy and glucose homeostasis. *J Clin Invest* 2006;116:1761-1766.
- 2 Münzberg H, Myers MG: Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance. *Nat Neurosci* 2005;8:566-570.
- 3 Niswender KD, Baskin DG, Schwartz MW: Insulin and its evolving partnership with leptin in the hypothalamic control of energy homeostasis. *Trends Endocrinol Metab* 2004;15:362-369.
- 4 Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JR, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu WS, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ, Yanagisawa M: Orexins and orexin receptors: A family of hypothalamic neuropeptides and g protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 1998;92:573-585.
- 5 Elmquist JK, Elias CF, Saper CB: From lesions to leptin: Hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron* 1999;22:221-232.
- 6 Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Seeley RJ, Baskin DG: Central nervous system control of food intake. *Nature* 2000;404:661-671.
- 7 Flier JS: Obesity wars: Molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell* 2004;116:337-350.
- 8 Myers MG, Olson DP: Central nervous system control of metabolism. *Nature* 2012;491:357-363.
- 9 Jéquier E: Leptin signaling, adiposity, and energy balance. *Ann N Y Acad Sci* 2002;967:379-388.

- 10 Dhillon SS, Belsham DD: Leptin differentially regulates npy secretion in hypothalamic cell lines through distinct intracellular signal transduction pathways. *Regul Pept* 2011;167:192-200.
- 11 Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM: Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 2006;444:840-846.
- 12 Purkayastha S, Cai D: Neuroinflammatory basis of metabolic syndrome. *Mol Metab* 2013;2:356-363.
- 13 Münzberg H, Flier JS, Bjørbaek C: Region-specific leptin resistance within the hypothalamus of diet-induced obese mice. *Endocrinology* 2004;145:4880-4889.
- 14 De Souza CT, Araujo EP, Bordin S, Ashimine R, Zollner RL, Boschero AC, Saad MJ, Velloso LA: Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology* 2005;146:4192-4199.
- 15 Prada PO, Zecchin HG, Gasparetti AL, Torsoni MA, Ueno M, Hirata AE, Corezola do Amaral ME, Höer NF, Boschero AC, Saad MJ: Western diet modulates insulin signaling, c-jun n-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion. *Endocrinology* 2005;146:1576-1587.
- 16 Moraes JC, Coope A, Morari J, Cintra DE, Roman EA, Pauli JR, Romanatto T, Carnevalheira JB, Oliveira AL, Saad MJ, Velloso LA: High-fat diet induces apoptosis of hypothalamic neurons. *PLoS One* 2009;4:e5045.
- 17 Zabolotny JM, Kim YB, Welsh LA, Kershaw EE, Neel BG, Kahn BB: Protein-tyrosine phosphatase 1b expression is induced by inflammation in vivo. *J Biol Chem* 2008;283:14230-14241.

- 18 Remacle C, Dumortier O, Bol V, Goosse K, Romanus P, Theys N, Bouckennooghe T, Reusens B: Intrauterine programming of the endocrine pancreas. *Diabetes Obes Metab* 2007;9 Suppl 2:196-209.
- 19 Breton C: The hypothalamus-adipose axis is a key target of developmental programming by maternal nutritional manipulation. *J Endocrinol* 2013;216:R19-31.
- 20 L'Amoreaux WJ, Cuttitta C, Santora A, Blaize JF, Tachjadi J, El Idrissi A: Taurine regulates insulin release from pancreatic beta cell lines. *J Biomed Sci* 2010;17 Suppl 1:S11.
- 21 Pan C, Giraldo GS, Prentice H, Wu JY: Taurine protection of pc12 cells against endoplasmic reticulum stress induced by oxidative stress. *J Biomed Sci* 2010;17 Suppl 1:S17.
- 22 Gharibani PM, Modi J, Pan C, Menzie J, Ma Z, Chen PC, Tao R, Prentice H, Wu JY: The mechanism of taurine protection against endoplasmic reticulum stress in an animal stroke model of cerebral artery occlusion and stroke-related conditions in primary neuronal cell culture. *Adv Exp Med Biol* 2013;776:241-258.
- 23 Solon CS, Franci D, Ignacio-Souza LM, Romanatto T, Roman EA, Arruda AP, Morari J, Torsoni AS, Carneiro EM, Velloso LA: Taurine enhances the anorexigenic effects of insulin in the hypothalamus of rats. *Amino Acids* 2012;42:2403-2410.
- 24 Ribeiro RA, Bonfleur ML, Amaral AG, Vanzela EC, Rocco SA, Boschero AC, Carneiro EM: Taurine supplementation enhances nutrient-induced insulin secretion in pancreatic mice islets. *Diabetes Metab Res Rev* 2009;25:370-379.
- 25 Batista TM, Ribeiro RA, Amaral AG, de Oliveira CA, Boschero AC, Carneiro EM: 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.

- 26 Camargo RL, Batista TM, Ribeiro RA, Velloso LA, Boschero AC, Carneiro EM: Effects of taurine supplementation upon food intake and central insulin signaling in malnourished mice fed on a high-fat diet. *Adv Exp Med Biol* 2013;776:93-103.
- 27 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.
- 28 Batista TM, Ribeiro RA, da Silva PM, Camargo RL, Lollo PC, Boschero AC, Carneiro EM: Taurine supplementation improves liver glucose control in normal protein and malnourished mice fed a high-fat diet. *Mol Nutr Food Res* 2013;57:423-434.
- 29 Reeves PG: Components of the ain-93 diets as improvements in the ain-76a diet. *J Nutr* 1997;127:838S-841S.
- 30 Bernardis LL, Patterson BD: Correlation between 'lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. *J Endocrinol* 1968;40:527-528.
- 31 Scott AM, Atwater I & Rojas E: A method for the simultaneous measurement of insulin release and B cell membrane potential in single mouse islets of Langerhans. *Diabetologia* 1981; 21, 470–475.
- 32 Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, Ellis B, Gautier L, Ge Y, Gentry J, Hornik K, Hothorn T, Huber W, Iacus S, Irizarry R, Leisch F, Li C, Maechler M, Rossini AJ, Sawitzki G, Smith C, Smyth G, Tierney L, Yang JY, Zhang J: Bioconductor: Open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* 2004;5:R80.
- 33 Gautier L, Cope L, Bolstad BM, Irizarry RA: Affy--analysis of affymetrix genechip data at the probe level. *Bioinformatics* 2004;20:307-315.

- 34 R Development Core Team: R: A language and environment for statistical computing; R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria, 2013; ISBN: 3-900051-07-0. Available online at <http://www.R-project.org/>.
- 35 Hong F, Wittner B with contribution from Breitling R, Smith C, Battke F: Rank product method for identifying differentially expressed genes with application in meta-analysis. R package version 2.34.0, 2011. Available online at <http://www.bioconductor.org/>.
- 36 Bradford MM: 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.
- 37 Amaral AG, Rafacho A, Machado de Oliveira CA, Batista TM, Ribeiro RA, Latorraca MQ, Boschero AC, Carneiro EM: Leucine supplementation augments insulin secretion in pancreatic islets of malnourished mice. *Pancreas* 2010;39:847-855.
- 38 Hales CN, Barker DJ: Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: The thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 1992;35:595-601.
- 39 Du F, Higginbotham DA, White BD: Food intake, energy balance and serum leptin concentrations in rats fed low-protein diets. *J Nutr* 2000;130:514-521.
- 40 De Souza CT, Pereira-da-Silva M, Araujo EP, Morari J, Alvarez-Rojas F, Bordin S, Moreira-Filho DC, Carnevalheira JB, Saad MJ, Velloso LA: Distinct subsets of hypothalamic genes are modulated by two different thermogenesis-inducing stimuli. *Obesity (Silver Spring)* 2008;16:1239-1247.
- 41 Orozco-Solís R, Matos RJ, Lopes de Souza S, Grit I, Kaeffer B, Manhães de Castro R, Bolaños-Jiménez F: Perinatal nutrient restriction induces long-lasting alterations in the circadian expression pattern of genes regulating food intake and energy metabolism. *Int J Obes (Lond)* 2011;35:990-1000.

- 42 Latorraca MQ, Reis MA, Carneiro EM, Mello MA, Velloso LA, Saad MJ, Boschero AC: Protein deficiency and nutritional recovery modulate insulin secretion and the early steps of insulin action in rats. *J Nutr* 1998;128:1643-1649.
- 43 Petry CJ, Dorling MW, Pawlak DB, Ozanne SE, Hales CN: Diabetes in old male offspring of rat dams fed a reduced protein diet. *Int J Exp Diabetes Res* 2001;2:139-143.
- 44 Lisboa PC, Oliveira E, Fagundes AT, Santos-Silva AP, Conceição EP, Passos MC, Moura EG: Postnatal low protein diet programs leptin signaling in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis and pituitary tsh response to leptin in adult male rats. *Horm Metab Res* 2012;44:114-122.
- 45 Passos MC, Vicente LL, Lisboa PC, de Moura EG: Absence of anorectic effect to acute peripheral leptin treatment in adult rats whose mothers were malnourished during lactation. *Horm Metab Res* 2004;36:625-629.
- 46 Levin BE, Dunn-Meynell AA: Reduced central leptin sensitivity in rats with diet-induced obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002;283:R941-948.
- 47 Ziotopoulou M, Mantzoros CS, Hileman SM, Flier JS: Differential expression of hypothalamic neuropeptides in the early phase of diet-induced obesity in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000;279:E838-845.
- 48 Wang ZW, Zhou YT, Kakuma T, Lee Y, Higa M, Kalra SP, Dube MG, Kalra PS, Unger RH: Comparing the hypothalamic and extrahypothalamic actions of endogenous hyperleptinemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:10373-10378.
- 49 Koch CE, Lowe C, Pretz D, Steger J, Williams LM, Tups A: High-fat diet induces leptin resistance in leptin-deficient mice. *J Neuroendocrinol* 2014;26:58-67.
- 50 Romanatto T, Cesquini M, Amaral ME, Roman EA, Moraes JC, Torsoni MA, Cruz-Neto AP, Velloso LA: Tnf-alpha acts in the hypothalamus inhibiting food intake and increasing the

respiratory quotient--effects on leptin and insulin signaling pathways. *Peptides* 2007;28:1050-1058.

51 Amaral ME, Barbuio R, Milanski M, Romanatto T, Barbosa HC, Nadruz W, Bertolo MB, Boschero AC, Saad MJ, Franchini KG, Velloso LA: Tumor necrosis factor-alpha activates signal transduction in hypothalamus and modulates the expression of pro-inflammatory proteins and orexigenic/anorexigenic neurotransmitters. *J Neurochem* 2006;98:203-212.

52 Lin S, Hirai S, Yamaguchi Y, Goto T, Takahashi N, Tani F, Mutoh C, Sakurai T, Murakami S, Yu R, Kawada T: Taurine improves obesity-induced inflammatory responses and modulates the unbalanced phenotype of adipose tissue macrophages. *Mol Nutr Food Res* 2013;57:2155-2165.

53 Li M, Reynolds CM, Sloboda DM, Gray C, Vickers MH: Effects of taurine supplementation on hepatic markers of inflammation and lipid metabolism in mothers and offspring in the setting of maternal obesity. *PLoS One* 2013;8:e76961.

54 Su Y, Fan W, Ma Z, Wen X, Wang W, Wu Q, Huang H: Taurine improves functional and histological outcomes and reduces inflammation in traumatic brain injury. *Neuroscience* 2014;266C:56-65.

55 Reusens B, Sparre T, Kalbe L, Bouckennooghe T, Theys N, Kruhøffer M, Orntoft TF, Nerup J, Remacle C: The intrauterine metabolic environment modulates the gene expression pattern in fetal rat islets: Prevention by maternal taurine supplementation. *Diabetologia* 2008;51:836-845.

56 Colombani AL, Carneiro L, Benani A, Galinier A, Jaillard T, Duparc T, Offer G, Lorsignol A, Magnan C, Casteilla L, Pénicaud L, Leloup C: Enhanced hypothalamic glucose sensing in obesity: Alteration of redox signaling. *Diabetes* 2009;58:2189-2197.

- 57 Ozcan L, Ergin AS, Lu A, Chung J, Sarkar S, Nie D, Myers MG, Ozcan U: Endoplasmic reticulum stress plays a central role in development of leptin resistance. *Cell Metab* 2009;9:35-51
- 58 Jong CJ, Azuma J, Schaffer S: Mechanism underlying the antioxidant activity of taurine: Prevention of mitochondrial oxidant production. *Amino Acids* 2012;42:2223-2232.
- 59 Batista TM, da Silva PM, Amaral AG, Ribeiro RA, Boschero AC, Carneiro EM: Taurine supplementation restores insulin secretion and reduces ER stress markers in protein-malnourished mice. *Adv Exp Med Biol* 2013;776:129-139.
- 60 Cappelli AP, Zoppi CC, Barbosa-Sampaio HC, Costa JM, Protzek AO, Morato PN, Boschero AC, Carneiro EM: Taurine-induced insulin signalling improvement of obese malnourished mice is associated with redox balance and protein phosphatases activity modulation. *Liver Int* 2013.

Table 1: Final body weight (BW), nasoanal length, Lee index, retroperitoneal (RP) and perigonadal (PG) fat pads, and brain weight in C, CH, CHT, R, RH, RHT mice.

	C	CH	CHT	R	RH	RHT
BW (g)	26.71 ± 0.53	38.00 ± 1.22*	33.00 ± 1.53*,&	20.76 ± 1.33*	29.84 ± 0.92 [#]	29.96 ± 1.14 [#]
Nasoanal length (cm)	9.08 ± 0.13	9.67 ± 0.12*	9.95 ± 0.12*	8.69 ± 0.10*	9.31 ± 0.11 [#]	9.78 ± 0.11 ^{*,#,\$}
Lee index	314.50 ± 2.79	334.20 ± 3.47*	320.70 ± 1.53 ^{&}	313.4 ± 1.22	326.20 ± 3.30 ^{*,#}	316.10 ± 2.33 ^{\$}
RP fat pad (% BW)	0.52 ± 0.03	1.41 ± 0.04*	1.11 ± 0.03*,&	0.63 ± 0.04	1.13 ± 0.06 ^{*,#}	1.03 ± 0.06 ^{*,#}
PG fat pad (% BW)	1.43 ± 0.06	4.12 ± 0.18*	3.14 ± 0.20*,&	1.79 ± 0.09	2.50 ± 0.16 ^{*,#}	2.49 ± 0.22 ^{*,#}
Brain (% BW)	1.56 ± 0.03	1.13 ± 0.04*	1.26 ± 0.04*	2.02 ± 0.11*	1.42 ± 0.04 [#]	1.41 ± 0.05 [#]

Data are means ± SEM (n = 4-15). * different from C; & different from CH; [#] different from R; ^{\$} different from RH. One-way ANOVA followed by Duncan's post-test (P < 0.05).

Table 2: Biochemical nutritional parameters analyzed in fasted and fed C, CH, CHT, R, RH and RHT mice.

		C	CH	CHT	R	RH	RHT
Glucose (mg/dL)	<i>Fasted</i>	75 ± 3	95 ± 6*	80 ± 4 ^{&}	74 ± 5	89 ± 5 [#]	89 ± 4 [#]
	<i>Fed</i>	139 ± 10	157 ± 12	151 ± 9	135 ± 6	144 ± 4	144 ± 4
Insulin (ng/mL)	<i>Fasted</i>	0.44 ± 0.09	1.30 ± 0.20*	0.61 ± 0.13 ^{&}	0.31 ± 0.08	0.39 ± 0.09	0.40 ± 0.15
	<i>Fed</i>	1.31 ± 0.36	2.87 ± 0.49*	1.87 ± 0.28 ^{&}	0.97 ± 0.22	1.51 ± 0.21	1.70 ± 0.30
TG (mg/dL)	<i>Fasted</i>	92 ± 6	105 ± 4	109 ± 5	96 ± 7	102 ± 5	109 ± 5
	<i>Fed</i>	113 ± 12	154 ± 26	183 ± 27	86 ± 19	171 ± 14 [#]	233 ± 34 ^{*,#}
CHOL (mg/dL)	<i>Fasted</i>	93 ± 10	158 ± 14*	125 ± 10 ^{*,&}	91 ± 6	142 ± 8 ^{*,#}	153 ± 7 ^{*,#}
	<i>Fed</i>	113 ± 9	198 ± 18*	236 ± 12*	113 ± 12	206 ± 11 ^{*,#}	235 ± 11 ^{*,#}
Total proteins (g/dL)	<i>Fasted</i>	5.12 ± 0.12	5.39 ± 0.19	5.20 ± 0.19	4.48 ± 0.09*	5.13 ± 0.18 [#]	5.06 ± 0.15 [#]

Data are means ±SEM (n=4-10). * different from C; & different from CH; # different from R; \$ different from RH. One-way ANOVA followed by Duncan's post-test (P < 0.05).

Table 3: General data from the Affymetrix microarray analyses performed using the GeneChip® Mouse Genome 430 2.0.

Comparison between groups	Probe sets analysed	Probe sets with a pfp < 0.1	N probe sets up-regulated	N probe sets down-regulated
R x C	2474	787	425	362
CH x C	2362	769	427	342
CHT x CH	2137	429	139	290
RH x R	2411	739	334	405
RHT x RH	2302	540	140	400

N=5 chips per group. Pfp <0.1.

Table 4: Genes involved in the control of food intake expressed by fold change between two groups.

ID and gene name.	Gene symbol	Fold change		
		Malnutrition RxC	High fat diet CHxC / RHxR	Taurine CHTxCH / RHTxRH
<u>Orexigenic Neuropeptides</u>				
1419127_at Neuropeptide Y	NPY	1.17	-1.22 / -1.41	nsd / -1.42
1421690_s_at Agouti Related Protein	AgRP	1.41	-1.65 / -1.89	nsd / nsd
<u>Anorexigenic Neuropeptides</u>				
1455858_x_at pro-opiomelanocortin-alpha	Pomc	nsd	nsd/ 2.30	nsd / 1.29
1422825_at CART prepropetide	Cartpt	-1.16	1.18 / 1.30	nsd / 1.10

Fold change above zero represent gene up-regulation, and the fold change below zero represent gene down-regulation between two groups.

Not significantly different= nsd.

N=5 chips from different mice.

Table 5: Hypothalamic genes involved in tricarboxylic acid cycle (TCA), glycolysis/gluconeogenesis and oxidative phosphorylation expressed by fold change between two groups.

ID and gene name	Gene symbol	Fold change		
		Malnutrition RxC	High fat diet CHxC / RHxR	Taurine CHTxCH / RHTxRH
Tricarboxylic acid cycle (TCA)				
1433984_a_at malate dehydrogenase 2. NAD (mitochondrial)	Mdh2	-1.07	-1.04 / 1.02	nsd / nsd
1432016_a_at isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) alpha	Idh3a	nsd	1.11 / nsd	nsd / 1.09
1450667_a_at citrate synthase	Cs	nsd	nsd / nsd	1.06 /nsd
Glycolisys and gluconeogenesis				
1451461_a_at aldolase C. fructose- bisphosphate	Aldoc	-1.02	1.00 / -1.00	-1.06 / - 1.03
1433984_a_at malate dehydrogenase 2. NAD (mitochondrial)	Mdh2	-1.07	-1.04 / 1.02	nsd /nsd
1434799_x_at aldolase A. fructose- bisphosphate	Aldoa	-1.05	nsd /nsd	1.06 / nsd
1454925_x_at malate dehydrogenase 1. NAD (soluble)	Mdh1	-1.03	1.00 / -1.06	1.04 / 1.08
1434814_x_at glucose phosphate isomerase 1	Gpi1	-1.06	-1.05 / nsd	nsd /nsd
1426554_a_at phosphoglycerate mutase 1	Pgam1	1.08	nsd / -1.07	nsd /nsd
1417864_at phosphoglycerate kinase 1	Pgk1	nsd	1.06 / nsd	nsd /nsd
1435659_a_at triosephosphate isomerase 1	Tpi1	nsd	-1.08 / nsd	1.08 / nsd
1419022_a_at enolase 1. alpha non-neuron /// predicted gene 5506 /// enolase 1. alpha non-neuron pseudogene	Eno1 /// Gm5506 /// Gm5855	nsd	1.13 / nsd	nsd /nsd
1416183_a_at	Ldhb	nsd	1.04 / -1.06	nsd / 1.07

lactate dehydrogenase B 1417434_at glycerol phosphate dehydrogenase 2. Mitochondrial	Gpd2	nsd	nsd / nsd	nsd / 1.28
Oxidative phosphorylation				
1426088_at predicted gene 4076	Gm4076	-1.10	1.08 / 1.23	-1.11 / - 1.14
1430713_s_at NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex. 13	Ndufa13	-1.14	nsd / 1.07	nsd / nsd
1416970_a_at cytochrome c oxidase. subunit VIIa 2	Cox7a2	-1.07	-1.04 / 1.02	1.04 / 1.02
1433513_x_at NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex. 12	Ndufa12	-1.06	nsd / nsd	nsd / nsd
1456580_s_at ATP synthase. H+ transporting. mitochondrial F1 complex. delta subunit	Atp5d	-1.11	nsd / nsd	nsd / 1.05
1456588_x_at cytochrome c oxidase. subunit Vb	Cox5b	-1.07	nsd / -1.02	nsd / 102
1423907_a_at NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 8	Ndufs8	-1.13	1.07 / 1.16	-1.08 / - 1.13
1423111_at ATP synthase. H+ transporting. mitochondrial F1 complex. alpha subunit 1	Atp5a1	1.08	1.09 / -1.06	nsd / nsd
1428464_at NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex. 3	Ndufa3	-1.05	-1.02 / nsd	1.06 / 1.05
1416829_at ATP synthase. H+ transporting mitochondrial F1 complex. beta subunit	Atp5b	1.05	nsd / -1.03	1.06 / nsd
1434491_a_at cytochrome c oxidase. subunit Vic	Cox6c	-1.09	-1.10 / -1.06	nsd / nsd
1422484_at cytochrome c. somatic	Cycs	-1.09	nsd / 1.07	nsd / nsd

1415933_a_at cytochrome c oxidase. subunit Va	Cox5a	-1.03	-1.05 / -1.03	1.04 / nsd
1448112_at cytochrome c oxidase. subunit VIIc /// similar to cytochrome c oxidase. subunit VIIc /// similar to cytochrome c oxidase. subunit VIIc	Cox7c /// LOC100047065 /// LOC100048613	-1.07	nsd / nsd	nsd / nsd
1416366_at NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1. subcomplex unknown. 2	Ndufc2	1.04	nsd / -1.06	nsd / nsd
1422525_at ATP synthase. H+ transporting. mitochondrial F1F0 complex. subunit e	Atp5k	-1.05	nsd / 1.03	nsd / nsd
1429708_at NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex 11	Ndufa11	-1.10	-1.17 / nsd	nsd / 1.12
1452133_at ubiquinol-cytochrome c reductase hinge protein	Uqcrh	1.03	1.07 / 1.07	-1.00 / nsd
1416337_at ubiquinol-cytochrome c reductase binding protein	Uqcrb	1.09	nsd / nsd	nsd / nsd
1423676_at ATP synthase. H+ transporting. mitochondrial F0 complex. subunit d	Atp5h	-1.02	1.01 / 1.05	1.05 / 1.01
1448203_at ATP synthase. H+ transporting. mitochondrial F0 complex. subunit g /// ATP synthase. H+ transporting. mitochondrial FO complex. subunit G2. pseudogene /// predicted gene 10221	Atp51 /// Atp512 /// Gm10221	-1.04	-1.03 / nsd	1.06 / 1.05
1438159_x_at NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 2	Ndufv2	1.08	1.12 / nsd	nsd / nsd
1424085_at NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha	Ndufa4	nsd	1.07 / 1.03	-1.00 / nsd

subcomplex. 4 1448934_at NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex 10	Ndufa10	nsd	1.08 / nsd	nsd / nsd
1428075_at predicted pseudogene 3244 /// NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex 4	Gm3244 /// Ndufb4	nsd	-1.04 / -1.06	nsd / nsd
1424628_a_at NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 3	Ndufv3	nsd	1.06 / 1.07	nsd / nsd
1450968_at ubiquinol-cytochrome c reductase. Rieske iron-sulfur polypeptide 1	Uqcrfs1	nsd	1.11 / nsd	nsd / nsd
1448284_a_at NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1. subcomplex unknown. 1	Ndufc1	nsd	1.05 / nsd	-1.02 / nsd
1428631_a_at ubiquinol cytochrome c reductase core protein 2	Uqcrc2	nsd	1.06 / nsd	nsd / nsd
1448198_a_at NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex 8	Ndufb8	nsd	-1.04 / -1.05	nsd / nsd
1417102_a_at similar to NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex. 5 /// NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex. 5	LOC100046199 /// Ndufb5	nsd	nsd / nsd	-1.07 / nsd
1435395_s_at ATP synthase. H+ transporting. mitochondrial F0 complex. subunit F2	Atp5j2	nsd	nsd / nsd	-1.02 / nsd
1422976_x_at NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex. 7 (B14.5a)	Ndufa7	nsd	nsd / nsd	1.13 / nsd
1433562_s_at ATP synthase. H+ transporting. mitochondrial F0 complex. subunit B1	Atp5f1	nsd	nsd / -1.03	nsd / nsd
1417368_s_at	Ndufa2	nsd	nsd / -1.07	nsd / nsd

NADH dehydrogenase
(ubiquinone) 1 alpha
subcomplex. 2

1428782_a_at

ubiquinol-cytochrome c
reductase core protein 1

Uqcrc1

nsd

nsd / nsd

nsd / 1.11

1433603_at

NADH dehydrogenase
(ubiquinone) Fe-S protein 6

Ndufs6

nsd

nsd / nsd

nsd / 1.09

1452184_at

NADH dehydrogenase
(ubiquinone) 1 beta
subcomplex. 9

Ndufb9

-1.05

-1.08 / -1.05

1.06 / 1.05

Fold change above zero represent gene upregulation, and the fold change below zero represent gene downregulation between two groups.

Not significantly different= nsd.

N=5 chips from different mice.

Table 6: Hypothalamic genes involved in unfolded protein response, apoptosis and ER stress pathway expressed by fold change between two groups.

ID and gene name	Gene symbol	Fold change		
Protein folding response to unfolded protein / Apoptosis ER stress pathway / protein folding ER cytoplasm		Malnutrition RxC	High fat diet CHxC / RHxR	Taurine CHTxCH/ RHTxRH
1425993_a_at heat shock 105kDa/110kDa protein 1	Hsph1	-1.22	1.09 / nsd	1.16 / nsd
1420622_a_at heat shock protein 8	Hspa8	1.14	1.09 / - 1.05	-1.04 / 1.00
1429106_at RIKEN cDNA 4921509J17 gene	4921509J17Rik	-1.27	nsd / nsd	nsd / nsd
1416064_a_at heat shock protein 5	Hspa5	-1.06	1.10 / nsd	-1.15 / 1.03
1416365_at heat shock protein 90 alpha (cytosolic). class B member 1	Hsp90ab1	1.03	1.13 / 1.10	-1.35 / -1.18
1438040_a_at heat shock protein 90. beta (Grp94). member 1	Hsp90b1	1.16	1.23 / nsd	-1.35 / -1.19
1435194_at heat shock protein 4	Hspa4	-1.16	nsd / nsd	nsd / 1.24
1416755_at DnaJ (Hsp40) homolog. subfamily B. member 1	Dnajb1	-1.27	nsd / nsd	nsd / nsd
1450668_s_at heat shock protein 1 (chaperonin 10)	Hspe1	-1.08	nsd / 1.08	nsd / nsd
1452318_a_at heat shock protein 1B	Hspa1b	-2.46	1.96 / nsd	nsd / -2.84
1437497_a_at heat shock protein 90. alpha (cytosolic). class A member 1	Hsp90aa1	-1.02	1.09 / 1.14	-1.25 / -1.21
1427442_a_at amyloid beta (A4) precursor protein	App	-1.00	1.07 / 1.07	-1.02 / -1.08
1456170_x_at Calreticulin	Calr	-1.10	nsd / nsd	nsd / nsd

1437223_s_at X-box binding protein 1	Xbp1	Nsd	1.10 / 1.06	-1.09 / nsd
1416288_at DnaJ (Hsp40) homolog. subfamily A. member 1	Dnaja1	Nsd	1.11 / nsd	nsd / nsd
1426351_at heat shock protein 1 (chaperonin)	Hspd1	Nsd	1.11 / nsd	nsd / nsd
1417005_at kinesin light chain 1	Klc1	Nsd	nsd / - 1.11	nsd / 1.05
1435735_x_at histocompatibility 47	H47	Nsd	nsd / - 1.18	nsd / nsd
1454664_a_at eukaryotic translation initiation factor 5	Eif5	1.18	nsd / 1.08	nsd / -1.26
1426205_at similar to protein phosphatase 1 /// protein phosphatase 1. catalytic subunit. beta isoform	LOC100044953 /// Ppp1cb	1.11	nsd / - 1.07	nsd / -1.03
1437195_x_at mitogen-activated protein kinase 10	Mapk10	-1.07	nsd / nsd	nsd / nsd
1422484_at cytochrome c. somatic	Cycs	-1.09	nsd / 1.07	nsd / nsd
1426401_at protein phosphatase 3. catalytic subunit. alpha isoform	Ppp3ca	1.06	1.06 / nsd	nsd / nsd
1415859_at eukaryotic translation initiation factor 3. subunit C	Eif3c	1.26	nsd / nsd	-1.33 / -1.30
1452662_a_at eukaryotic translation initiation factor 2. subunit 1 alpha	Eif2s1	-1.20	nsd / nsd	nsd / nsd
1423798_a_at eukaryotic translation initiation factor 1	Eif1	Nsd	-1.05 / - 1.15	nsd / 1.05
1450149_a_at protein phosphatase 1. catalytic subunit. gamma isoform	Ppp1cc	Nsd	nsd / nsd	-1.05 / 1.05
1420088_at nuclear factor of kappa light polypeptide gene	Nfkbia	Nsd	nsd / nsd	nsd / -1.16

enhancer in B-cells
inhibitor. Alpha

1416858_a_at

FK506 binding protein 3

Fkbp3

nsd

nsd / -
1.05

nsd / nsd

Fold change above zero represent gene up-regulation, and the fold change below zero represent gene down-regulation between two groups.

Not significantly different= nsd.

N=5 chips from different mice.

Table 7: Hypothalamic genes involved in the leptin and insulin signaling, and leptin signaling via PI3K-dependent pathway/inflammation JAK-STAT pathway expressed by fold change between two groups.

ID and gene name	Gene symbol	Fold change		
Signal transduction leptina/insulin signaling		Malnutrition RxC	High fat diet CHxC / RHxR	Taurine CHTxCH / RHTxRH
1443798_at phosphatidylinositol 3-kinase catalytic delta polypeptide	Pik3cd	1.00	-1.16 / -1.06	-1.00 / - 1.03
1420611_at protein kinase. cAMP dependent. catalytic. Beta	Prkacb	1.08	1.07 / nsd	-1.15 / - 1.10
1452032_at protein kinase. cAMP dependent regulatory. type I. alpha	Prkar1a	1.07	1.04 / nsd	nsd / nsd
1422484_at cytochrome c. somatic	Cycs	-1.09	nsd / 1.07	nsd / nsd
1447720_x_at protein kinase. cAMP dependent. catalytic. Alpha	Prkaca	1.03	nsd / nsd	nsd / nsd
1419127_at neuropeptide Y	Npy	1.17	-1.21 / -1.41	nsd / -1.42
1437689_x_at clusterin /// similar to clusterin	Clu /// LOC100046120	-1.03	-1.05 / -1.04	nsd / nsd
1434325_x_at protein kinase. cAMP dependent regulatory. type I beta	Prkar1b	-1.03	-1.02 / nsd	nsd / nsd
1435638_at glycogen synthase kinase 3 alpha	Gsk3a	nsd	-1.27 / nsd	nsd / nsd
1417065_at early growth response 1	Egr1	nsd	-1.18 / -1.18	nsd / -1.29
1437001_at glycogen synthase kinase 3 beta	Gsk3b	nsd	nsd / nsd	-1.29 / - 1.22
1455858_x_at pro-opiomelanocortin-alpha	Pomc	nsd	nsd / 2.30	nsd / 1.30
1423100_at FBJ osteosarcoma oncogene	Fos	nsd	nsd / -1.47	nsd / nsd
1421867_at nuclear receptor subfamily 3. group C. member 1	Nr3c1	nsd	nsd / 1.27	nsd / -1.35

1449117_at Jun proto-oncogene related gene d	Jund	nsd	nsd / -1.11	nsd / -1.16
1420088_at nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor. alpha	Nfkbia	nsd	nsd / nsd	nsd / -1.16
1415949_at carboxypeptidase E /// similar to carboxypeptidase E	Cpe /// LOC100046434	1.05	1.00 / -1.02	-1.05 / - 1.05
1426205_at similar to protein phosphatase 1 /// protein phosphatase 1. catalytic subunit. beta isoform	LOC100044953 /// Ppp1cb	1.11	nsd / -1.07	nsd / -1.03
1428386_at acyl-CoA synthetase long- chain family member 3	Acsl3	1.32	nsd / -1.26	nsd / nsd
1436822_x_at ribosomal protein L17 pseudogene /// predicted gene 10268 /// predicted gene 10362 /// predicted gene 4329 /// 60S ribosomal protein L17 pseudogene /// hexokinase 1 /// similar to RPL17 protein /// ribosomal protein L17 /// ribosomal protein L17. pseudogene 3	Gm10223 /// Gm10268 /// Gm10362 /// Gm4329 /// Gm6133 /// Hk1 /// LOC100048040 /// Rpl17 /// Rpl17-ps3	1.05	-1.00 / -1.03	nsd / nsd
1415964_at stearoyl-Coenzyme A desaturase 1	Scd1	nsd	-1.09 / nsd	1.12 / 1.06
1434377_x_at predicted gene 13654 /// ribosomal protein S6	Gm13654 /// Rps6	nsd	1.04 / 1.02	-1.06 / - 1.06
1416090_at similar to pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta /// pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta	LOC100044400 /// Pdhb	nsd	nsd / nsd	1.12 / nsd
1450667_a_at citrate synthase	Cs	nsd	nsd / nsd	1.06 / nsd
1450149_a_at protein phosphatase 1. catalytic subunit. gamma isoform	Ppp1cc	nsd	nsd / nsd	-1.05 / 1.05

1437246_x_at

predicted gene 11263 ///
 predicted gene 13654 /// 40S
 ribosomal protein S6
 (Phosphoprotein NP33) ///
 ribosomal protein S6
 pseudogene /// similar to 40S
 ribosomal protein S6 ///
 ribosomal protein S6

Gm11263 ///
 Gm13654 ///
 Gm14138 ///
 Gm16409 ///
 LOC639593 ///
 Rps6

nsd -1.17 / -1.26 nsd / nsd

1428305_at

proprotein convertase
 subtilisin/kexin type 2

Pcsk2

nsd nsd / -1.14 nsd / nsd

1428386_at

acyl-CoA synthetase long-
 chain family member 3

Acs13

1.32 nsd / -1.26 nsd / nsd

1416636_at

similar to RAS-homolog
 enriched in brain /// Ras
 homolog enriched in brain

LOC100047161
 /// Rheb

-1.06 nsd / nsd nsd / nsd

1455693_x_at

predicted gene 11263 ///
 predicted gene 13654 ///
 ribosomal protein S6
 pseudogene /// similar to 40S
 ribosomal protein S6 ///
 ribosomal protein S6

Gm11263 ///
 Gm13654 ///
 Gm16409 ///
 LOC236932 ///
 Rps6

1.03 nsd / nsd nsd / nsd

**Development leptin
 signaling via PI3K-
 dependent pathway /
 inflammation JAK-STAT
 pathway**

1443798_at

phosphatidylinositol 3-kinase
 catalytic delta polypeptide

Pik3cd

1.00 -1.16 / -1.06 -1.00 / -
 1.03

1447720_x_at

protein kinase. cAMP
 dependent. catalytic. Alpha

Prkaca

1.03 nsd / nsd nsd / nsd

1420611_at

protein kinase. cAMP
 dependent. catalytic. Beta

Prkacb

1.08 1.07 / nsd -1.15 / -
 1.10

1452032_at

protein kinase. cAMP
 dependent regulatory. type I.
 alpha

Prkar1a

1.07 1.05 / nsd nsd / nsd

1434325_x_at

protein kinase. cAMP
 dependent regulatory. type I

Prkar1b

-1.03 -1.02 / nsd nsd / nsd

beta				
1435638_at				
glycogen synthase kinase 3 alpha	Gsk3a	nsd	-1.27 / nsd	nsd / nsd
1437001_at				
glycogen synthase kinase 3 beta	Gsk3b	Nsd	nsd / nsd	-1.29 / - 1.22
1420088_at				
nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor. Alpha	Nfkbia	nsd	nsd / nsd	nsd / -1.16
1415949_at				
carboxypeptidase E /// similar to carboxypeptidase E	Cpe /// LOC100046434	1.05	1.00 / -1.02	-1.05 / - 1.05
1455168_a_at				
guanine nucleotide binding protein (G protein). beta polypeptide 2 like 1	Gnb2l1	1.08	nsd / nsd	nsd / nsd
1456595_x_at				
growth hormone	Gh	1.05	-459.55 / - 155.12	nsd / nsd
1429287_a_at				
Prolactin	Prl	nsd	nsd / -261.44	nsd / nsd
1423396_at				
angiotensinogen (serpin peptidase inhibitor. clade A. member 8)	Agt	nsd	nsd / nsd	-1.17 / nsd

Fold change above zero represent gene up-regulation, and the fold change below zero represent gene down-regulation between two groups.

Not significantly different= nsd

N=5 chips from different mice

Figure Legends

Figure 1: *Food consumption in mice that underwent protein-restriction with or without HFD and Tau supplementation.* The food intake of (A) the C, CH, CHT and (B) the R, RH, RHT mice recorded for eight weeks. Total food intake is expressed by the area under curve (C). Food (D), calorie (E) and protein intake (F) recorded during the last week of the experimental period. Data are means $\pm$ SEM (n = 4-8). * different from C; & different from CH; # different from R; \$ different from RH. One-way ANOVA followed by Duncan's post-test (P < 0.05).

Figure 2: *Orexigenic and anorexigenic neuropeptides gene expression in the hypothalamus from mice that underwent protein-restriction with or without HFD and Tau supplementation.* Hypothalamic mRNA extracts were processed for Real time RT-PCR measurement of (A) NPY, (B) AgRP, (C) Pomc and (D) CART gene expression in the C, CH, CHT, R, RH and RHT groups. Data are means $\pm$ SEM (n=5-8). * different from C; # different from R. One-way ANOVA followed by Duncan's post-test (P < 0.05).

Figure 3: *Food intake profile and hypothalamic STAT3 activation in response to leptin in mice that underwent protein-restriction with or without HFD and Tau supplementation.* (A) Mean $\pm$ SEM (n=4-6) of caloric intake after saline or leptin administration. After a 6h period of fasting, mice of all groups received an ip injection of saline (0.9% NaCl), and food intake was measured after 12h. On another day, the same mice received an ip injection of leptin (500 ng/g BW). (B) pSTAT3/STAT3 protein expression in the hypothalamus of the C, CH, CHT, R, RH and RHT mice. Mice of both experimental groups received an ip injection of 0.9% saline (-) or leptin (500 ng/g BW) (+). After 45 min, the hypothalamus was collected and used for immunoblotting experiments. (C) STAT3 and GAPDH (internal control) hypothalamic protein content. Bars

represent the mean $\pm$ SEM of the values, determined by optical densitometry (n = 4–6 rats). *
leptin is different from saline-treated mice (Student's *t* test; $P < 0.05$).

Figure 1

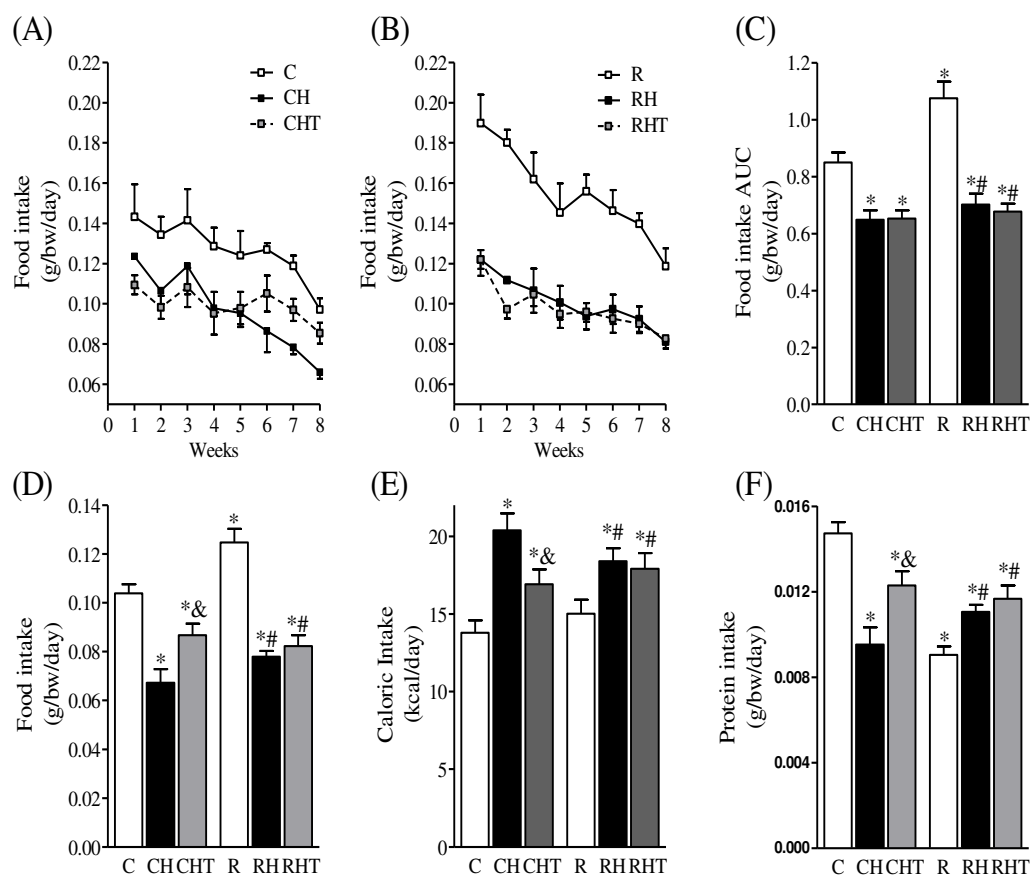


Figure 2

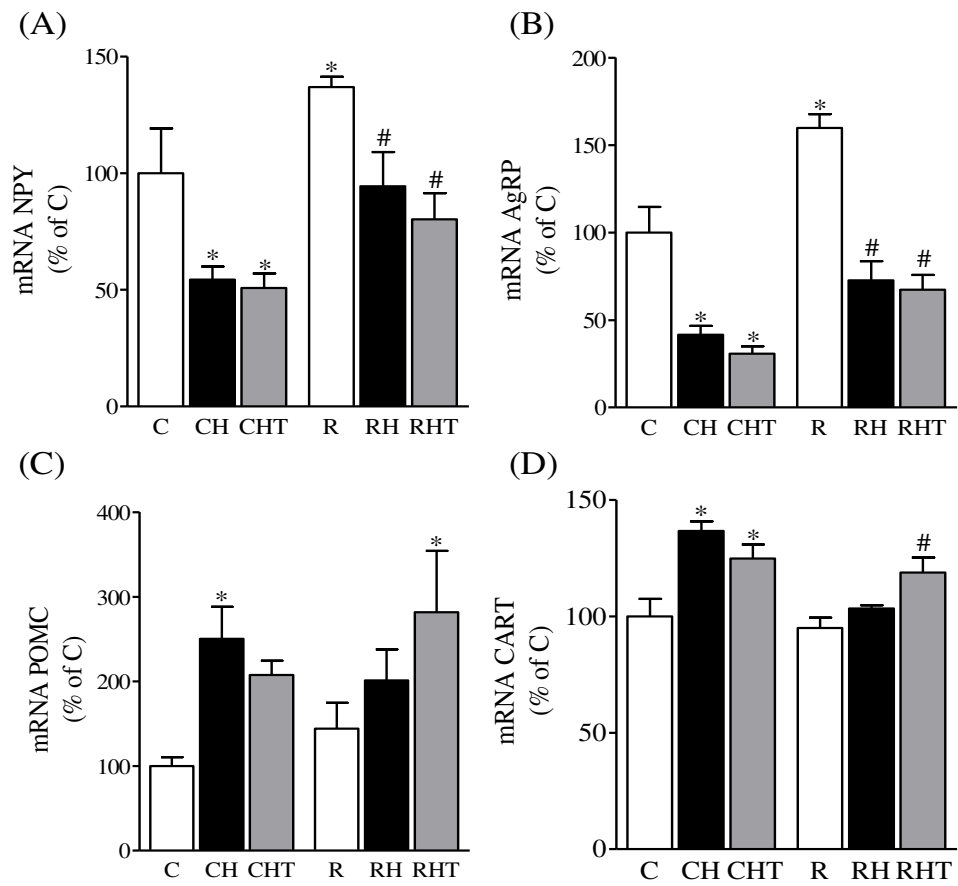
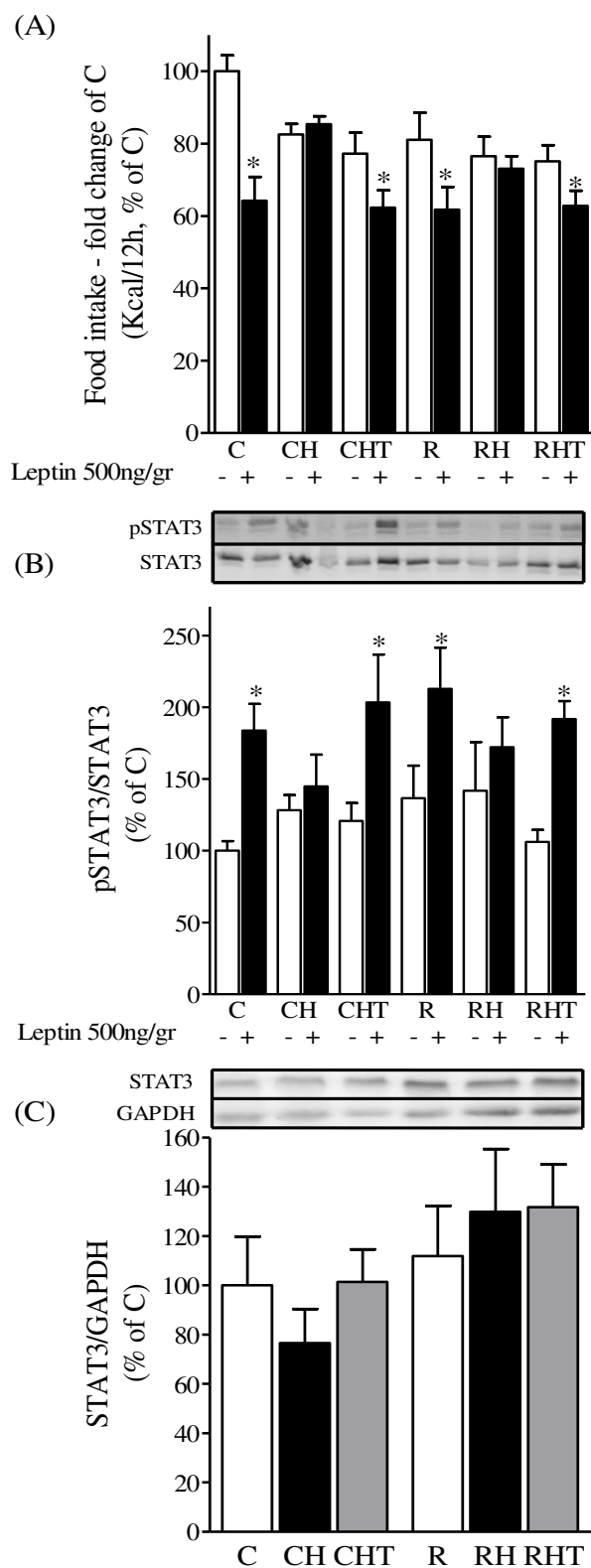


Figure 3



9. ARTIGO 3

Parte dos resultados obtidos durante a realização deste trabalho estão apresentados a seguir. Esses resultados fazem parte da elaboração do terceiro artigo científico.

9.1 INTRODUÇÃO

O balanço energético pode ser avaliado utilizando-se diversas ferramentas, tal como a análise da atividade locomotora, análise da expressão da UCP1 no tecido adiposo marrom (TAM) e a taxa metabólica basal, através de calorimetria indireta. Estudos têm demonstrado diferenças (So et al., 2011; Kirchner et al., 2012) e até mesmo semelhanças na atividade locomotora de animais obesos (Brownlow et al., 1996), dependendo muito do ciclo circadiano e da linhagem genética.

A taxa metabólica basal de um indivíduo pode ser mensurada medindo a produção de CO_2 e o consumo de O_2 . Neste caso, assumindo que todo o O_2 consumido é usado para oxidar os combustíveis energéticos e que todo o CO_2 produzido é recuperado (Jensen et al., 2001). Estudos de calorimetria indireta é comumente utilizado em animais para avaliar o balanço energético, avaliando a quantidade de oxigênio consumida (V_{O_2}) e a produção de dióxido de carbono (V_{CO_2}) (Longo et al., 2009; So et al., 2011). A razão do V_{CO_2} pelo V_{O_2} é conhecida como quociente respiratório (QR) e pode ser usada para estimar a oxidação de gorduras e carboidratos, que por sua vez, é utilizada para calcular o gasto energético (GE) (Lusk, 1928; Weir, 1949). Quando a oxidação dos carboidratos aumenta, o QR se aproxima de 1.0 e quando a oxidação dos lipídios aumenta, ele se aproxima de 0.7 (Flatt, 1991). As variações do GE na etiologia da obesidade permanecem controversas. Além disso, o QR como indicador de oxidação dos combustíveis energético, tem sido correlacionado com posterior ganho de peso (Seidell et al., 1992), independente do registro de 24h do GE (Zurlo et al., 1990).

O tecido adiposo marrom possui um importante papel no balanço energético devido a sua capacidade termogênica. O TAM também pode estar envolvido na etiologia do diabetes mellitus e de dislipidemia, de forma independente e/ou secundária à obesidade. Sendo assim, o TAM pode ser um alvo interessante para combater não só a obesidade, mas também algumas doenças relacionadas (Saito., 2013). A UCP1 atua desacoplando a fosforilando oxidativa na síntese de ATP, dissipando assim a energia na forma de calor. A termogênese no TAM é regulada via inervação simpática distribuída abundantemente neste tecido. A atividade simpática irá induzir a lipólise e liberação de ácidos graxos, que por sua vez irá ativar a UCP1 e serão oxidados na mitocôndria para servir como uma fonte de energia para termogênese. (Saito et al., 2013)

Diante disto, avaliamos a atividade locomotora espontânea, a taxa metabólica basal (respirometria) e a expressão protéica da UCP1 no TAM. Para realização dos experimentos e obtenção dos dados a seguir, foram empregados as seguintes metodologia:

9.2 MATERIAIS E MÉTODOS

9.2.1 Avaliação da taxa metabólica basal (Respirometria)

Após 24 horas de aclimação dos camundongos ao sistema, os animais foram pesados e após repouso absoluto foi analisado o consumo de oxigênio e produção de CO₂ em gaiolas metabólicas totalmente seladas utilizando o sistema Oxylet system (Pan Lab/Harvad instruments, Barcelona, Espanha). Os animais permaneceram no registro durante as próximas 24 horas. A partir desses dados foram calculados o quociente respiratório (QR) e o gasto energético (GE) dos animais utilizando-se o software Metabolism[®] (Pan Lab/Harvad instruments, Barcelona, Espanha) acoplado ao sistema.

9.2.2 Atividade Locomotora

Após 24 horas de aclimação dos camundongos em gaiolas de atividade locomotora (Multitake Cage LE001 PH), foi realizado o registro da atividade locomotora durante as próximas 24 horas. Para isso, foi utilizado o software Compulse[®] e Actitrack (Pan Lab/Harvad instruments, Barcelona, Espanha) acoplado ao sistema.

9.2.3 Western Blot

Para verificar a expressão da proteína UCP1 no tecido adiposo marrom, os camundongos foram sacrificados com 12 horas de jejum. Em seguida, o tecido foi imediatamente homogeneizado em solução contendo coquetel anti-protease, contendo: 100 mM de Tris pH 7,5; 10 mM de pirofosfato de sódio; 100 mM de fluoreto de sódio, 10 mM de EDTA; 10 mM de Ortovanadato de sódio; 2 mM de PMSF; e 1% de Triton-X 100. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm por 30 min. A quantificação protéica foi realizada por Biureto. Após isso, as amostras foram incubadas à 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%) contendo DTT. Para corrida eletroforética foi utilizado gel bifásico: gel de empilhamento (EDTA 4 mM, SDS

2%, Trisma base 750 mM, pH 6.7) e gel de resolução (EDTA 4 mM, SDS 2%, Trisma base 50 mM, pH 8.9). A corrida foi efetuada à 90V por aproximadamente 180min com Tampão de Corrida (Trisma base 200 mM, glicina 1,52 M, 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 120 min à 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 por 5h à 4°C. Logo após, as membranas foram incubadas overnight com anticorpo policlonal contra a UCP1 (diluição 1:1000, sc-6529, Santa Cruz Biotechnology®, Dallas, Texas, USA). Em seguida, as membranas foram incubadas por 2h com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase (diluição 1:10000 em TBS com 2% de leite desnatado). Passado este período, as membranas foram lavadas com TBS, incubadas por 5 min com reagentes de quimioluminescência (Pierce Biotechnology, USA), e reveladas utilizando o aparelho ImageQuant LAS 4000. As intensidades das bandas foram quantificadas por densitometria óptica usando o software Image Tool J (<http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/itdesc.html>). Os valores obtidos a partir da densitometria UCP1 foram normalizados pela expressão da proteína GAPDH.

9.2.4 Análise estatística 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* Newman-Keuls. Também foi usado o teste *t* de Student para comparação entre dois grupos quando indicado. O nível de significância adotado foi de $P < 0.05$.

10. RESULTADOS E DISCUSSÃO

10.1 Taxa metabólica basal

Para análise da taxa metabólica basal, foi realizado experimento de calorimetria indireta, também conhecida como respirometria. Os animais permaneceram durante 24 horas em caixas devidamente seladas para análise da produção de CO₂ e o consumo de O₂. De acordo com esses dados podemos calcular o QR e GE.

Os resultados indicam uma diminuição do QR em camundongos submetidos a DHL em ambos os grupos, tanto no período claro quanto no período escuro. Além disso, houve um aumento no QR durante o período escuro apenas nos grupos C e R, indicando uma perda da flexibilidade metabólica nos grupos alimentados com DHL. Ainda, camundongos do grupo R, durante o período escuro, apresentam um aumento no QR quando comparado ao grupo C no mesmo período (período claro: C=0,91±0,01; CH=0,79±0,02; CHT=0,75±0,004; R=0,94±0,04; RH=0,83±0,02; RHT=0,82±0,01/ período escuro: C= 1,00±0,02; CH=0,82±0,01; CHT=0,78±0,03; R=1,04±0,01; RH=0,86±0,01 e RHT=0,86±0,02 p<0,05) (Figura 1).

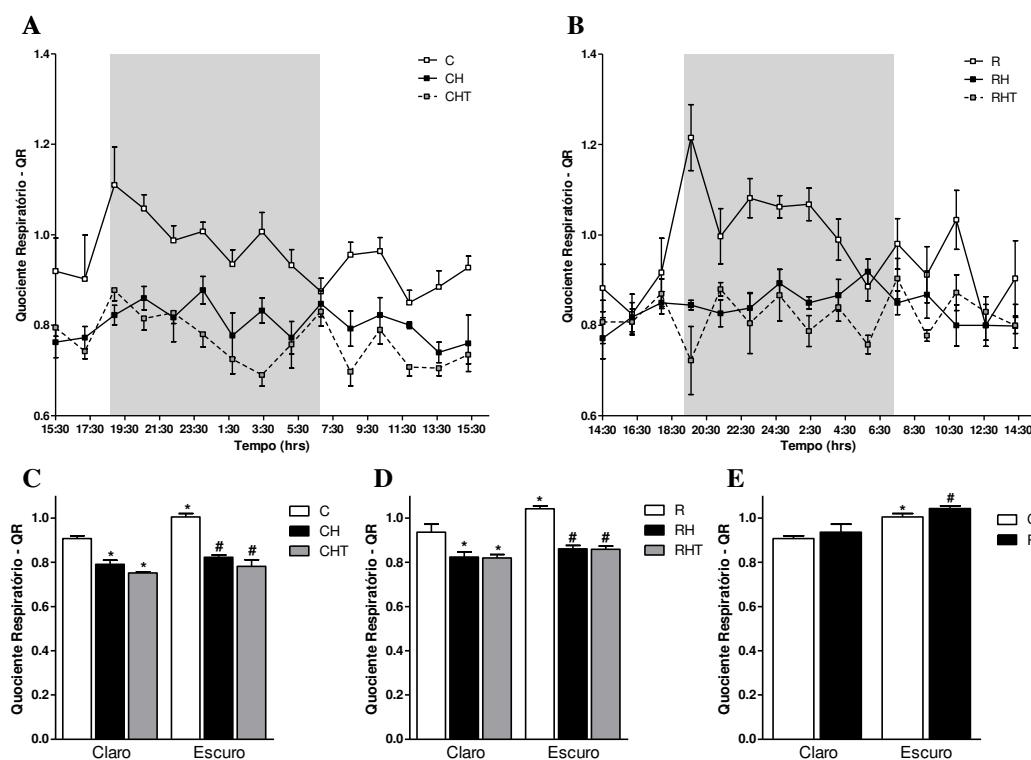


Figura 1. Acompanhamento do QR durante 24 horas de registro dos grupos C, CH e CHT (A); R, RH e RHT (B). Média do QR durante o período claro e escuro dos grupos C, CH e CHT (C); R, RH e RHT (D); comparação entre os grupos C e R (E). As barras representam a média ± erro padrão da média. p<0,05 * diferença entre os grupos C ou R no período claro, # diferença entre os grupos C ou R no período escuro, & diferença entre o período escuro e claro do mesmo grupo. N=4

Assim como o QR, há uma diminuição do GE no grupo CH e CHT durante o período claro. No entanto, no período escuro houve uma diminuição apenas no grupo CHT, quando comparado ao C. Diferentemente do QR, houve aumento do GE nos grupos C, CH e CHT no período escuro quando comparado ao período ao claro (período claro: C=172,4±5,67; CH=149,9±3,52; CHT=146±5,06 / período escuro: C=187,4±3,49; CH=174,2±4,46;

CHT=162,2±5,39 Kcal/dia/Kg^{0,75} p<0,05). Em animais submetidos a desnutrição protéica, houve um aumento no GE apenas nos grupos RH e RHT entre o período claro e escuro (período claro: RH= 169,9±8,57; RHT=154,3±6,71 / período escuro: RH=193±8,57; RHT=183,4±6,41 Kcal/dia/Kg^{0,75} p<0,05) (Figura 2).

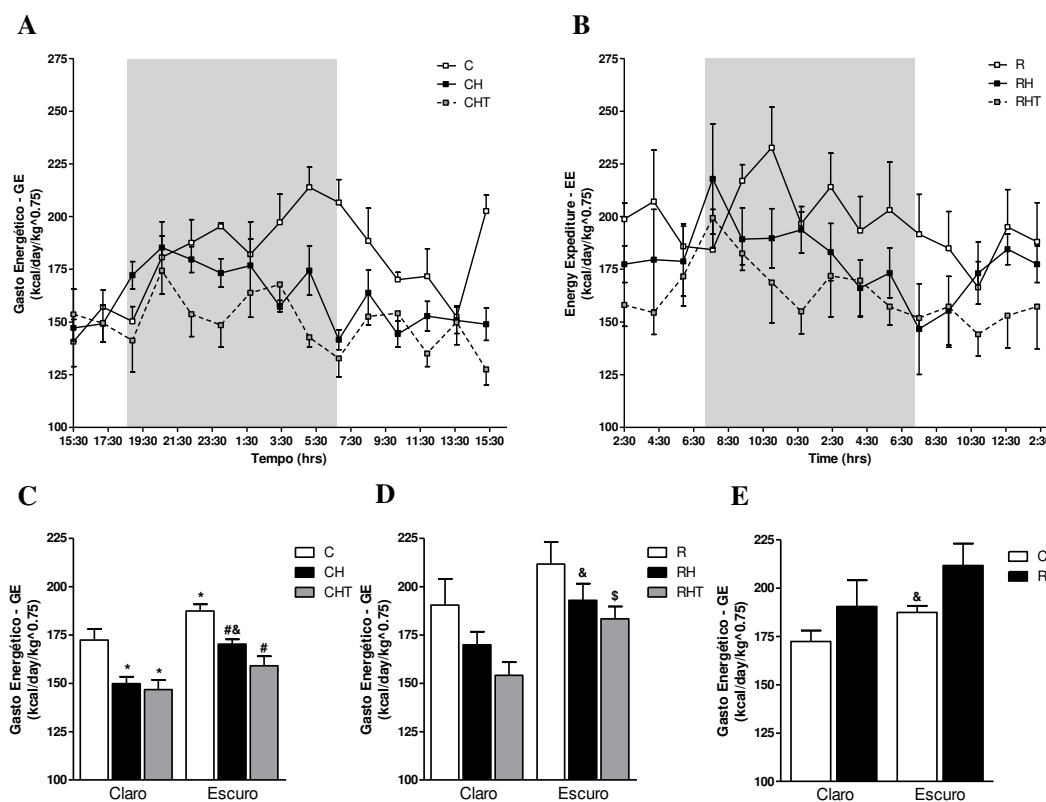


Figura 2. Acompanhamento do GE durante 24 horas de registro dos grupos C, CH e CHT (A); R, RH e RHT (B). Média do GE durante o período claro e escuro dos grupos C, CH e CHT (C); R, RH e RHT (D); comparação entre os grupos C e R (E). As barras representam a média ± erro padrão da média. * p<0,05 diferença entre o grupo C no período claro, # diferença entre o grupo R no período escuro, & diferença entre o período escuro e claro do mesmo grupo. N=4

Além da caracterização de calorimetria indireta, foi realizado também análise da expressão da proteína mitocondrial UCP1 no TAM. A função primordial do TAM é fornecer energia na forma de calor e o papel da UCP1 nesse tecido é de desacoplar a cadeia respiratória na mitocôndria.

Dados referentes a expressão da UCP1 no TAM mostra um aumento de 47 e 54% na expressão dessa proteína nos grupos CH e CHT, respectivamente (C=1,00±0,07; CH=1,47±0,44; CHT=1,54±0,14 %do C, p<0,05) e de 75 e 66% nos grupos RH e RHT, respectivamente

(R=1,00±0,04; RH=1,75±0,18; RHT=1,66±0,11 %do R, p<0,05). Além disso, houve um aumento de 39% na expressão da UCP1 em camundongos do grupo R em relação ao grupo C (C=1,00±0,07; R=1,39±0,12 %do C, p<0,05) (figura 3).

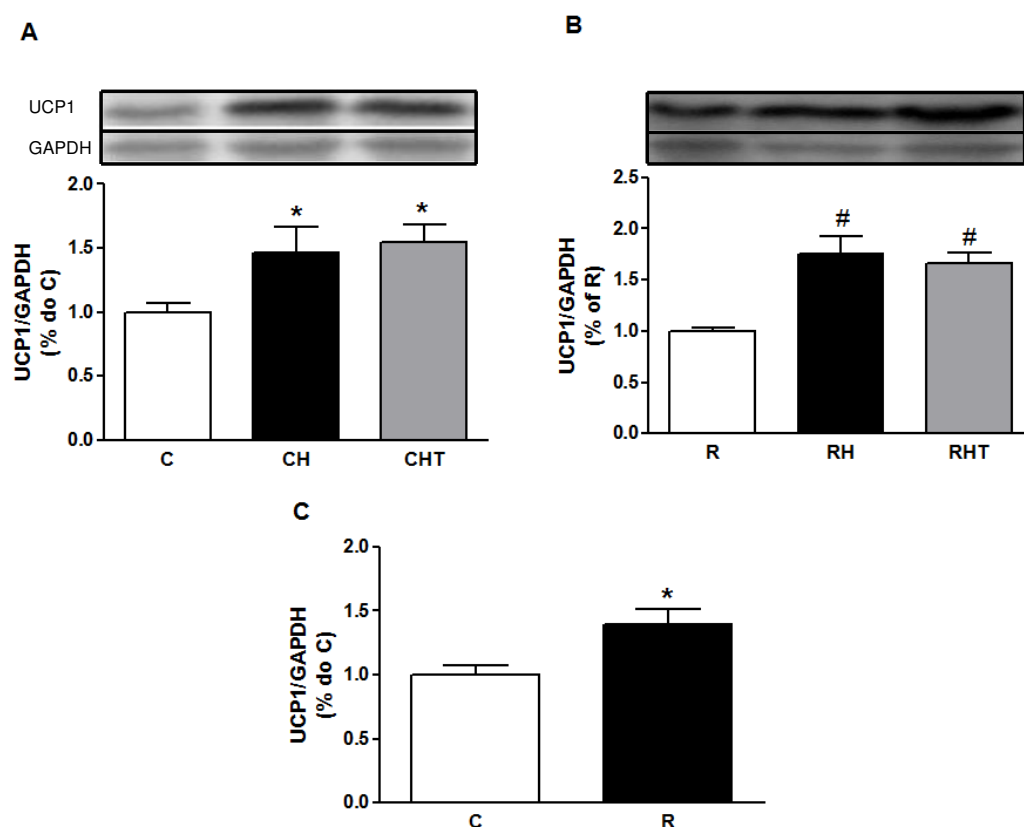


Figura 3. Porcentagem da expressão protéica de UCP1 em tecido adiposo marrom de animais C, CH e CHT (A); R, RH e RHT (B); comparação entre C e R (C). As barras representam a média ± erro padrão da média. * P < 0.05 em relação ao C, # em relação ao R. N=6.

Após a caracterização da taxa metabólica basal, resolvemos avaliar a atividade locomotora espontânea. Para isso, os camundongos foram transferidos para gaiolas especiais com sensores de movimentação horizontal e vertical. Tendo em vista que os camundongos possuem hábitos noturnos, foi observado uma maior movimentação, em todos os grupos experimentais, durante o período escuro. Animais do grupo R tiveram uma diminuição na atividade locomotora durante o período escuro quando comparado ao C (C=3479±267; R=2602±219). Além disso, houve uma diminuição na atividade locomotora dos camundongos alimentados com DHL apenas durante o período escuro (CH=2546±122; CHT=2657±120; RH=2016±268; RHT=1981±95 unidade arbitrária p<0,05) (figura 4).

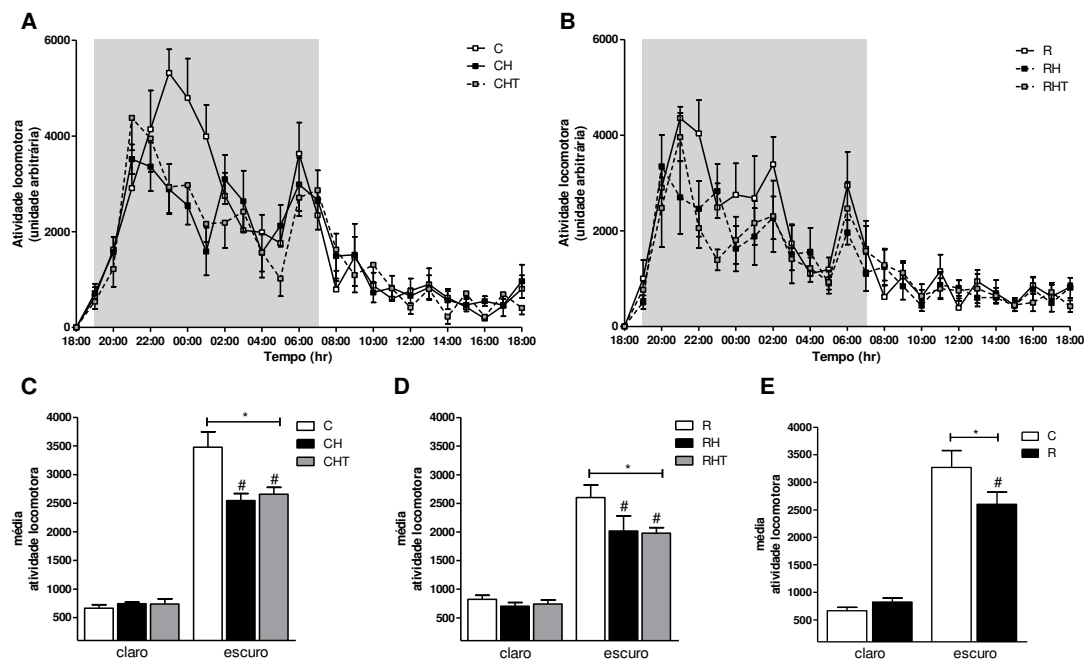


Figura 4. Acompanhamento da atividade locomotora durante 24 horas de registro dos grupo C, CH e CHT (A); R, RH e RHT (B). Média da atividade locomotora durante o período claro e escuro dos grupos C, CH e CHT (C); R, RH e RHT (D); comparação entre os grupos C e R (E). As barras representam a média $\pm$ erro padrão da média. * $p < 0,05$ diferença entre o período escuro e claro do mesmo grupo, # entre o grupo R no período claro, \$ entre o grupo RH no período escuro. N=4

11. CONSIDERAÇÕES FINAIS

11. Considerações Finais

Dados publicados recentemente pelo nosso grupo de pesquisa demonstram um menor ganho de peso em camundongos alimentados com dieta com baixo teor de proteína (Batista et al., 2013a,b; Camargo et al., 2013; Capelli et al., 2013; Vetorrazzi et al., 2014). A suplementação com TAU diminuiu o peso corporal e das gorduras retroperitoneal e perigonadal de camundongos controles e desnutridos alimentados com DHL (Batista et al., 2013b, Capelli et al., 2013), corroborando assim com os resultados referentes a figura 1 do primeiro artigo e tabela 2 do segundo artigo. Além disso, resultados referentes à tolerância à glicose e aos parâmetros bioquímicos do presente trabalho estão de acordo com estudos anteriores (Batista et al., 2013b, Capelli et al., 2013). Utilizando o mesmo modelo experimental, Batista 2013, mostrou hiperleptinemia em camundongos alimentados com DHL, que por sua vez foi menor quando suplementado com Tau (Batista et al., 2013b).

Muitos aspectos anatômicos, fisiológicos e metabólicos são programados em um ambiente nutricional intrauterino ou mesmo durante o período pós-natal, sendo determinante para uma possível instalação da síndrome metabólica na vida adulta (Gluckman et al., 2004). Já é estabelecida, desde 1980, uma associação entre o crescimento fetal ou infantil com doenças cardiovasculares e DM2 na vida adulta (Barker et al., 2003). A obesidade em roedores pode ser programada por uma exposição precoce de dieta com baixo teor de proteína (Bellinger et al., 2003).

A obesidade causa resistência à insulina tanto nos tecidos periféricos quanto em neurônios responsáveis pela manutenção do peso corporal, levando a um círculo vicioso que propicia maior ganho de peso contribuindo para o desenvolvimento do DM2 (Schwartz e Jr. Porte, 2005).

Nossa proposta para o primeiro artigo foi estudar a sensibilidade hipotalâmica da insulina em nosso modelo experimental. Após a caracterização do modelo experimental, analisamos a expressão protéica hipotalâmica IRS1. Os dados referentes ao primeiro artigo indicam uma menor expressão protéica hipotalâmica do pIRS-1 em camundongos submetidos a restrição protéica e obesos por dieta hiperlipídica, entretanto, a suplementação com Tau não foi eficaz em estabelecer qualquer alteração. Por outro lado, não houve diferença significativa na expressão protéica da pAKT, apesar de uma tendência a diminuição no grupo CH. Todavia, a suplementação com TAU em camundongos CHT apresentou um aumento quando comparado ao

grupo CH, indicando uma melhora na sensibilidade hipotalâmica da insulina (Fig 3 artigo 1, Fig 1E artigo 2).

Sabe-se que administração icv de insulina em animais magros produz uma redução de 50% no consumo alimentar (Romanatto et al., 2007; Torsoni et al., 2003). Porém, essa redução é bem menor em animais obesos induzidos por DHL (De Souza et al., 2005; Prada et al., 2005; Moraes et al., 2009), demonstrando um quadro de resistência central à insulina. Sendo assim, os dados referentes à sensibilidade hipotalâmica deste hormônio poderia explicar um aumento no consumo calórico em animais obesos, sendo restabelecido apenas em animais do grupo CHT (Fig 3 artigo 1, Fig 1E artigo 2)

Vários estudos indicam que o hormônio leptina possui um papel mais importante no SNC para controle da homeostase energética do que a própria insulina. A deficiência da leptina causa obesidade severa, caracterizada por hiperfagia que persiste apesar de altos níveis de insulina. Além disso, a obesidade não é induzida exclusivamente por deficiência à insulina, apesar deste hormônio possuir um papel importante na instalação desta síndrome. O ganho de peso e acúmulo de gordura não ocorre quando há uma deficiência na sinalização da insulina, mesmo se houver grande aporte no consumo alimentar (Schwartz et al., 2000). Uma vez secretada pelo tecido adiposo, a leptina precisa atravessar a barreira hematoencefálica para atuar no hipotálamo. Defeitos no transporte da leptina para o SNC é uma das principais características na obesidade. Achados na literatura apontam baixos níveis de leptina no fluido cerebrospinal de indivíduos obesos comparado a indivíduos magros (Campfield et al., 1995, Schwartz et al., 1996).

Portanto, após a caracterização da sensibilidade insulínica hipotalâmica, resolvemos estudar a via de sinalização da leptina também no hipotálamo. Além disso, foi realizada uma melhor análise do consumo alimentar e uma caracterização da expressão gênica global hipotalâmica nestes modelos animais, dando ênfase à expressão dos neuropeptídeos controladores do consumo e gasto energético.

Quando consideramos as 8 semanas de tratamento com DHL, observamos hiperfagia em camundongos submetidos à restrição protéica, a qual permanece durante a última semana de tratamento, e hipofagia em camundongos obesos (Fig. 1 A-D, artigo 2). Porém, ao analisarmos o consumo durante a última semana de tratamento, período em que a obesidade e intolerância a glicose e a insulina já encontram-se instaladas, verificamos um aumento no consumo alimentar em camundongos do grupo CHT quando comparado ao CH (Fig 1D, artigo 2). Além disso, o

consumo diário calórico foi maior em camundongos obesos, porém a suplementação com taurina diminuiu o consumo calórico apenas no grupo CHT quando comparado ao CH (Fig 3 artigo 1, Fig 1E artigo 2). Apesar de apresentar hiperfagia durante todo o período analisado, animais submetidos a restrição protéica possui uma menor ingesta de proteína (Fig 1F, artigo 2).

Nossos resultados sustentam dados da literatura, que mostram um potente efeito anorexigênico da Tau quando administrada diretamente no SNC, atuando em neurônios hipotalâmicos. Este aminoácido potencializa os efeitos anorexigênicos da insulina no hipotálamo (Solon et al., 2012), bem como em vias de sinalização desse hormônio em tecidos periféricos como o fígado e o músculo (Carneiro et al., 2009; Ribeiro et al., 2012).

Ratos obesos possuem um defeito na sinalização hipotalâmica da insulina, gerando uma resistência da resposta hipofágica deste hormônio (Carvalho et al., 2003). A diminuição no consumo alimentar dos camundongos alimentados com DHL está associada a menor expressão do NPY e dos neuropeptídeos anorexigênicos em geral (Tab.4 e Fig.2A, artigo 2). Após caracterização do consumo alimentar, prosseguimos nosso estudo avaliando a responsividade dos diferentes grupos experimentais ao tratamento com leptina. Para tanto, avaliamos o consumo alimentar na presença desse hormônio e em seguida, verificamos a sinalização hipotalâmica através da fosforilação da STAT3.

Observamos que após a administração ip. de leptina, houve uma diminuição no consumo calórico de camundongos controle e submetido à restrição protéica, comprovando o efeito anorexigênico desse hormônio (fig 3A, artigo 2). O tratamento com DHL aboliu o efeito anorexigênico da leptina em camundongos obesos (fig 3A, artigo 2). Todavia, a suplementação com Tau foi eficaz em restabelecer a resposta anorexigênica da leptina em ambos os grupos, demonstrando mais uma vez o potente efeito anorexigênico deste aminoácido (fig 3A, artigo 2).

Corroborando com os resultados acima citados, nossos resultados demonstram que o tratamento com DHL compromete à sinalização hipotalâmica da leptina (Fig 3B, artigo 2), o que poderia explicar o maior consumo calórico nesses grupos. Além disso, o restabelecimento da resposta anorexigênica da leptina em animais suplementados com TAU pode ser explicado por uma maior expressão protéica da STAT3 em ambos os grupos (Fig 3B, artigo 2). Devemos ressaltar ainda que, para os experimentos referentes a sinalização com leptina, o consumo alimentar foi analisado após 12 horas, porém a avaliação do consumo calórico ao longo de

períodos mais longos também mostra redução no consumo calórico em animais do grupo CHT (Fig 3 artigo 1, Fig 1E artigo 2).

Estudos na literatura tem demonstrado uma redução de aproximadamente 75% na atividade da ligação da STAT3 no DNA em resposta a administração icv de leptina em camundogos obesos por dieta. Isso sugere que um déficit na sinalização hipotalâmica da STAT3 é responsável pela resistência central desse hormônio (El-Haschimi et al., 2000).

Vale ainda ressaltar a participação da proteína TUB na sinalização hipotalâmica da insulina e leptina. A expressão hipotalâmica desta proteína no PVN, VMH e ARC comprova sua participação na regulação do peso corporal e no comportamento alimentar (Kleyn et al., 1996). Além disso, trabalho na literatura mostra que uma inibição da proteína TUB e concomitante estimulação icv de insulina e leptina, diminui a expressão gênica do POMC e não altera a expressão gênica do NPY e do AgRP. Entretanto, o tratamento icv desses hormônios foi eficaz em aumentar os níveis proteico no hipotálamo de pAKT, pFoxo1 (insulina) e pJAK2 2 pSTAT3 (leptina), apesar da inibição da proteína TUB. Sendo assim, o efeito da insulina e leptina no controle do consumo alimentar também pode ser independente da expressão dessas proteínas (Prada et al., 2013).

Além do seu efeito anorexigênico no SNC, a TAU possui também um potente papel antiinflamatório. Ela reage com o ácido hipocloroso, formando taurocloraminas, que por sua vez reduz a produção de óxido nítrico, TNF- α , IL-6, interleukin 8 (IL-8) e a atividade do factor nuclear kappa B (NFkB) (Park et al., 1993; Park et al., 1995; Park et al., 1998; Barua et al., 2001; Kim e Kim, 2005). Esses efeitos antiinflamatórios poderiam contribuir para preservação da fosforilação hipotalâmica da STAT3, visto que animais obesos apresentam inflamação em áreas hipotalâmicas.

Para caracterizar os genes hipotalâmicos envolvidos no comportamento alimentar, bem como outros genes que possam alterar a sinalização intracelular da insulina e da leptina, foi realizado análise da expressão gênica no hipotálamo através de chip de *microarray*. Esta análise nos permite avaliar a diferença de expressão gênica entre dois grupos experimentais, através da média da intensidade de expressão detectada pelo chip de *microarray*. Sendo assim, isto nos permite escolher possíveis genes candidatos que estejam controlando o balanço energético.

Resultados referentes à expressão gênica por *microarray* podem ser vistos nas tabelas do artigo 2, onde a expressão desses neuropeptídeos são comparadas entre 2 grupos experimentais e

estão na forma de FC (fold change). Assim, o FC irá representar o número de vezes que um gene está mais ou menos expresso em relação ao segundo grupo comparado. Para confirmar a expressão gênica dos neuropeptídeos NPY, AgRP, POMC e CART, foi realizado real time RT-PCR desses neuropeptídeos.

Apesar de haver diminuição do CARTpt no grupo R em relação ao C e de um aumento desse pré-propeptídeo no grupo RH em relação ao R, quando analisado por *microarray* (Tab 4, artigo 2), houve apenas tendências, não significativas, quando analisado por real time RT-PCR (Fig 2, artigo 2). Essas tendências não significativas, provavelmente se devem ao fato de no *microarray* ter sido avaliado o pré-propeptídeo CART (CARTpt) e na análise de real time RT-PCR o próprio neuropeptídeo CART.

Assim como em nossos resultados referentes a animais submetidos à desnutrição protéica, filhotes de ratos submetidos a desnutrição gestacional, por interrupção na lactação, apresentam aumento na expressão protéica hipotalâmica do NPY e diminuição do CART, quando na vida adulta (Younes- Rapozo et al., 2012). Além disso, entre as áreas analisadas no hipotálamo (PVN, ARC e LH), houve um aumento na densidade de neurônios NPY e uma diminuição dos neurônios CART apenas no PVN. A densidade dos neurônios POMC e AgRP permaneceu inalterada (Younes- Rapozo et al., 2012).

Estudos têm demonstrado que a expressão dos neuropeptídeos hipotalâmicos é dependente do tempo de exposição a DHL (Ziotopoulou et al., 2000; Lin et al., 2000) e do teor de gordura na dieta (Yu et al., 2008; Giraudo et al., 1994).

Camundongos alimentados com DHL por 2 dias apresentam uma diminuição nos níveis de RNAm do NPY e AgRP, voltando aos níveis basais após 1 semana de dieta. Além disso, não há diferença na expressão do POMC na 1ª semana de DHL, porém após a segunda semana houve um aumento na expressão desse neuropeptídeo (Ziotopoulou et al., 2000). Estudos em ratos obesos induzidos por dieta apresentam aumento nos níveis de RNAm do NPY no ARC após 2 semanas de dieta, porém após 12 semanas há uma diminuição no nível desse neuropeptídeo. Os autores sugerem que essa elevação do NPY no ARC desses animais seja um fator de predisposição para obesidade, em contrapartida, a diminuição da expressão desse neuropeptídeo a longo prazo é de fundamental importância para combater o ganho de peso corporal, uma vez que eles já tornaram-se obesos (Levin e Dunn-Meynell 2002). Outros estudos mostram que não há diferença nos níveis de NPY, AgRP, POMC e CART no hipotálamo de camundongos

alimentados com DHL durante 2 semanas, apesar de apresentarem resistência hepática a insulina (Heijboer et al., 2005). A diminuição dos neuropeptídeos orexigênicos NPY e AgRP está associada aos primeiros dias de DHL, onde há um aumento transiente no consumo alimentar. Essa mudança na expressão desses peptídeos parece atuar de forma compensatória na hiperfagia, evitando o grande aporte energético (Ziotopoulou et al., 2000). Outros trabalhos mostram uma diminuição do NPY no ARC na 8ª e 19ª semana de DHL, porém os níveis do POMC só são menores na 19ª semana, ficando inalterado na 8ª semana de tratamento (Lin et al., 2000).

Além do grau de teor de gordura na dieta, há também uma diferença na expressão dos neuropeptídeos hipotalâmicos de acordo com a sensibilidade de cada animal a DHL (Huang et al., 2003; Yu et al., 2008). Estudos têm demonstrado que animais resistentes à obesidade por DHL mantêm reduzidos os níveis de NPY e aumentados os níveis de POMC após 14 e 19 semanas de DHL (Bergen et al., 1999; Huang et al., 2004). Esses resultados indicam uma resposta compensatória do hipotálamo associado a resistência a obesidade por dieta nesses animais. A expressão do neuropeptídeo CART em animais obesos pode ser encontrada em diversos núcleos hipotalâmicos. Há uma diminuição na expressão do RNAm do CART no ARC e PVN, e um aumento no LH e DM de animais obesos por DHL quando comparado aos animais resistentes a esta dieta (Yu, et al., 2008). Uma administração local de CART dentro do DM e LH estimula o comportamento alimentar (Abbot et al., 2001). Portanto, um aumento desse neuropeptídeo nessas áreas possui um efeito orexigênico em animais obesos por DHL, estando relacionado como consequência da obesidade induzida por dieta (Yu et al., 2008).

Assim como a infusão icv de insulina, a administração de taurina também diminuiu o consumo alimentar e a expressão hipotalâmica de RNAm do NPY sem alterar os níveis do POMC. Além disso, a taurina, quando administrada juntamente com a insulina, é capaz de potencializar o efeito anorexigênico desse hormônio (Solon et al., 2012).

Nossos resultados mostraram uma redução em vários genes envolvidos na glicólise/gliconeogênese, ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa no hipotálamo de camundongos submetidos a restrição protéica (Tab 5, artigo 2). Trabalhos anteriores demonstram alterações em genes relacionados ao ciclo de Krebs e de fosforilação oxidativa mitocondrial por análise de microarray em ilhotas isolados de ratos com restrição de proteína fetal (Reusens et al., 2008). Em ratos Zucker obesos, a melhora na expressão protéica de várias subunidades mitocondriais da cadeia respiratória no hipotálamo leva a uma hipersensibilidade de glicose neural, o que prejudica

a sinalização redox e promove stress oxidativo e danos hipotalâmicos (Colombani et al., 2009). De acordo com os nossos resultados (Tab 6, artigo 2), os grupos DHL também tiveram um aumento na expressão de genes relacionados com a resposta a proteína que auxiliam o enovelamento de outras proteínas e ao stress de retículo. Esta via está envolvida na dessensibilização de leptina no hipotálamo, o que pode aumentar os níveis de mRNA de NPY e AgRP, promovendo hiperfagia (Ozcan et al., 2009).

A Tau apresenta propriedades antioxidantes que regula a função mitocondrial. A suplementação com Tau normalizou a expressão de genes envolvidos no ciclo de krebs, glicólise, defesa celular, crescimento celular e proliferação em ilhotas pancreáticas fetais proveniente da prole materna submetida a restrição protéica gestacional (Reusens et al., 2008). Em células PC12, a Tau diminuiu a ativação do stress de retículo induzida por peróxido (Pan et al., 2010). A Tau também reduziu a produção de superóxido na mitocôndria de cardiomiócitos, aumentando a atividade de transporte de elétrons da cadeia (Jong et al., 2012). Camundongos desnutridos suplementados com Tau mostraram melhora no equilíbrio redox, na sinalização da insulina no fígado e uma redução dos marcadores de stress de retículo, como p-PERK e BIP (Batista et al., 2013a, Batista et al., 2013b, Capelli et al., 2013). Em acordo com os estudos mencionados, nossos resultados mostram que a suplementação de Tau diminui a expressão dos genes relacionados a resposta a proteína que auxiliam o enovelamento de outras proteínas, a apoptose e a via de stress de retículo no hipotálamo de camundongos CHT e RHT (Tab 5 e 6, artigo 2), o que pode contribuir para melhora na sinalização da leptina nestes grupos.

Após a caracterização da tolerância periférica à glicose, da sensibilidade hipotalâmica da insulina, da sinalização hipotalâmica da leptina, da análise do consumo alimentar e dos níveis de expressão dos neuropeptídeos hipotalâmicos controladores do consumo e gasto energético, resolvemos estender nossas análises para avaliar a taxa metabólica basal e o gasto energético em nosso modelo de estudo. Para isso, realizamos experimento de calorimetria indireta, análise da atividade locomotora espontânea e também avaliamos o nível de expressão protéica da UCP-1 no TAM. Os resultados referentes a estes experimentos fazem parte do terceiro artigo científico, que encontra-se na fase de finalização dos experimentos.

Resultados referentes à calorimetria indireta indicam uma diminuição do QR em camundongos submetidos a DHL em ambos os grupos, tanto no período claro quanto no período escuro (Fig 1 C e D). Além disso, houve aumento no QR durante o período escuro apenas nos

grupos controle e submetidos à desnutrição protéica, indicando perda da flexibilidade metabólica nos grupos alimentados com DHL (Fig 1 C e D). Ainda, camundongos do grupo R, durante o período escuro, apresentam um aumento no QR quando comparado ao grupo controle no mesmo período (Fig 1 E).

Nossos dados mostram que animais do grupo controle apresentam um QR próximo de 1.0, indicando uma maior oxidação de carboidratos. Esses animais apresentam variações no QR durante o período claro e escuro, sendo maior neste último período. Por outro lado, camundongos alimentados com DHL possuem QR próximo de 0.7, indicando preferência em oxidar mais lipídeos. Além disso, esses animais perderam o padrão oscilatório do QR entre o período claro e escuro, estando associado a perda da flexibilidade metabólica em oxidar substratos energéticos.

Estudos na literatura corroboram com nossos resultados, uma vez que o QR de animais não obesos fica próximo de 1.0 e apresentam perfil de variação durante o período claro e escuro, sendo mais elevada durante a noite (Kirchner et al., 2012; Longo et al., 2009). Além disso, o QR de animais obesos por DHL fica próximo de 0.7, além de não apresentar variações entre o período claro e escuro, caracterizando dessa forma a perda da sua flexibilidade metabólica (Kirchner et al., 2012; So et al., 2011; Longo et al., 2009).

Dados na literatura mostram um aumento no GE apenas durante as 2 primeiras semanas em animais alimentados com DHL, permanecendo inalterado após 8 semanas de dieta (So et al., 2011). Outros trabalhos mostram que ratos submetidos a DHL não apresentam diferenças no gasto energético de repouso durante 2 ou 5 semanas de dieta (Fam et al., 2007). Por outro lado, Kirchner et al (2012) observaram um aumento no GE de camundongos submetidos a DHL por 14 semanas, porém quando esses animais foram alimentados com DHL apenas durante o período claro, não houve diferença no GE (Kirchner et al., 2012). Nossos dados indicam uma diminuição do GE nos grupos CH e CHT apenas durante o período claro, favorecendo aumento no ganho de peso nesses animais (Fig 2C). Todavia, durante o período escuro, camundongos DHL possuem um aumento do GE, indicando uma forma compensatória de gastar o excesso de energia adquirida pelo consumo de DHL (Fig 2C).

Após os experimentos de calorimetria indireta, resolvemos prosseguir com a avaliação do gasto energético através da análise molecular da expressão protéica mitocondrial da UCP1 no TAM. O TAM tem como função principal fornecer energia na forma de calor e o papel da UCP1 nesse tecido é de desacoplar a cadeia respiratória na mitocôndria para produção de calor.

O excesso de comida ou de ingestão calórica em animais que consomem DHL proporciona uma maior atividade da UCP1 e tal resposta fisiológica é referida como termogênese induzida por dieta, sendo um tipo de mecanismo utilizado para dissipar o excesso de energia adquirida como calor (Okamatsu-Ogura et al., 2011). Assim como nos nossos resultados (Fig 3 A e B), ratos obesos por DHL apresentam também um aumento na UCP1 no TAM, mostrando uma resposta termogênica adaptativa induzida por DHL (So et al., 2011). Além disso, camundongos machos submetidos a DHL possuem uma maior capacidade oxidativa do TAM e aumento da expressão da UCP1, conseqüentemente uma maior proteção contra a obesidade e resistência a insulina em relação as fêmeas (Nadal-Casellas et al., 2013).

Por último, avaliamos a atividade locomotora espontânea no modelo em estudo. Para isso, os camundongos foram transferidos para gaiolas especiais com sensores de movimentação horizontal e vertical.

Alguns estudos mostram que animais submetidos a DHL apresentam uma diminuição na atividade locomotora e aumento do GE (Kirchner et al., 2012; Longo et al., 2010). Corroborando com nossos resultados (Fig 4 C e D), outros trabalhos mostram que a menor atividade locomotora em animais obesos é observada apenas durante o período noturno, sendo igual durante o dia (So et al., 2011). Trabalhos com ratos apontam um aumento na atividade locomotora após 2 semanas de tratamento com DHL, diminuindo apenas após 5 semanas de dieta (Fam et al., 2007). Sabe-se que a infusão icv de taurina é capaz de reduzir a atividade locomotora espontânea quando analisada apenas por período de 90 minutos, não diferindo quando avaliada por 30 minutos (Solon et al., 2012), entretanto em nosso estudo não foi observado nenhuma alteração na atividade locomotora espontânea quando analisado durante o período claro ou escuro.

Em resumo, camundongos submetidos à desnutrição protéica apresentam um aumento do NPY e AgRP, sugerindo uma adaptação neuroendócrina desses neuropeptídeos hipotalâmicos, culminando com maior consumo alimentar, no intuito de tentar suprir o aporte de proteína na dieta. Apesar disso, a hiperfagia apresentada nesses animais não é suficiente para restabelecer o nível protéico adequado. Nossos resultados corroboram com achados na literatura referentes aos animais alimentados com DHL a longo prazo, uma vez que em 8 semanas de DHL, camundongos obesos apresentam diminuição no nível de expressão gênica dos neuropeptídeos hipotalâmicos orexigênicos e um aumento nos anorexigênicos. Além disso, nossos resultados dão suporte a teoria de que uma vez obeso, esses animais apresentam uma resistência hipotalâmica à insulina e

à leptina e possuem tendência em frear o consumo alimentar e consequentemente o peso corporal, no intuito de prevenir possível piora no quadro de obesidade. Animais suplementados com taurina tiveram uma diminuição dos neuropeptídeos orexigênicos e aumento dos anorexigênicos, fazendo com que haja uma diminuição no excesso do consumo calórico em animais DHL, além de restabelecer a sinalização hipotlâmica a leptina. Além disso, nossos resultados também mostram um comprometimento do gasto energético em animais obesos através da análise de calorimetria indireta e da atividade locomotora espontânea.

12. CONCLUSÕES

12.1 SUMÁRIO E CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados no presente estudo, podemos concluir que:

- ✓ A desnutrição protéica aumentou a expressão dos neuropeptídeos orexigênicos e diminuiu a do anorexigênico CART, sugerindo adaptação neuroendócrina em aumentar o consumo alimentar, no intuito de tentar suprir a carência de proteína na dieta;
- ✓ Após a instalação da obesidade, houve diminuição na expressão gênica dos neuropeptídeos hipotalâmicos orexigênicos e um aumento dos anorexigênicos, sugerindo um mecanismo de frear o consumo alimentar e uma possível piora no quadro de obesidade;
- ✓ A suplementação com Tau em animais obesos reestabeleceu alguns padrões metabólicos como peso corporal, índice de Lee e a adiposidade. Os níveis plasmáticos de insulina, glicose e colesterol, além do excesso no consumo de calorias foram restabelecidos apenas em animais controles DHL;
- ✓ Animais suplementados com Tau tiveram diminuição dos neuropeptídeos orexigênicos e aumento dos anorexigênicos, propiciando diminuição no excesso do consumo calórico em animais controle DHL;
- ✓ A intervenção com Tau propiciou melhora na sensibilidade hipotalâmica à insulina em animais controle submetidos a DHL, além de uma melhora na sinalização hipotalâmica da leptina em animais DHL em ambos os grupos;
- ✓ Camundongos submetidos à desnutrição protéica possuem preferência em oxidar carboidratos e os alimentados com DHL uma preferência em oxidar lipídeos como principal fonte energética;
- ✓ Houve uma perda da flexibilidade metabólica entre o período claro e escuro em camundongos obesos alimentados com DHL;
- ✓ Camundongos obesos apresentam diminuição do gasto energético durante o dia, propiciando maior estoque de energia como gordura, ficando inalterados no período noturno;
- ✓ A desnutrição protéica, bem como a obesidade desencadearam aumento da termogênese no TAM;

Diantes das conclusões podemos afirmar que a suplementação com Tau melhora alguns padrões metabólicos prejudicados por DHL, principalmente em relação a sensibilidade a insulina e sinalização da leptina no hipotálamo. Entretanto, animais submetidos a desnutrição protéica possuem uma maior dificuldade de adaptação quando os mesmos recebem DHL na vida adulta, aumentando a suscetibilidade desses animais às morbidades associadas a esse tipo de dieta.

13. REFERÊNCIAS

13. REFERÊNCIAS

- Abbott CR, Rossi M, Wren AM, Murphy KG, Kennedy AR, Stanley SA, Zollner AN, Morgan DG, Morgan I, Ghatei MA, Small CJ, Bloom SR. Evidence of an orexigenic role for cocaine- and amphetamine-regulated transcript after administration into discrete hypothalamic nuclei. *Endocrinology* 2001;142(8):3457-63.
- Albrecht J, Schousboe A. Taurine interaction with neurotransmitter receptors in the CNS: an update. *Neurochem Res.* 2005 Dec;30(12):1615-21.
- Arora S, Anubhuti. Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity--a review. *Neuropeptides.* 2006 Dec;40(6):375-401.
- Badman MK, Flier JS. The gut and energy balance: visceral allies in the obesity wars. *Science* 2005; 307: 1909–1914.
- Barker DJ, Martyn CN, Osmond C, Hales CN, Fall CH. Growth in utero and serum cholesterol concentrations in adult life. *BMJ* 1993; 307:1524–1527.
- Batista TM, Ribeiro RA, Amaral AG, de Oliveira CA, Boschero AC, Carneiro EM. 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(3):306-12.
- Batista TM, da Silva PM, Amaral AG, Ribeiro RA, Boschero AC, Carneiro EM: Taurine supplementation restores insulin secretion and reduces er stress markers in protein-malnourished mice. *Adv Exp Med Biol* 2013a;776:129-139.
- Batista TM, Ribeiro RA, da Silva PM, Camargo RL, Lollo PC, Boschero AC, Carneiro EM. Taurine supplementation improves liver glucose control in normal protein and malnourished mice fed a high-fat diet. *Mol Nutr Food Res.* 2013b;57(3):423-34.
- Barua M, Liu Y, Quinn MR. Taurine chloramine inhibits inducible nitric oxide synthase and TNF-alpha gene expression in activated alveolar macrophages: decreased NF-kappaB activation and IkappaB kinase activity. *J Immunol.* 2001 Aug 15;167(4):2275-81.
- Bellinger L, Lilley C, Langley-Evans SC. Prenatal exposure to a maternal low-protein diet programmes a preference for high-fat foods in the young adult rat. *Br J Nutr.* 2004 Sep;92(3):513-20.
- Bergen HT, Mizuno T, Taylor J, Mobbs CV. Resistance to diet-induced obesity is associated with increased proopiomelanocortin mRNA and decreased neuropeptide Y mRNA in the hypothalamus. *Brain Res.* 1999; 851: 198-203.
- Bouret SG, Simerly RB. Minireview: Leptin and development of hypothalamic feeding circuits. *Endocrinology* 2004; 145(6):2621-6.

- Brownlow BS, Petro A, Feinglos MN, Surwit RS. The role of motor activity in diet-induced obesity in C57BL/6J mice. *Physiol Behav.* 1996 Jul;60(1):37-41.
- Camargo RL, Batista TM, Ribeiro RA, Velloso LA, Boschero AC, Carneiro EM. Effects of taurine supplementation upon food intake and central insulin signaling in malnourished mice fed on a high-fat diet. *Adv Exp Med Biol.* 2013;776:93-103.
- Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science.* 1995 Jul 28;269(5223):546-9.
- Cappelli AP, Zoppi CC, Barbosa-Sampaio HC, Costa JM, Protzek AO, Morato PN, Boschero AC, Carneiro EM: Taurine-induced insulin signalling improvement of obese malnourished mice is associated with redox balance and protein phosphatases activity modulation. *Liver Int* 2013.
- Carvalho JB, Ribeiro EB, Araújo EP, Guimarães RB, Telles MM, Torsoni M, Gontijo JA, Velloso LA, Saad MJ. Selective impairment of insulin signalling in the hypothalamus of obese Zucker rats. *Diabetologia.* 2003 Dec;46(12):1629-40.
- Carvalho JB, Siloto RM, Ignacchitti I, Brenelli SL, Carvalho CR, Leite A, Velloso LA, Gontijo JA, Saad MJ. Insulin modulates leptin-induced STAT3 activation in rat hypothalamus. *FEBS Lett* 2001; 500: 119–124.
- Carneiro EM, Latorraca MQ, Araujo E, Beltrá M, Oliveras MJ, Navarro M, Berná G, Bedoya FJ, Velloso LA, Soria B, Martín F. Taurine supplementation modulates glucose homeostasis and islet function. *J Nutr Biochem.* 2009;20(7):503-11.
- Colombani AL, Carneiro L, Benani A, Galinier A, Jaillard T, Duparc T, Offer G, Lorsignol A, Magnan C, Casteilla L, Pénicaud L, Leloup C: Enhanced hypothalamic glucose sensing in obesity: Alteration of redox signaling. *Diabetes* 2009;58:2189-2197.
- Cone RD. The central melanocortin system and its role in energy homeostasis. *Ann. Endocrinol (Paris)*1999; 60: 3-9.
- Cone RD, Lu D, Koppula S, Vage DI, Klungland H, Boston B, Chen W, Orth DN, Pouton C, Kesterson RA. The melanocortin receptors: agonists, antagonists, and the hormonal control of pigmentation. *Recent Prog Horm Res.* 1996;51:287-317.
- Covey SD, Wideman RD, McDonald C, Unniappan S, Huynh F, Asadi A, Speck M, Webber T, Chua SC, Kieffer TJ. The pancreatic beta cell is a key site for mediating the effects of leptin on glucose homeostasis. *Cell Metab.* 2006 Oct;4(4):291-302.
- De Souza CT, Araujo EP, Bordin S, Ashimine R, Zollner RL, Boschero AC, Saad MJ, Velloso LA. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology* 2005; 146: 4192–4199.

- Desforges M, Ditchfield A, Hirst CR, Pegorie C, Martyn-Smith K, Sibley CP, Greenwood SL. Reduced placental taurine transporter (TauT) activity in pregnancies complicated by pre-eclampsia and maternal obesity. *Adv Exp Med Biol*. 2013; 776:81-91.
- El-Haschimi K, Pierroz DD, Hileman SM, Bjørbaek C, Flier JS. Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity. *J Clin Invest*. 2000 Jun;105(12):1827-32.
- Elias CF, Lee C, Kelly J, Aschkenasi C, Ahima RS, Couceyro PR, Kuhar MJ, Saper CB, Elmquist JK. Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron*. 1998; 21(6):1375-85.
- Elmquist JK, Elias CF, Saper CB. From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron*. 1999 Feb;22(2):221-32.
- Fam BC, Morris MJ, Hansen MJ, Kebede M, Andrikopoulos S, Proietto J, Thorburn AW. Modulation of central leptin sensitivity and energy balance in a rat model of diet-induced obesity. *Diabetes Obes Metab*. 2007; 9(6):840-52.
- Flatt JP. Dietary fat, carbohydrate balance, and weight maintenance. *Ann N Y Acad Sci*. 1993 Jun 14;683:122-40.
- Flier JS. Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell* 2004 Jan 23;116(2):337-50.
- 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(5):1115-9.
- Frühbeck G. Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochem J*. 2006 Jan 1;393 (Pt1):7-20.
- Giraud S, Kotz CM, Grace MK, Levine AS, Billington CJ. Rat hypothalamic NPY mRNA and brown fat uncoupling protein mRNA after high-carbohydrate or high-fat diets. *Am J Physiol*. 1994 May;266(5 Pt 2):R1578-83.
- Gorski JN, Dunn-Meynell AA, Hartman TG, Levin BE. Postnatal environment overrides genetic and prenatal factors influencing offspring obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006; 291(3):R768-78.
- Gluckman PD, Hanson MA. Living with the past: evolution, development, and patterns of disease. *Science*. 2004 Sep 17;305(5691):1733-6.
- Han X, Budreau AM, Chesney RW. The taurine transporter gene and its role in renal development. *Amino Acids*. 2000; 19(3-4):499-507.

- Heilbronn LK, Ravussin E. Calorie restriction and aging: review of the literature and implications for studies in humans. *Am J Clin Nutr* 2003; 78:361–9.
- Heijboer AC, Voshol PJ, Donga E, van Eden CG, Havekes LM, Romijn JA, Pijl H, Corssmit EP. High fat diet induced hepatic insulin resistance is not related to changes in hypothalamic mRNA expression of NPY, AgRP, POMC and CART in mice. *Peptides*. 2005; 26(12):2554-8.
- Heller-Stilb B, van Roeyen C, Rascher K, Hartwig HG, Huth A, Seeliger MW, Warskulat U, Häussinger D. Disruption of the taurine transporter gene (taut) leads to retinal degeneration in mice. *FASEB J*. 2002; 16(2):231-3.
- Huang XF, Han M, Storlien LH. The level of NPY receptor mRNA expression in diet-induced obese and resistant mice. *Brain Res Mol Brain Res*. 2003 Jul 4;115(1):21-8.
- Huang XF, Xin X, McLennan P, Storlien L. Role of fat amount and type in ameliorating diet-induced obesity: insights at the level of hypothalamic arcuate nucleus leptin receptor, neuropeptide Y and pro-opiomelanocortin mRNA expression. *Diabetes Obes Metab*. 2004 Jan;6(1):35-44.
- Jensen DR , Gayles EC, Ammon S, Phillips R, Eckel RH. A self-correcting indirect calorimeter system for the measurement of energy balance in small animals. *J Appl Physiol* (1985). 2001 Mar;90(3):912-8.
- Jong CJ, Azuma J, Schaffer S: Mechanism underlying the antioxidant activity of taurine: Prevention of mitochondrial oxidant production. *Amino Acids* 2012;42:2223-2232.
- Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 2006; 444: 840-846.
- Kalbe L, Leunda A, Sparre T, Meulemans C, Ahn MT, Orntoft T, Kruhoffer M, Reusens B, Nerup J, Remacle C (2005). Nutritional regulation of proteases involved in fetal rat insulin secretion and islet cell proliferation, *Br J Nutr* 93:309–16.
- Kim JW, Kim C. Inhibition of LPS-induced NO production by taurine chloramine in macrophages is mediated through Ras-ERK-NF-kappaB. *Biochem Pharmacol*. 2005 Nov 1;70(9):1352-60.
- Kramer PR, Kramer SF, Marr K, Guan G, Wellman PJ, Bellinger LL. Nicotine administration effects on feeding and cocaine-amphetamine-regulated transcript (CART) expression in the hypothalamus. *Regul Pept*. 2007; 138(2-3):66-73.
- Koylu EO, Couceyro PR, Lambert PD, Kuhar MJ. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide immunohistochemical localization in the rat brain. *J Comp Neurol*. 1998; 391(1):115-32.

- Kristensen P, Judge ME, Thim L, Ribel U, Christjansen KN, Wulff BS, Clausen JT, Jensen PB, Madsen OD, Vrang N, Larsen PJ, Hastrup S. Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin *Nature*. 1998; 393(6680):72-6.
- Kirchner H, Hofmann SM, Fischer-Rosinsky A, Hembree J, Abplanalp W, Ottaway N, Donelan E, Krishna R, Woods SC, Müller TD, Spranger J, Perez-Tilve D, Pfluger PT, Tschöp MH, Habegger KM. Caloric restriction chronically impairs metabolic programming in mice. *Diabetes*. 2012 Nov;61(11):2734-42.
- L'Amoreaux WJ, Cuttitta C, Santora A, Blaize JF, Tachjadi J, Idrissi A El. Taurine regulates insulin release from pancreatic beta cell lines. *Journal of biomedical science* 2010; 17(Suppl 1):S11, 1-8.
- Levin BE, Dunn-Meynell AA. Reduced central leptin sensitivity in rats with diet-induced obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2002 Oct;283(4):R941-8.
- Lin S, Storlien LH, Huang XF. Leptin receptor, NPY, POMC mRNA expression in the diet-induced obese mouse brain. *Brain Res*. 2000; 875(1-2):89-95.
- Lin S, Yang J, Wu G, Liu M, Luan X, Lv Q, Zhao H, Hu J. Preventive effect of taurine on experimental type II diabetic nephropathy. *J Biomed Sci*. 2010 Aug 24;17 Suppl 1:S46.
- Longo KA, Charoenthongtrakul S, Giuliana DJ, Govek EK, McDonagh T, Distefano PS, Geddes BJ. The 24-hour respiratory quotient predicts energy intake and changes in body mass. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010; 298(3):R747-54.
- Lusk G. *The element of science and nutrition* (4th ed.). Philadelphia, PA: Saunders, 1928, p.64-68.
- Manna P, Das J, Sil PC. Role of sulfur containing amino acids as an adjuvant therapy in the prevention of diabetes and its associated complications. *Curr Diabetes Rev*. 2013 May;9(3):237-48.
- Mantzoros CS, Magkos F, Brinkoetter M, Sienkiewicz E, Dardeno TA, Kim SY, Hamnvik OP, Koniaris A. Leptin in human physiology and pathophysiology. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2011; 301(4):E567-84.
- McCarty MF. Exploiting complementary therapeutic strategies for the treatment of type II diabetes and prevention of its complications. *Med Hypotheses* 1997; 49(2):143-52.
- Metcalf NB, Monaghan P. Compensation for a bad start: grow now, pay later? *Trends Ecol Evol*. 2001; 16(5):254-260.
- Moraes JC, Coope A, Morari J, Cintra DE, Roman EA, Pauli JR, Romanatto T, Carnevali JB, Oliveira AL, Saad MJ, Velloso LA. High-fat diet induces apoptosis of hypothalamic neurons. *PLoS One*. 2009; 4(4):e5045.

- Morioka T, Asilmaz E, Hu J, Dishinger JF, Kurpad AJ, Elias CF, Li H, Elmquist JK, Kennedy RT, Kulkarni RN. Disruption of leptin receptor expression in the pancreas directly affects beta cell growth and function in mice. *J Clin Invest*. 2007 Oct;117(10):2860-8.
- Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 2006; 443: 289–295.
- Münzberg H, Björnholm M, Bates SH, Myers MG Jr. Leptin receptor action and mechanisms of leptin resistance. *Cell Mol Life Sci*. 2005 Mar;62(6):642-52.
- Munzberg H, Flier JS, Bjorbaek C. Region-specific leptin resistance within the hypothalamus of diet-induced obese mice. *Endocrinology*. 2004 Nov; 145(11):4880-9.
- Münzberg H, Myers MG Jr. Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance. *Nat Neurosci*. 2005 May;8(5):566-70.
- Nadal-Casellas A, Bauzá-Thorbrügge M, Proenza AM, Gianotti M, Lladó I. Sex-dependent differences in rat brown adipose tissue mitochondrial biogenesis and insulin signaling parameters in response to an obesogenic diet. *Mol Cell Biochem*. 2013; 373(1-2):125-35.
- Né Chad M, Nedergaard J, Cannon B. Noradrenergic stimulation of mitochondriogenesis in brown adipocytes differentiating in culture. *Am J Physiol*. 1987; 253(6 Pt 1):C889-94.
- Niswender KD, Baskin DG, Schwartz MW. Insulin and its evolving partnership with leptin in the hypothalamic control of energy homeostasis. *Trends Endocrinol Metab*. 2004. Oct;15(8):362-9.
- Nguyen AD, Mitchell NF, Lin S, Macia L, Yulyaningsih E, Baldock PA, Enriquez RF, Zhang L, Shi YC, Zolotukhin S, Herzog H, Sainsbury A. Y1 and Y5 receptors are both required for the regulation of food intake and energy homeostasis in mice. *PLoS One*. 2012;7(6):e4019.
- Okamatsu-Ogura Y, Nio-Kobayashi J, Iwanaga T, Terao A, Kimura K, Saito M. Possible involvement of uncoupling protein 1 in appetite control by leptin. *Exp Biol Med* (Maywood). 2011; 236(11):1274-81.
- Ollmann MM, Wilson BD, Yang YK, Kerns JA, Chen Y, Gantz I, Barsh GS. Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science* 1997; 278(5335):135-8.
- Ozcan L, Ergin AS, Lu A, Chung J, Sarkar S, Nie D, Myers MG, Ozcan U: Endoplasmic reticulum stress plays a central role in development of leptin resistance. *Cell Metab* 2009;9:35-51.
- Pan C, Giraldo GS, Prentice H, Wu JY: Taurine protection of pc12 cells against endoplasmic reticulum stress induced by oxidative stress. *J Biomed Sci* 2010;17 Suppl 1:S17.

- Park E, Alberti J, Quinn MR, Schuller-Levis G. Taurine chloramine inhibits the production of superoxide anion, IL-6 and IL-8 in activated human polymorphonuclear leukocytes. *Adv Exp Med Biol.* 1998;442:177-82.
- Park E, Quinn MR, Wright CE, Schuller-Levis G. Taurine chloramine inhibits the synthesis of nitric oxide and the release of tumor necrosis factor in activated RAW 264.7 cells. *J Leukoc Biol.* 1993 Aug;54(2):119-24.
- Park E, Schuller-Levis G, Quinn MR. Taurine chloramine inhibits production of nitric oxide and TNF-alpha in activated RAW 264.7 cells by mechanisms that involve transcriptional and translational events. *J Immunol.* 1995 May 1;154(9):4778-84.
- Pinto S, Roseberry AG, Liu H, Diano S, Shanabrough M, Cai X, Friedman JM, Horvath TL. Rapid rewiring of arcuate nucleus feeding circuits by leptin. *Science.* 2004 Apr 2;304(5667):110-5.
- Plagemann A, Harder T, Rake A, Melchior K, Rohde W, Dörner G. Hypothalamic nuclei are malformed in weanling offspring of low protein malnourished rat dams. *J Nutr.* 2000; 130(10):2582-9.
- Plum L, Belgardt BF, Brüning JC. Central insulin action in energy and glucose homeostasis. *J Clin Invest.* 2006 Jul;116(7):1761-6. *J Clin Invest* 2006; 116:1761–1766.
- Prada PO, Zecchin HG, Gasparetti AL, Torsoni MA, Ueno M, Hirata AE, Corezola do Amaral ME, Hoer NF, Boschero AC, Saad MJ. Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion. *Endocrinology* 2005; 146: 1576–1587.
- Younes-Rapozo V, de Moura EG, da Silva Lima N, Barradas PC, Manhães AC, de Oliveira E, Lisboa PC. Early weaning is associated with higher neuropeptide Y (NPY) and lower cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) expressions in the paraventricular nucleus (PVN) in adulthood. *Br J Nutr.* 2012 Dec 28;108(12):2286-95.
- Reis MA, Carneiro EM, Mello MA, Boschero AC, Saad MJ, Velloso LA. 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;127:403-10.
- Remmers F, Delemarre-van de Waal HA. Developmental programming of energy balance and its hypothalamic regulation. *Endocr Rev.* 2011; 32(2):272-311.
- Reusens B, Sparre T, Kalbe L, Bouckennooghe T, Theys N, Kruhøffer M, Orntoft TF, Nerup J, Remacle C: The intrauterine metabolic environment modulates the gene expression pattern in fetal rat islets: Prevention by maternal taurine supplementation. *Diabetologia* 2008;51:836-845.

- Ribeiro RA, Bonfleur ML, Amaral AG, Vanzela EC, Rocco SA, Boschero AC, Carneiro EM. Taurine supplementation enhances nutrient-induced insulin secretion in pancreatic mice islets. *Diabetes Metab Res Ver.* 2009; 25, 370-379.
- Ribeiro RA, Batista TM, Coelho FM, Boschero AC, Lopes GS, Carneiro EM (2012). Decreased beta-cell insulin secretory function in aged rats due to impaired Ca²⁺ handling, *Exp Physiol* Apr 27.
- Robson AJ, Rousseau K, Loudon AS, Ebling FJ. Cocaine and amphetamine-regulated transcript mRNA regulation in the hypothalamus in lean and obese rodents. *J Neuroendocrinol.* 2002 Sep;14(9):697-709.
- Rosenbaum M, Leibel RL, Hirsch J. Obesity. *N Engl J Med.* 1997; 337(6):396-407.
- Romanatto T, Cesquini M, Amaral ME, Roman EA, Moraes JC, Torsoni MA, Cruz-Neto AP, Velloso LA (2007). TNF-alpha acts in the hypothalamus inhibiting food intake and increasing the respiratory quotient--effects on leptin and insulin signaling pathways, *Peptides* 28: 1050–1058.
- Saad MJ, Carvalho CR, Thirone AC, Velloso LA. Insulin induces tyrosine phosphorylation of JAK2 in insulin-sensitive tissues of the intact rat. *J Biol Chem* 1996; 271: 22100–22104.
- Saito M. Human brown adipose tissue: regulation and anti-obesity potential. *Endocr J.* 2014;61(5):409-16.
- Saito M. Brown adipose tissue as a regulator of energy expenditure and body fat in humans. *Diabetes Metab J.* 2013 Feb;37(1):22-9.
- Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JR, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu WS, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ, Yanagisawa M. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 1998 Feb 20;92(4):573-85.
- Schwartz MW, Jr. Porte D. Diabetes, obesity, and the brain. *Science* 2005; 307: 375-379.
- Schwartz MW, Peskind E, Raskind M, Boyko EJ, Porte D Jr. Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans. *Nat Med.* 1996 May;2(5):589-93.
- Schwartz MW, Woods SC, Porte Jr. D, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature.* 2000 Apr 6;404(6778):661-71.
- Seidell JC, Muller DC, Sorkin JD, Andres R. Fasting respiratory exchange ratio and resting metabolic rate as predictors of weight gain: the Baltimore Longitudinal Study on Aging. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1992;16:667–674.

- Sergeyev V, Broberger C, Hökfelt T. Effect of LPS administration on the expression of POMC, NPY, galanin, CART and MCH mRNAs in the rat hypothalamus. *Brain Res Mol Brain Res*. 2001 Jun 20;90(2):93-100.
- Shekhar C. Hidden Hunger: addressing micronutrient deficiencies using improved crop varieties. *Chem Biol*. 2013 Nov 21;20(11):1305-6.
- So M, Gaidhu MP, Maghdoori B, Ceddia RB. Analysis of time-dependent adaptations in whole-body energy balance in obesity induced by high-fat diet in rats. *Lipids Health Dis*. 2011; 10:99.
- Solon C, Franci D, Souza LMI, Romanatto T, Roman ER, Arruda A, Torsoni A, Carneiro EM, Velloso L. Taurine enhances the anorexigenic effects of insulin in the hypothalamus of rats. *Amino Acids*. 2012; 42(6):2403-10.
- Sturman JA. Taurine in development. *J Nutr*. 1988; 118(10):1169-76.
- Sutton GM, Centanni AV, Butler AA. Protein malnutrition during pregnancy in C57BL/6J mice results in offspring with altered circadian physiology before obesity. *Endocrinology* 2010; 151: 1570–1580.
- Tang C, Marchand K, Lam L, Lux-Lantos V, Thyssen SM, Guo J, Giacca A, Arany E. Maternal taurine supplementation in rats partially prevents the adverse effects of early-life protein deprivation on β -cell function and insulin sensitivity. *Reproduction*. 2013 May 21;145(6):609-20
- Torsoni MA, Carneiro EM, de Carvalho-Filho MA, Saad MJ, Velloso LA. Molecular and functional resistance to insulin in hypothalamus of rats exposed to cold. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003 Jul;285(1):E216-23.
- Tsai WC, Bhattacharyya N, Han LY, Hanover JA, Rechler MM. Insulin inhibition of transcription stimulated by the forkhead protein Foxo1 is not solely due to nuclear exclusion. *Endocrinology* 2003; 144: 5615–5622.
- 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.
- Vettorazzi JF, Ribeiro RA, Santos-Silva JC, Borck PC, Batista TM, Nardelli TR, Boschero AC, Carneiro EM. Taurine supplementation increases KATP channel protein content, improving Ca²⁺ handling and insulin secretion in islets from malnourished mice fed on a high-fat diet. *Amino Acids*. 2014 May 28.
- Victora CG, Adair L, Fall C, Hallal PC, Martorell R, Richter L, Sachdev HS. Maternal and child undernutrition: consequences for adult health and human capital. *Lancet* 2008; 371:340–357.

- Zabolotny JM, Kim YB, Welsh LA, Kershaw EE, Neel BG, Kahn BB. Protein-tyrosine phosphatase 1B expression is induced by inflammation in vivo. *J Biol Chem* 2008; 283: 14230–14241.
- Zhang L, Nguyen AD, Lee IC, Yulyaningsih E, Riepler SJ, Stehrer B, Enriquez RF, Lin S, Shi YC, Baldock PA, Sainsbury A, Herzog H. NPY modulates PYY function in the regulation of energy balance and glucose homeostasis. *Diabetes Obes Metab*. 2012; 14(8):727-736.
- Ziotopoulou M, Mantzoros CS, Hileman SM, Flier JS. Differential expression of hypothalamic neuropeptides in the early phase of diet-induced obesity in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000; 279(4):E838-45.
- Zurlo F, Lillioja S, Esposito-Del Puente A, Nyomba BL, Raz I, Saad MF, Swinburn BA, Knowler WC, Bogardus C, Ravussin E. Low ratio of fat to carbohydrate oxidation as predictor of weight gain: study of 24-h RQ. *Am J Physiology*. 1990; 259:E650–E657.
- Weir JB. New methods for calculating metabolic rate with special reference to protein metabolism. 1949. *Nutrition*. 1990; 6(3):213-21.
- Whiteman EL, Cho H e Birnbaum MJ. Role of Akt/protein kinase B in metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2002; 13:444-51.
- You JS, Zhao X, Kim SH, Chang KJ. Positive correlation between serum taurine and adiponectin levels in high-fat diet-induced obesity rats. *Adv Exp Med Biol*. 2013; 776:105-11.
- Youngren JF. Regulation of insulin receptor function. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64: 873-91.
- Yu Y, South T, Wang Q, Huang XF. Differential expression of hypothalamic CART mRNA in response to body weight change following different dietary interventions. *Neurochem Int*. 2008 Jun;52(8):1422-30.

14. ANEXOS

14. ANEXO 1 – Comitê de ética



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Análise dos mecanismos moleculares envolvidos na sinalização da insulina no hipotálamo e sua relação com o controle do metabolismo em animais submetidos à restrição protéica e alimentados com dieta hiperlipídica" (protocolo nº 2826-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro / Rafael Ludemann Camargo, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 10 de dezembro de 2012.

Campinas, 10 de dezembro de 2012.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>

14. ANEXO 2 – Declaração

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha tese de Doutorado intitulada,
Suplementação de Taurina em animais desnutridos obesos: Análise dos mecanismos moleculares da ação hipotalâmica da insulina e leptina e repercussões no metabolismo energético:

() não se enquadra no § 4º do Artigo 1º da Informação CCPG 002/13, 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. No. 2826-1, 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.*

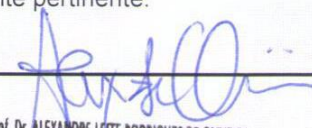

Aluno: Rafael Ludemnn Camargo


Orientador: Everardo Magalhães Carneiro

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura

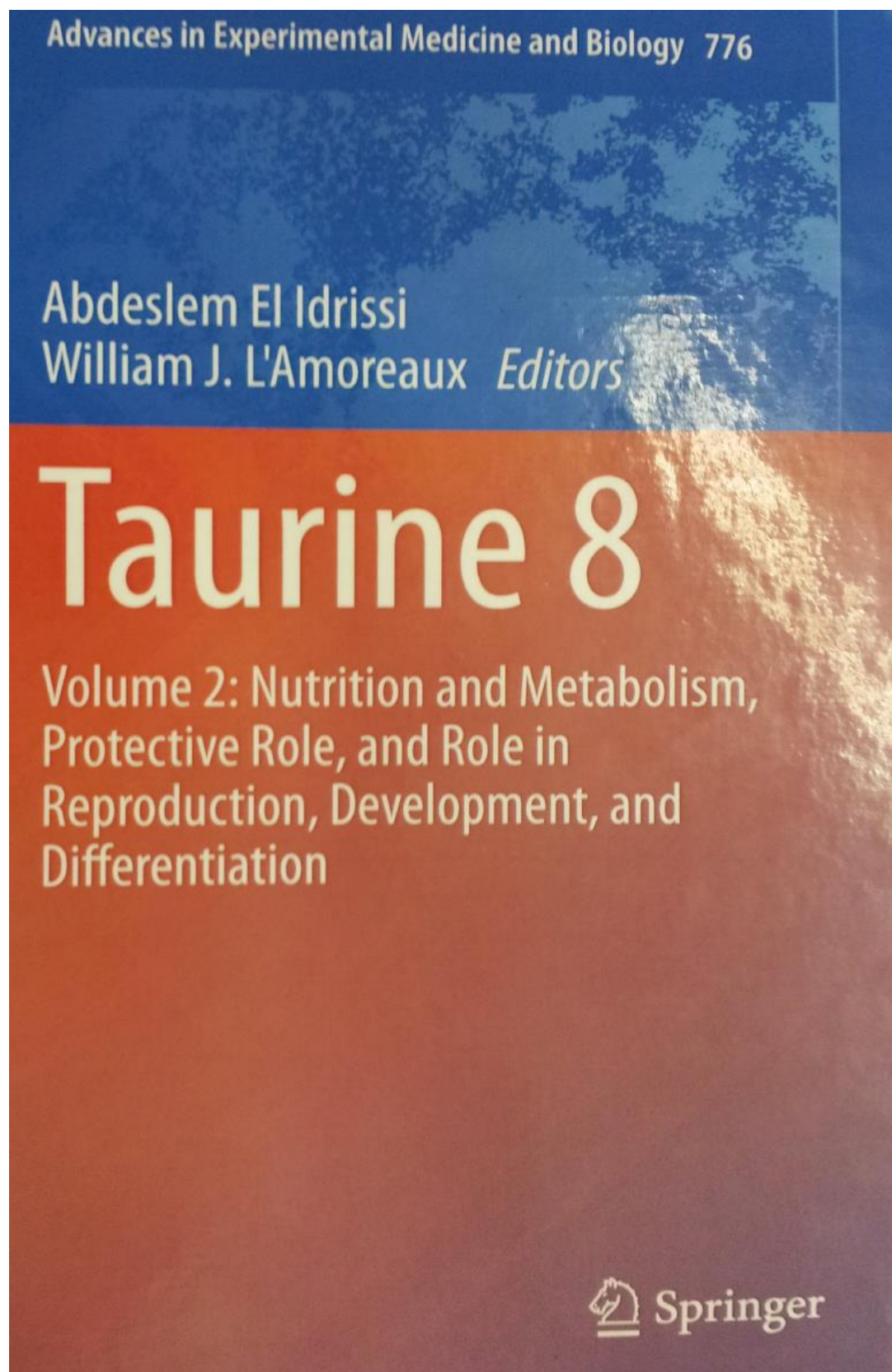

Prof. Dr. ALEXANDRE LEITE RODRIGUES DE OLIVEIRA
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura

14. ANEXO 3 – Comprovante artigo publicado – Taurina



14. ANEXO 3 – Comprovante artigo publicado – Taurina

Chapter 10

Effects of Taurine Supplementation Upon Food Intake and Central Insulin Signaling in Malnourished Mice Fed on a High-Fat Diet

Rafael L. Camargo, Thiago M. Batista, Rosane A. Ribeiro, Lício A. Velloso, Antônio C. Boschero, and Everardo M. Carneiro

Abstract Feeding behavior is a major determinant of body composition, adiposity, and glucose homeostasis. Both obesity and malnutrition are risk factors for the metabolic syndrome and are associated with altered food intake. Here we assessed the effects of taurine (TAU) supplementation upon adiposity, food intake, and central insulin signaling in malnourished mice fed on a high-fat diet (HFD). Weaned male C57BL/6 mice were fed a control (14% protein-C) or a protein-restricted (6% protein-R) diet. After 6 weeks, both groups received or not HFD for 8 weeks (CH and RH). Half of the HFD groups were supplemented with 5% TAU (CHT and RHT). Both HFD groups were overweight and showed increased perigonadal and retroperitoneal fat pads. TAU supplementation attenuated obesity in CHT but not in RHT mice. HFD induced hypercholesterolemia and glucose intolerance, although only CH group presented fasting hyperglycemia. TAU supplementation also improved glucose homeostasis only in CHT mice. Western blot analysis showed a reduction of 55% in CH hypothalamic content of phosphorylated IRS-1 (pIRS-1) at basal condition compared with C. TAU treatment increased 35% Akt phosphorylation levels in CHT without modification in RHT hypothalamus. However, TAU supplementation did not alter hypothalamic pIRS-1 amount. CH and RH mice presented increased calorie intake that was normalized in CHT but not in RHT. In conclusion, mice fed on an HFD developed obesity, hypercholesterolemia, glucose intolerance, and

R.L. Camargo (✉) • T.M. Batista • A.C. Boschero • E.M. Carneiro
Departamento de Biologia Funcional e Estrutural, Instituto de Biologia,
Universidade Estadual de Campinas, SP, Brazil
e-mail: rlcamargo.bio@gmail.com

R.A. Ribeiro
Núcleo em Ecologia e Desenvolvimento Sócio-Ambiental de Macaé (NUPEM),
Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Macaé, RJ, Brazil

L.A. Velloso
Departamento de Clínica Médicas, Faculdade de Ciências Médicas,
Universidade Estadual de Campinas, SP, Brazil

14. ANEXO 3 – Comprovante artigo publicado – Taurina

 NCBI Resources ☒ How To ☒

 PubMed

US National Library of Medicine
National Institutes of Health

Display Settings: ☒ Abstract Send to: ☒

[Adv Exp Med Biol](#), 2013;776:93-103. doi: 10.1007/978-1-4614-6093-0_10.

Effects of taurine supplementation upon food intake and central insulin signaling in malnourished mice fed on a high-fat diet.

[Camarqo RL¹](#), [Batista TM](#), [Ribeiro RA](#), [Velloso LA](#), [Boschero AC](#), [Carneiro EM](#).

 **Author information**

Abstract

Feeding behavior is a major determinant of body composition, adiposity, and glucose homeostasis. Both obesity and malnutrition are risk factors for the metabolic syndrome and are associated with altered food intake. Here we assessed the effects of taurine (TAU) supplementation upon adiposity, food intake, and central insulin signaling in malnourished mice fed on a high-fat diet (HFD). Weaned male C57BL/6 mice were fed a control (14% protein-C) or a protein-restricted (6% protein-R) diet. After 6 weeks, both groups received or not HFD for 8 weeks (CH and RH). Half of the HFD groups were supplemented with 5% TAU (CHT and RHT). Both HFD groups were overweight and showed increased perigonadal and retroperitoneal fat pads. TAU supplementation attenuated obesity in CHT but not in RHT mice. HFD induced hypercholesterolemia and glucose intolerance, although only CH group presented fasting hyperglycemia. TAU supplementation also improved glucose homeostasis only in CHT mice. Western blot analysis showed a reduction of 55% in CH hypothalamic content of phosphorylated IRS-1 (pIRS-1) at basal condition compared with C. TAU treatment increased 35% Akt phosphorylation levels in CHT without modification in RHT hypothalamus. However, TAU supplementation did not alter hypothalamic pIRS-1 amount. CH and RH mice presented increased calorie intake that was normalized in CHT but not in RHT. In conclusion, mice fed on an HFD developed obesity, hypercholesterolemia, glucose intolerance, and increased calorie intake. TAU promoted increased hypothalamic insulin action only in CH mice which was linked to prevention of overfeeding, obesity, and glucose intolerance. Protein-restriction promoted metabolic damages that were not prevented by TAU supplementation.

PMID: 23392874 [PubMed - indexed for MEDLINE]

14. ANEXO 4 –Submissão artigo 2

17/5/2014

Gmail - Neuroendocrinology Submission Received



Rafael Camargo <ricamargo.bio@gmail.com>

Neuroendocrinology Submission Received

1 mensagem

editor@nen-edinburgh.org <editor@nen-edinburgh.org>
Para: ricamargo.bio@gmail.com

1 de abril de 2014 15:15

Dear Mr. Rafael Camargo:

Thank you for submitting your manuscript entitled "TAURINE SUPPLEMENTATION PRESERVES HYPOTHALAMIC LEPTIN ACTION IN NORMAL AND PROTEIN-RESTRICTED MICE FED ON A HIGH-FAT DIET" to "Neuroendocrinology"; the submission number is: 2431. Your submission will now be checked by the editorial office, and you will receive a confirmation mail from the editorial office soon. This step will also activate your personal user-id and password, enabling you to login to the system to check the status of your manuscript.

If you have any queries please send an email to: editor@nen-edinburgh.org.

With kind regards,

Editorial Office