

ANA PAULA GAMEIRO CAPPELLI

“Mecanismos moleculares envolvidos na modulação redox da secreção e ação da insulina em ilhotas pancreáticas, fígado e músculo esquelético de camundongos desnutridos submetidos à obesidade experimental”

CAMPINAS

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

ANA PAULA GAMEIRO CAPPELLI

“Mecanismos moleculares envolvidos na modulação redox da secreção e ação da insulina em ilhotas pancreáticas, fígado e músculo esquelético de camundongos desnutridos submetidos à obesidade experimental”

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Ana Paula Gameiro Cappelli
e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Orientador: Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro

CAMPINAS,
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARA JANAINA DE OLIVEIRA – CRB8/6972
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

C173m	<p>Cappelli, Ana Paula Gameiro, 1984- Mecanismos moleculares envolvidos na modulação redox da secreção e ação da insulina em ilhotas pancreáticas, fígado e músculo esquelético de camundongos desnutridos submetidos à obesidade experimental / Ana Paula Gameiro Cappelli. – Campinas, SP: [s.n.], 2013.</p> <p>Orientador: Everardo Magalhães Carneiro. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Desnutrição. 2. Obesidade. 3. Taurina. 4. Reação de oxidação-redução. 5. Peróxido de hidrogênio. I. Carneiro, Everardo Magalhães, 1955-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p>
-------	---

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Molecular mechanisms involved in redox modulation of insulin action and secretion in pancreatic islets, liver and skeletal muscle of undernourished mice undergoing experimental obesity

Palavras-chave em Inglês:

Malnutrition

Obesity

Taurine

Oxidation-reduction reaction

Hydrogen peroxide

Área de concentração: Fisiologia

Titulação: Doutora em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Everardo Magalhães Carneiro [Orientador]

Leonardo dos Reis Silveira

Maria Lúcia Bonfleur

Angelina Zanesco

Fernando Rodrigues de Moraes Abdulkader

Data da defesa: 12-04-2013

Programa de Pós Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 12 de abril de 2013

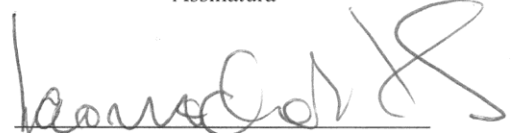
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro (Orientador)



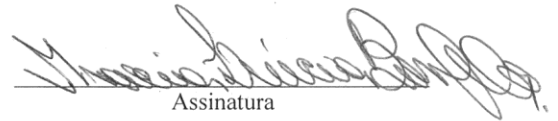
Assinatura

Prof. Dr. Leonardo dos Reis Silveira



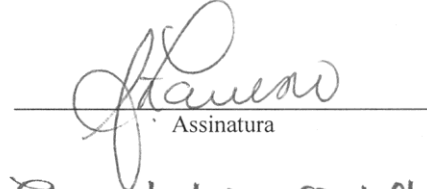
Assinatura

Profa. Dra. Maria Lucia Bonfleur



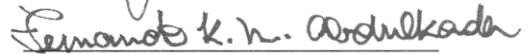
Assinatura

Profa. Dra. Angelina Zanesco



Assinatura

Prof. Dr. Fernando Rodrigues de Moraes Abdulkader



Assinatura

Profa. Dra. Ana Paula Couto Davel

Assinatura

Prof. Dr. Carlos Amilcar Parada

Assinatura

Profa. Dra. Silvana Auxiliadora Bordin da Silva

Assinatura

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, por toda dedicação e paciência.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por me dar saúde e proteção para que eu pudesse desenvolver esse trabalho da melhor forma possível.

A minha mãe que, do jeito dela, me proibiu de desistir, me lembrando sempre a importância desse título.

Ao meu pai pelas palavras sábias nas horas que eu estava mais desesperada e pelo incentivo para que eu não desistisse no meio.

Ao meu irmão que apesar de não dizer, eu sabia que se orgulhava de mim por eu estar em busca deste título e isso me incentivava.

Ao Tácio Gilbert Caetano, meu namorado, que me aguentou e ficou ao meu lado até nos piores momentos.

Ao Prof. Everardo Magalhães Carneiro por abrir as portas do laboratório para mim e por ter confiado e acreditado que eu podia crescer e me tornar uma pessoa capaz de adquirir o título de doutora.

Ao Prof. Antônio Carlos Boschero e Prof^a Helena C. de Oliveira pela disposição em ajudar e exemplo de dedicação.

Ao Prof. Dr. Claudio Cesar Zoppi que teve papel fundamental para o desenvolvimento do meu doutorado, me ajudando, não só profissionalmente, mas como amigo.

A Dra Helena Cristina Barbosa Sampaio pela amizade e pela contribuição para a melhora do meu trabalho.

Aos meus companheiro(a)s e amigo(a)s de trabalho que durante todo o doutorado estiveram ao meu lado e sempre estiveram dispostos a me ajudar. Obrigada pela paciência e por terem acreditado em mim.

Aos funcionários do departamento de Biologia Estrutural e Funcional que de alguma forma contribuíram para o andamento do trabalho.

A FAPESP pela concessão da bolsa de estudo que sem ela não seria possível toda a dedicação necessária para um bom trabalho.

“História, nossas histórias
Dias de luta, dias de glória...”
Charlie Brown Jr.)

Resumo

Neste trabalho estudamos o efeito da desnutrição, obesidade e da suplementação com taurina na sensibilidade à insulina nos tecidos muscular e hepático, e sobre a secreção de insulina. Foram utilizados camundongos C57BL6 machos controle (C), controle + dieta hiperlipídica (CH) e controle + dieta hiperlipídica + taurina (CHT), restrito (R), restrito + hiperlipídica (RH) e restrito + hiperlipídica + taurina (RHT). Os animais receberam dieta entre os 21 e 105 dias de vida. Após esse período os animais receberam uma aplicação intraperitoneal de salina ou glicose (2g/Kg) e foram sacrificados. Medimos o conteúdo proteico da SOD1, GPx1, CAT, p-IR, p-AKT, p-PTP1B e p-PTEN no fígado e músculo. Verificamos a secreção de insulina em ilhotas expostas a alta concentração de glicose (16,7mM) + DPI (inibidor da NADPH oxidase).

Nossos resultados mostraram que a taurina foi eficiente em melhorar a sinalização da insulina no fígado, na presença ou não de uma carga de glicose e mostraram, também, uma possível associação entre o efeito observado no conteúdo da p-PTEN sobre a atividade da AKT nos grupos CHT e RHT, porém sem alteração no teste de sensibilidade à insulina. Nossos resultados sugerem que a taurina atua na modulação redox da PTEN, favorecendo a sinalização da insulina no tecido hepático tanto no grupo CHT quanto no grupo RHT. Em adição, notamos que a suplementação com taurina aumenta o conteúdo proteico das enzimas antioxidantes no tecido muscular, no grupo RHT. A suplementação com taurina, apesar de não ter apresentado diferença estatística, parece atenuar o efeito causado pela dieta hiperlipídica no grupo CHT sobre a sinalização da insulina no músculo, porém sem efeito sobre o grupo RHT.

Dessa maneira, concluímos que a taurina no grupo CH melhora a sinalização da insulina, no fígado e músculo, e a tolerância à glicose, sem alteração da secreção de insulina. No grupo RH, a taurina melhora a sinalização da insulina no fígado, mas não altera a sinalização da insulina no músculo e melhora parcialmente, sem diferença estatística, a tolerância à glicose, sem alteração da secreção de insulina. Assim, a suplementação com taurina poderia ser utilizada como terapia complementar no tratamento da resistência à insulina e diabetes tipo 2, no entanto, essa terapia seria mais eficiente em indivíduos que receberam dieta normoproteica e hiperlipídica do que em indivíduos que receberam dieta hipoproteica e hiperlipídica.

Abstract

We studied the effect of malnutrition, obesity and taurine supplementation on insulin sensitivity in liver and muscle, and on insulin secretion. Male mice C57BL6 control (C), control + fat diet (CH) and control + fat diet + taurine (CHT), restricted (R), + restricted diet (HR) and restricted + fat diet + taurine (RHT) were treated between 21 and 105 days old. After this period the animals received intraperitoneal saline or glucose (2g/Kg) and were sacrificed. We measured the protein content of SOD1, GPx1, CAT, p-IR, p-AKT, p-PTEN and p-PTP1B in liver and muscle. We also measured insulin secretion in islets exposed to high glucose concentration (16,7mM) + DPI (inhibitor of NADPH oxidase).

Our results showed that taurine was effective in improving insulin signaling in the liver, when stimulated or not with a glucose load, and also showed a possible association between the content of p-PTEN on the activity of AKT in CHT and RHT groups, but no change in insulin sensitivity test. Our results suggest that taurine has a role on the redox PTEN modulation, favoring the signaling of insulin in the hepatic tissue in both CHT and RHT groups. In addition, we noted that taurine supplementation increases antioxidant enzyme protein content in muscle in the RHT group. The taurine supplementation, although not statistically different, seems to attenuate the effect caused by high fat diet in the CHT groups on the insulin signaling in muscle, but no effects on RHT group were reported.

Thus, we concluded that taurine in CH group improves insulin signaling in liver and muscle, as well as glucose tolerance, without alteration in insulin secretion. In RH group, taurine improves insulin signaling in the liver, but does not alter insulin signaling in muscle and improves partly glucose tolerance, without alteration in insulin secretion. Thus, supplementation with taurine could be used as adjunctive therapy in the treatment of insulin resistance and type 2 diabetes, however, this therapy would be more efficient in subjects who received normal and hyperlipidic diets than in subjects who received high-fat and low-protein diets.

Lista de abreviaturas

ADP – Adenosina difosfato
AKT - Protein kinase B
AMPC - Adenosina monofosfato cíclico
ANOVA – Análise de variância
Arg – Arginina
ATP – Trifosfato de adenosina
Ca²⁺ - Íon cálcio
[Ca²⁺]_i – Concentração intracelular de cálcio
CAT - Catalase
CO₂ – Dióxido de carbono
Cys – Cisteína
DAG – Diacilglicerol
DPI – Difenileneiodônio (inibidor da NADPH oxidase)
FADH₂ – Flavina adenina dinucleotídeo
GDP - Guanosina difosfato
GLUT2 – Transportador de glicose 2
GLUT4 – Transportador de glicose 4
GPx – Glutaciona peroxidase
GR – Glutaciona redutase
GSH – Glutaciona
GSIS – Secreção de insulina estimulada por glicose
GSSG – Glutaciona dissulfeto
H₂O – Água
H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio
HFD- Dieta hiperlipídica
HO⁻ - Ânion hidroxila
HO[•] - Radical hidroxila
IP₃ - Inositol 1, 4, 5 trifosfato
IR – Receptor de insulina

K_{ATP} – Canal de potássio dependente de ATP
LPL - Lipoproteína lipase
MAPK – “*Mitogen-Activated Protein Kinases*”
mTOR – “*Mammalian target of rapamycin*”
NADH – Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
 NO^{\bullet} - Óxido nítrico
NOX - NADPH oxidase
NRF2 α - Fator respiratório nuclear 2 α
 $O_2^{\bullet -}$ - Ânion superóxido
 O_2 – Oxigênio molecular
 $O_2^{\bullet -}$ - Radical ânion superóxido
PDK - Quinase dependente de fosfoinositol
PDX-1 - Fator de transcrição pancreático e duodenal
PIP2 - Fosfatidilinositol (4-5) bifosfato
PKA – Proteína quinase A
PKC - Proteína quinase C
PLC- Fosfolipase C
PP2A – Proteína fosfatase 2
PTEN – Fosfatase e homólogo a tensina
PTP - Proteína tirosina fosfatase
PTP1B - Proteína tirosina fosfatase 1B
ROS- Espécies reativas de oxigênio
RQ- Coeficiente respiratório
-SH - Grupos sulfidrilas
SOD – Superóxido dismutase
SOD1 - Superóxido dismutase 1
SOD2 - Superóxido dismutase 2
TauCl - Taurina cloramina
ERNs - Espécies reativas de nitrogênio

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1. Desnutrição, estresse oxidativo e resistência à insulina.....	14
1.2. Obesidade, estresse oxidativo e resistência à insulina.....	15
1.3. Vias de produção das ROS e defesa antioxidante	17
<i>1.3.1. Produção de ROS no citosol.....</i>	<i>17</i>
<i>1.3.2. Produção mitocondrial de ROS.....</i>	<i>19</i>
<i>1.3.3. Sistemas de defesa antioxidantes.....</i>	<i>20</i>
<i>1.3.4. Estresse oxidativo, células-beta pancreática e diabetes.....</i>	<i>21</i>
1.4. Taurina.....	22
1.5. Secreção de insulina	23
1.6. Modulação redox da sinalização e secreção da insulina	24
2. OBJETIVOS.....	29
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1 Caracterização do modelo experimental.....	32
<i>3.1.1. Animais.....</i>	<i>32</i>
<i>3.1.2. Peso corpóreo.....</i>	<i>34</i>
<i>3.1.3. Consumo alimentar</i>	<i>34</i>
<i>3.1.4. Respirimetria.....</i>	<i>34</i>
3.2. Procedimentos experimentais	34
<i>3.2.1. Avaliação biométrica.....</i>	<i>34</i>
<i>3.2.2. Avaliação do Estado Nutricional.....</i>	<i>34</i>
<i>3.2.3. Teste de Tolerância à glicose (ipGTT) e à insulina (ipITT)</i>	<i>35</i>
<i>3.2.4. Glicemia.....</i>	<i>35</i>
<i>3.2.5. Insulinemia.....</i>	<i>35</i>
<i>3.2.6. Preparação das amostras de tecido para determinação da produção de H₂O₂ e da concentração GSH.....</i>	<i>36</i>
<i>3.2.7. Determinação da produção de H₂O₂</i>	<i>36</i>
<i>3.2.8. Determinação da concentração GSH.....</i>	<i>36</i>
<i>3.2.9. Quantificação do RNA mensageiro (mRNA) por Real-time RT-PCR.....</i>	<i>36</i>

3.2.10. <i>Western Blotting</i>	37
3.2.11. <i>Isolamento de ilhotas</i>	38
3.2.12. <i>Secreção Estática de Insulina</i>	38
3.2.13. <i>Análise Estatística</i>	39
4. RESULTADOS	41
4.1. Caracterização do modelo experimental	42
4.1.1. <i>Parâmetros de Crescimento</i>	42
4.1.2. <i>Coefficiente respiratório e Gasto energético</i>	43
4.1.3. <i>Teste intraperitoneal de tolerância à glicose (ipGTT)</i>	48
4.1.4. <i>Teste intraperitoneal de tolerância à insulina (ipITT) e kITT</i>	49
4.1.5. <i>Efeitos de uma carga de glicose intraperitoneal na modulação redox da sensibilidade à insulina</i>	50
4.2. Fígado	53
4.2.1. <i>Verificação do estado redox - Concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e Dosagem da glutathiona reduzida (GSH) em fígado - Após injeção intraperitoneal de salina ou glicose 2 g/Kg de peso do animal</i>	53
4.3. Músculo	58
4.3.1. <i>Verificação do estado redox - Concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e Dosagem da glutathiona reduzida (GSH) em músculo - Após injeção intraperitoneal de salina ou glicose 2g /Kg de peso do animal</i>	58
4.4. Ilhota pancreática	62
4.4.1. <i>Verificação da modulação redox - Secreção de insulina</i>	62
5. DISCUSSÃO	65
5.1. Parâmetros gerais	66
5.1.1. <i>Tolerância à glicose e sensibilidade à insulina</i>	69
5.2. Fígado	70
5.2.1. <i>Estado redox e sinalização hepática da insulina</i>	70
5.3. Músculo	73
5.3.1. <i>Estado redox e sinalização da insulina no músculo esquelético</i>	73
5.4. Ilhota	76
5.4.1. <i>Secreção de insulina na ilhota pancreática</i>	76

6. CONCLUSÃO.....	81
7. REFERÊNCIAS.....	83
8. ANEXOS I.....	95
9. ANEXOS II.....	97

1. INTRODUÇÃO

1.1. Desnutrição, estresse oxidativo, secreção de insulina e resistência à insulina

Em função de um grande número de pessoas na Europa terem sido afetadas pela fome no pós-guerra, a desnutrição tornou-se alvo de estudos epidemiológicos. Após estudos realizados por Willians *et al.* (1933) a desnutrição passou a ser caracterizada e denominada como marasmo (desnutrição calórico-proteica causada principalmente por privação de carboidratos) e Kwashiorkor (desnutrição proteica causada por alimentação deficiente em proteínas). As duas definições podem ainda se somar no Kwashiorkor marasmático, o qual é encontrado com maior frequência nos casos clínicos, causado por alimentação deficiente em calorias e pobre em proteínas (Golden, 2002).

Ao longo de décadas, vários estudos mostram uma correlação positiva entre baixo peso ao nascer e o desenvolvimento de resistência à insulina e diabetes tipo 2 na vida adulta (Rao, 1988; Hales & Barker, 1992). Em 1992, Hales e Barker postularam a hipótese do fenótipo econômico que ativa uma reprogramação “*in utero*”, mediante restrição nutricional durante a gestação, levando ao retardo no desenvolvimento de órgãos como rins, músculo, pâncreas endócrino, entre outros, em favorecimento de órgãos vitais como o cérebro. Essas adaptações poderiam repercutir, na vida adulta, no desenvolvimento de enfermidades renais, hipertensão arterial, redução na massa de células-beta e resistência à insulina.

Estudos realizados em nosso laboratório mostram que animais submetidos à restrição proteica (R) possuem menor resposta das ilhotas de Langerhans à maioria dos agentes insulíntricos (Carneiro *et al.*, 1995; Filiputti *et al.*, 2008). Theys *et al.* (2009a, b) mostraram alterações no estado redox, aumento na expressão da UCP2 e menor capacidade de fosforilação oxidativa em ilhotas de ratos submetidos à restrição proteica.

Em adição, a desnutrição induz efeitos diversos ao longo da vida em relação à sensibilidade à insulina. Em curto prazo, Reis *et al.* (1997) observaram, que ratos desnutridos apresentam aumento da sensibilidade à insulina e aumento da tolerância à glicose nos tecidos periféricos. Por outro lado, em longo prazo, a desnutrição, na fase inicial da vida, tem efeitos opostos, principalmente quando grande quantidade de nutrientes são disponibilizados na fase adulta (Ozanne *et al.*, 2000 ; Bol *et al.*, 2009). Ratos adultos submetidos à restrição proteica precoce, ou descendente de mães desnutridas desenvolvem

hiperinsulinemia e resistência periférica (Huang *et al.*, 2004; Fernandez-Twinn *et al.*, 2005; Martin-Gronert *et al.*, 2008; Kappeler *et al.*, 2009). Uma das possíveis explicações para as alterações observadas na homeostasia da glicose é a de que animais desnutridos teriam maior produção de ROS e/ou menor capacidade antioxidante. Neste sentido, dados de nosso laboratório demonstraram que ilhotas pancreáticas de ratos desnutridos apresentam maior susceptibilidade ao estresse oxidativo, e o desbalanço redox alterou a funcionalidade das células-beta, reduzindo a secreção de insulina (Cappelli APG, enviado para publicação). O estresse oxidativo tem sido mostrado no músculo esquelético de modelos de desnutrição proteica (Zoppi *et al.*, 2010). Apesar de resultados conflitantes, estudos mostram que a atividade das enzimas antioxidantes varia de acordo com o conteúdo proteico da dieta, e o aumento da peroxidação lipídica foi diretamente relacionada com a diminuição da capacidade de remoção dessas ROS (Huang & Fwu, 1993; Park *et al.*, 2003; Zoppi *et al.*, 2010). Foi observada também nesses estudos, uma redução da expressão gênica e do conteúdo protéico da glutathione-S-transferase em músculo de ratos desnutridos (Zhu *et al.*, 2006). Estes efeitos estão de acordo com a redução da capacidade da GPx em varrer o H₂O₂ (Oumi *et al.*, 2001). Huang e colaboradores (1993) investigaram os efeitos de diferentes níveis de proteína na dieta sobre a atividade de enzimas antioxidante. Para isso eles utilizaram quatro grupos de ratos Long-Evans machos, que foram alimentados com dietas 6, 8, 12 ou 20% de proteína, durante 6 semanas, após desmame. As atividades das enzimas antioxidantes no fígado foram reduzidas significativamente quando o nível de proteína na dieta diminuiu de 20-12% e depois a 8%. Assim, o grau de deficiência de proteína afeta a atividade das enzimas antioxidantes.

1.2. Obesidade, estresse oxidativo e resistência à insulina

A obesidade é um problema de saúde pública, principalmente em países desenvolvidos. No entanto, atualmente, a obesidade passou a ser um problema também em países em desenvolvimento, onde a desnutrição prevalecia em décadas passadas (Youfa *et al.*, 2002). Estudos realizados por Hales e Barker (1992) indicam que indivíduos que passaram por má nutrição durante a gestação são mais susceptíveis a obesidade na fase adulta. Essa hipótese poderia explicar o aumento de prevalência de obesidade, doenças

cardiovasculares, resistência à insulina e diabetes em países desenvolvidos e em desenvolvimento (Fagot-Campagna *et al.*, 2000 ; Fleischman *et al.*, 2009).

O Diabetes Mellitus tipo 2 (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-beta pancreáticas. A progressão da resistência à insulina leva à disfunção e morte das células-beta com consequente redução na massa desse tipo de células (Kahn *et al.*, 2006).

Diversos mecanismos já foram propostos para explicar o desenvolvimento da resistência à insulina e consequente declínio funcional das células-beta. Dentre eles, a ativação crônica de processos inflamatórios parece ter um papel-chave em correlacionar a expansão da massa adiposa, principalmente visceral, com o desenvolvimento da resistência à insulina em seus tecidos-alvo (Schenk *et al.*, 2008). O aumento na concentração de citocinas inflamatórias em resposta à obesidade está diretamente relacionado com o aumento na produção de ROS, instalação de estresse oxidativo e desenvolvimento da resistência à insulina. Em adição, o aumento da disponibilidade de nutrientes (glicose e ácidos graxos) disponibiliza maiores quantidades de acetil CoA e consequentemente coenzimas reduzidas NADH e FADH₂ aumentando o fluxo de elétrons na cadeia respiratória favorecendo a produção de ROS (Rodriguez-Rodriguez *et al.*, 2009). Por outro lado, a produção de ROS estimula a expressão de citocinas pró-inflamatórias nos tecidos (Kelly *et al.*, 2006), completando um círculo e aumentando o dano oxidativo.

Tanti & Jager (2009) descrevem os mecanismos celulares alterados por citocinas inflamatórias que resultam no aumento da fosforilação do substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1) em resíduos de serina induzindo resistência a insulina. Em adição, diversos trabalhos relacionam o acúmulo de gordura corporal como desencadeador da resistência à insulina. O aumento na concentração de intermediários da oxidação de ácidos graxos em músculo e fígado está relacionado ao aumento na produção de ROS e redução na cascata de sinalização da insulina (Wei *et al.*, 2008; Gual *et al.*, 2005, Amati *et al.*, 2011). Neste sentido, foi demonstrado que o aumento na produção de ROS e a instalação do estresse oxidativo precedem o desenvolvimento da resistência periférica a insulina no fígado e tecido adiposo de ratos alimentados com dieta hiperlipídica (Matsuzawa-Nagata *et al.*, 2008). Portanto, evidências que mostram alterações do estado redox, induzidas pelo

acúmulo de gordura, apontam para um papel iniciador do estresse oxidativo no desenvolvimento da resistência a insulina.

1.3. Vias de produção das ROS e defesa antioxidante

1.3.1. Produção de ROS no citosol

Newsholme e colaboradores (2007) revisaram as vias de produção de espécies reativas de oxigênio nas células-beta. No citosol essa produção ocorre principalmente pela enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase.

O sistema NADPH oxidase (NOX), é um complexo enzimático que catalisa a redução do oxigênio ao radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$) (figura 1). A família das NOX, uma família de oxidases dependentes de NADPH, é conhecida por ser amplamente distribuída em várias células e tecidos. Seus membros compartilham alta homologia entre a subunidade catalítica da NOX de célula fagocíticas, o bem definido $gp91^{phox}$, também chamado de NOX2. Atualmente, dois destes homólogos, NOX1 e NOX2, foram identificados e caracterizados em células-beta pancreáticas. Em adição, foram identificados ainda homólogos da $p47^{phox}$ e da $p67^{phox}$, respectivamente chamados de NOXO1 e NOXA1, os quais devem interagir com o NOX1, nas células-beta pancreáticas (Newsholme *et al.* 2009).

Nas células-beta não estimuladas, este sistema enzimático é inativo e seus componentes permanecem dispersos no citosol e na membrana. O componente b558 é um flavocitocromo formado por duas subunidades, $gp91^{phox}$ e $p22^{phox}$, nesta condição, permanecem na membrana plasmática de células-beta pancreáticas. Os outros componentes do complexo NADPH ($p47^{phox}$, $p67^{phox}$, $p40^{phox}$) em condições basais se localizam no citosol. A estimulação das células-beta por nutrientes ou outros fatores promovem a fosforilação dos componentes citosólicos da $p47^{phox}$, $p67^{phox}$ e $p40^{phox}$, resultando em sua translocação para a membrana plasmática, onde interagem com $gp91^{phox}$ e $p22^{phox}$, ativando o complexo enzimático da NADPH oxidase (Graciano *et al.*, 2011).

Além desses componentes, duas proteínas G de baixo peso molecular, pequenas GTPases, integram o sistema NADPH oxidase, chamadas rac2 e rap1. A proteína rap1 mantém-se associada ao componente $p22^{phox}$ na membrana (Quinn e Gauss, 2004; Abo *et al.*, 1994; Bokoch e Diebold, 2002; Li *et al.*, 2012). No estado de repouso, a rac2 encontra-

se associada ao inibidor RhoGDI (inibidor da dissociação do GDP) na forma ligada ao GDP (guanosina difosfato); após a estimulação celular, a rac2 dissocia-se do RhoGDI, troca GDP por GTP e integra-se ao complexo NADPH oxidase (Bokoch *et al.*, 1994; Kreck *et al.*, 1996- Li *et al.*, 2012).

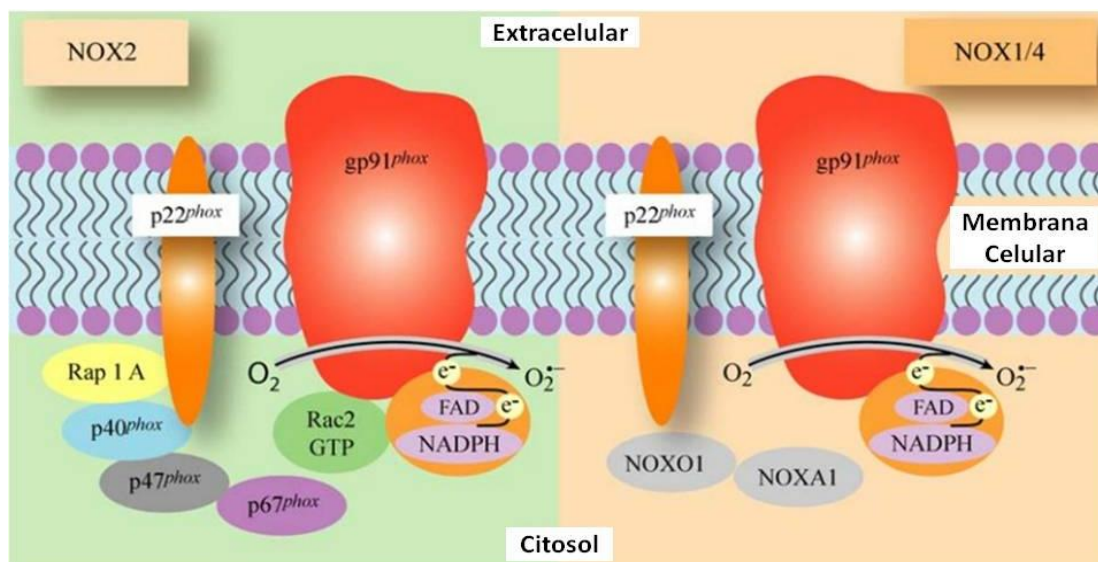


Figura 1. Isoformas da NADPHoxidase em células-beta pancreáticas em condição estimulada por nutrientes. (figura adaptada - Newsholme *et al.* 2009)

Embora, de uma forma geral, o excesso de ROS esteja associado a danos oxidativos, nas células-beta pancreáticas níveis fisiológicos destas espécies podem atuar na modulação do metabolismo, influxo de íons e controle transcricional e secreção da insulina (Newsholme *et al.* 2009; Morgan *et al.*, 2007; Pi *et al.*, 2007; Morgan *et al.*, 2009).

A importância da NOX na modulação da secreção de insulina estimulada por glicose (GSIS) foi demonstrada utilizando um inibidor farmacológico específico da NOX (DPI – difenileneiodônio). Como resultado, houve diminuição na produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), prejuízo no metabolismo da glicose e, conseqüentemente na secreção de insulina tanto estática quanto dinâmica (Imoto *et al.*, 2008; Newsholme *et al.* 2009; Morgan *et al.*, 2009). A inibição da NOX também reduz o influxo de Ca^{2+} intracelular induzido por glicose (Imoto *et al.*, 2008, Newsholme *et al.* 2009,).

O metabolismo da glicose parece estar relacionado à regulação da NOX através da ativação da PLC (Zawalich *et al.*, 2008; Newsholme *et al.* 2009) resultando em: formação

de DAG e IP3, e subsequente liberação de Ca^{2+} a partir de reservas intracelulares, que juntamente com DAG, pode levar a ativação da PKC, fosforilação e ativação de p47^{phox} e translocação da p47^{phox} para a membrana plasmática, seguido pela completa ativação do complexo NOX. A rápida geração de ânion superóxido (O_2^-) e de H_2O_2 deve mediar um aumento de Ca^{2+} citosólico (Morgan *et al.*, 2009, Newsholme *et al.* 2009) também elevando o metabolismo de glicose via ativação específica de enzimas sensíveis ao Ca^{2+} (especialmente as localizadas na mitocôndria), o que resulta na geração de fatores de acoplamento metabólicos de estímulo/secreção derivados da mitocôndria (como glutamato, citrato, NADPH e ROS) e amplificação da secreção de insulina (Newsholme *et al.* 2009).

1.3.2. Produção mitocondrial de ROS

A utilização da energia proveniente de nutrientes pelo processo de fosforilação oxidativa, acontece exclusivamente na presença de oxigênio. Embora o oxigênio seja um elemento vital para a sobrevivência dos organismos aeróbicos, uma pequena fração do seu consumo mitocondrial dá origem às espécies reativas de oxigênio (Vannucchi *et al.*, 1998).

Na cadeia respiratória, ocorre a redução tetravalente do oxigênio molecular, através da aquisição de 4 elétrons com conseqüente produção de 2 moléculas de água. Cerca de 2-5% do O_2 disponível nas mitocôndrias pode dar origem à formação de ROS (Halliwell & Gutteridge, 1999). A figura 2 mostra a transferência de elétrons pela cadeia respiratória evidenciando a produção de ROS nos complexos I e III.

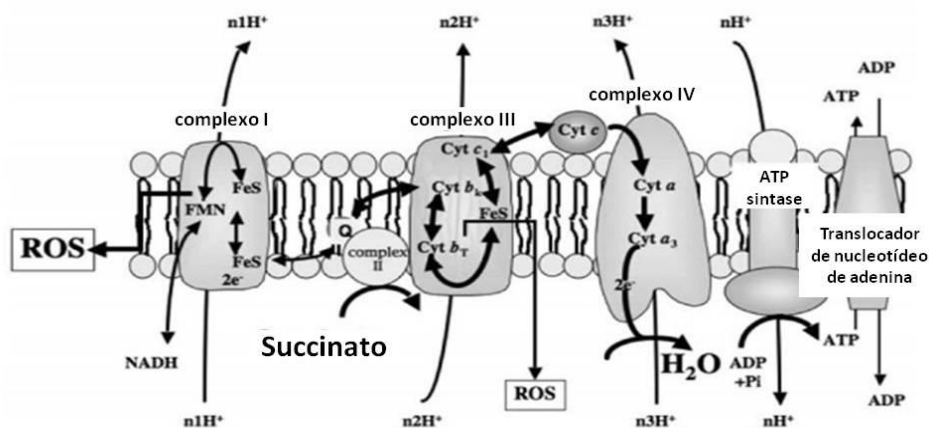
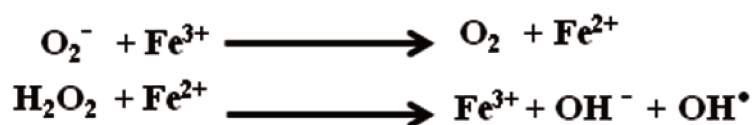


Figura2: Visão esquemática da transferência de elétrons e produção de ROS, nos complexos I e III, da cadeia respiratória. (figura adaptada- Bartandier C *et al.*, 2006)

Na cadeia respiratória, pode ocorrer escape de elétrons os quais são capturados por moléculas de oxigênio circulantes. Quando o oxigênio é reduzido univalentemente, transforma-se em O_2^- (ânion superóxido). Quando o O_2^- é reduzido por mais um elétron ocorre formação de H_2O_2 . A adição de mais um elétron ao H_2O_2 catalisado por um metal de transição, produz ânion hidroxila (HO^-) que é pouco reativo, e radical hidroxila (HO^\bullet) que constitui uma das espécies mais reativas que se conhece, segundo as reações de Fenton e Haber Weiss (demonstradas abaixo).

Reação de Fenton



Reação de Haber-Weiss



Outra fonte de O_2^- e, subsequentemente, H_2O_2 é a família NOX da NADPH oxidase (Peter *et al.*, 2011). O aumento de glicose na célula-beta ativa o fluxo de elétrons na cadeia respiratória, possibilitando um maior escape de elétrons e consequentemente, aumento da formação de O_2^- e H_2O_2 na mitocôndria. O aumento da formação dessas ROS foi demonstrado ser essencial na modulação da GSIS (Pi *et al.*, 2007, Leloup *et al.*, 2009, Morgan *et al.*, 2009).

1.3.3. Sistemas de defesa antioxidantes

Apesar do organismo produzir normalmente espécies reativas, estas são inativadas por mecanismos de defesas eficientes, a fim de combater a ação deletéria das ROS.

Para serem consideradas antioxidantes, as substâncias devem apresentar pelo menos uma das três propriedades: supressão da formação de radicais livres (por quelação de metais ou por inibição de enzimas geradoras de radicais livres), eliminação ou desativação de radicais livres com formação de um produto estável ou participação em processos de reparo de danos oxidativos (Bourne & Rice-Evans, 1999; Ribeiro *et al.*, 2005; De Souza, 2008). Os sistemas de defesa antioxidantes podem ser divididos em dois tipos: enzimáticos e não enzimáticos (Nordberg & Arner, 2001).

O sistema de defesa antioxidante enzimático é constituído principalmente por 4 enzimas: Superóxido dismutase (SOD), Glutathione Peroxidase (GPx)/Glutathione Redutase (GR) e a Catalase. Por outro lado, o sistema de defesa antioxidante não enzimático é composto por moléculas de baixo peso molecular com capacidade de proteger determinados alvos biológicos contra a oxidação. Tais moléculas podem ter origem endógena ou podem ser obtidas através da dieta (Sies, 1993). Dentre estas moléculas estão as vitaminas A, E e C, a glutathione (GSH), alguns aminoácidos, em destaque a taurina (alvo do nosso estudo), que podem atuar como antioxidantes (Aerts & Van Assche, 2002; Zoppi, 2004; Ragheb *et al.*, 2009).

O sistema antioxidante enzimático converte radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e este em H_2O e O_2 , removendo as espécies reativas de oxigênio do meio intracelular (Gurgul *et al.*, 2004).

1.3.4. Estresse oxidativo, células-beta pancreática e diabetes

O estresse oxidativo está associado ao estado diabético (Yu, 1994). No diabetes tipo 1, a participação das ROS na disfunção das células-beta inicia-se por reações autoimunes e por ação de citocinas inflamatórias (Rabinovitch, 1998). Animais diabéticos tipo 1, induzido por aloxana, são exemplos de como as ROS estão envolvidas com o diabetes experimental. Neste modelo, depois da captação pelas células-beta, através do transportador de glicose GLUT2, a aloxana induz a geração de ROS por reação redox cíclica com formação de ácido dialúrico. Isto leva a uma necrose seletiva nas células-beta (Lenzen, 2008). A suplementação com varredores de radicais livres, como SOD e vitamina E, removem eficientemente os oxidantes protegendo contra a ação diabetogênica da aloxana (Fischer & Hamburger, 1980; Slonim *et al.* 1983; Lenzen, 2008).

No DM2, a hiperglicemia induz a geração do $O_2^{\bullet-}$ pela mitocôndria em células endoteliais e inicia um ciclo vicioso de reações oxidativas decorrentes do diabetes (Nishikawa *et al.*, 2000). Medindo diretamente a concentração de superóxido em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos Zucker obesos e diabéticos (ZDF), modelo experimental de diabetes tipo 2, Bindokas *et al.* (2003) revelaram que a geração de ROS está acoplada ao metabolismo e perturbação na função mitocondrial.

Além disso, o excesso de ROS prejudica a síntese e secreção de insulina (Droge, 2002; Evans *et al.*, 2003; Robertson, 2003; Graciano *et al.*, 2011) e ativa vias apoptóticas (Evans *et al.*, 2002; Mandrup-Poulsen, 2001; Mehmeti *et al.*, 2011), levando ao desenvolvimento do diabetes.

Tendo em vista dados da literatura acerca da ação das ROS nas células-beta, estas parecem estar sempre em um tênue limiar entre a sinalização da secreção da insulina e o dano intracelular que induz o desenvolvimento do diabetes (Leloup *et al.*, 2009). Nesse sentido, o papel dos antioxidantes intracelulares é de fundamental importância para o controle da ação de tais espécies.

Em condições fisiológicas, a geração de ROS é proporcional à capacidade antioxidante da célula. O desbalanço redox gerado pelo acúmulo dessas espécies reativas ou pela deficiência na capacidade antioxidante da célula leva ao chamado estresse oxidativo (Travacio & Lesuy, 1996; Cerqueira *et al.*, 2007).

1.4. Taurina

A taurina é um aminoácido que está presente em altas concentrações tanto no interior das células como no plasma de mamíferos. Este aminoácido é obtido pela ingestão de carne, peixe e leite, mas também pode ser biossintetizado a partir de metionina e cisteína. Tem importância em processos biológicos tais como desenvolvimento do sistema nervoso e retina, modulação do metabolismo do Ca^{2+} , estabilização de membranas, reprodução, imunidade, pode funcionar como um osmólito para regular o volume celular e pode também agir como antioxidante (Aerts & Van Assche, 2002; Ragheb *et al.*, 2009). Cheong e colaboradores (2013) sugerem que a taurina pode proteger contra danos no DNA e contra o estresse oxidativo agindo como um eficiente “varredor” de vários radicais livres como: hidroxila, superóxido e os radicais alquila em sistemas *in vitro*.

Além das várias funções já atribuídas à taurina, estudos de nosso laboratório têm mostrado que esse aminoácido possui um papel regulador sobre a secreção de insulina e homeostase glicêmica. O tratamento *in vivo* e *ex vivo* de ilhotas de Langerhans com a taurina aumenta a sensibilidade das células-beta à glicose, e promove uma maior expressão do fator de transcrição pancreático e duodenal (PDX-1) em ilhotas de Langerhans

(Carneiro *et al.*, 2008). O tratamento *in vivo* com taurina também aumenta a tolerância à glicose e sensibilidade à insulina além de aumentar a captação de cálcio e expressão da subunidade β_2 do canal de cálcio voltagem-dependente em ilhotas de Langerhans (Ribeiro *et al.*, 2009). Evidências recentes da literatura mostram, ainda, que o tratamento preventivo com taurina reestabelece a secreção de insulina em homens obesos e submetidos à infusão contínua com ácidos graxos por 48h (Xiao *et al.*, 2008), e também reduz a concentração circulante do peptídeo C em animais que receberam infusão contínua de oleato (Oprescu *et al.*, 2007).

Embora evidências mostrem que a taurina protege uma grande variedade de células contra o estresse oxidativo (Aruoma *et al.*, 1988; Hanna *et al.*, 2004), investigações são necessárias para esclarecer o efeito da taurina na modulação redox em tecidos envolvidos na homeostase glicêmica de animais submetidos à restrição proteica e obesidade.

1.5. Secreção de insulina

Em resposta a concentrações de glicose elevada no sangue, as células-beta pancreáticas secretam insulina para manter a homeostase glicêmica, sendo a disfunção nessa resposta secretória considerada um dos indutores do DM2 (Weyer *et al.*, 1999; Eizirik *et al.*, 2008). No interior das células-beta, a insulina é armazenada em grânulos. Quando os níveis de glicose extracelular se elevam, a glicose entra na célula-beta através da proteína transportadora de glicose (GLUT2). A glicose é rapidamente metabolizada aumentando a razão ATP/ADP (Malaisse & Sener, 1987; Fujimoto *et al.*, 2011) causando o fechamento dos canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}) e, conseqüentemente, despolarização da membrana plasmática (Cook & Hales, 1984; Newsholme *et al.*, 2007). A despolarização induz abertura de canais de cálcio (Ca^{2+}) sensíveis à voltagem, aumentando a concentração de cálcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) (Satin & Cook, 1985 ; Rorsman *et al.*, 2000 ; Fujimoto *et al.*, 2011). O aumento da $[Ca^{2+}]_i$ ativa a maquinaria de exocitose dos grânulos de insulina, promovendo fusão desses grânulos à membrana plasmática e resultando na secreção de insulina (Newsholme *et al.*, 2007). Um efeito secundário da elevação da $[Ca^{2+}]_i$ é a ativação da adenil ciclase e fosfolipase C (PLC) que, agindo sobre substratos específicos, produz AMP cíclico (AMPC), diacilglicerol (DAG) e inositol 1, 4, 5 trifosfato

(IP₃), respectivamente. O IP₃ promove a liberação do cálcio armazenado no retículo endoplasmático. O AMPc e o DAG ativam a proteína quinase A (PKA) e proteína quinase C (PKC), respectivamente, promovendo a fosforilação de outras proteínas que amplificam o sinal para o processo secretório de insulina (Henquin *et al.*, 2006; Diederichs, 2008; Newsholme *et al.*, 2009).

A importância do ATP na secreção de insulina estimulada por glicose (GSIS) já está bem estabelecida, porém outros fatores de acoplamento metabólico, tais como o NADPH, malonil-CoA e glutamato parecem ser importantes para esse mecanismo (MacDonald *et al.*, 2005; Maechler *et al.*, 2006). Em adição aos fatores metabólicos citados anteriormente, Leloup e colaboradores (2009), mostraram que as espécies reativas de oxigênio (ROS) também são fundamentais para a GSIS, embora não se saiba ao certo o mecanismo de ação de tais espécies.

1.6. Modulação redox da sinalização e secreção da insulina

Várias proteínas incluindo proteínas quinases, fatores de transcrição e demais enzimas do metabolismo celular podem sofrer modulação redox através de seus resíduos de cisteína ricos em grupos tióis (Sen *et al.*, 2000). Essas modulações parecem exercer função sinalizadora importante, mediada por mecanismos sensíveis à modulação redox (Sen *et al.*, 2000; Ungvari *et al.*, 2006; Sen *et al.*, 1996). Assim, o estado redox dos grupos SH de um amplo espectro de proteínas intracelulares é regulado por um fino mecanismo mediado por glutatona, tioredoxina e possivelmente outros antioxidantes associados (Figura 3).

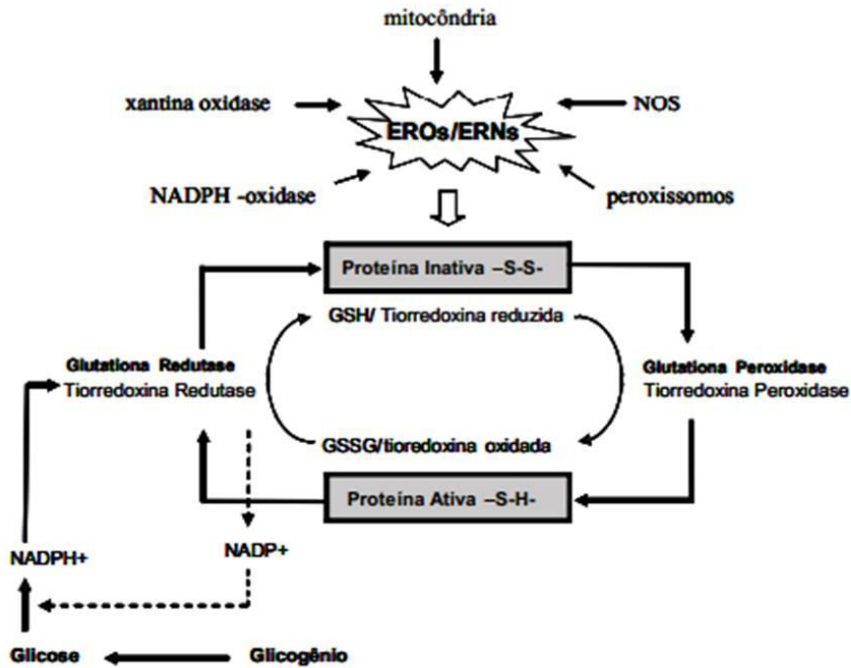


Figura 3. Efeito do sistema glutatona/tiorredoxina peroxidase na manutenção do estado redox (-SH-) de proteínas intracelulares suscetíveis à oxidação por ROS e ERNs (espécies reativas de nitrogênio). NOS, óxido nítrico sintase; GSH, glutatona reduzida; GSSG, glutatona oxidada; NADPH+, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida; NADP+, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidada (Silveira et al., 2008).

O estado redox intracelular pode modular tanto a sinalização quanto a secreção de insulina. Estudos realizados na década de 1970, mostraram que o H_2O_2 , em níveis relativamente elevados, teve efeitos miméticos aos da insulina, que foram mediados por reações redox de cisteína (Czech et al., 1974, Peter et al., 2011). Mais tarde, verificou-se que o H_2O_2 , por si só pode induzir a atividade de auto-fosforilação de tirosina do receptor de insulina, mesmo na ausência de insulina. Além disso, foi mostrado que a oxidação de cisteína dentro do domínio da quinase do receptor de insulina previne a ligação inibitória de ADP (Schmid et al., 1998, Peter et al., 2011). Embora estes estudos sugiram um papel direto da oxidação de cisteína na ativação do receptor da insulina, o maior efeito da cascata de sinalização de insulina pode ser alcançado através do aumento da atividade quinase ou inibição da atividade das fosfatases. Isto torna extremamente difícil distinguir qual processo é o mais importante para a alteração da sinalização de insulina mediante tratamento de

células com ROS. A estimulação da insulina, por si só, também induz a produção de peróxido de hidrogênio através da Nox4 (homólogo da NADPHoxidase) na membrana plasmática, embora não seja inteiramente clara como esta é regulada (Mahadev *et al.*, 2004, Peter *et al.*, 2011).

Estudos mostram, ainda, que as ROS são um sinal metabólico dependente de glicose que contribui para a GSIS e que a secreção de insulina estimulada pelo H₂O₂, é um processo dependente de Ca²⁺ extracelular, sugerindo que o H₂O₂ deve estar envolvido com o influxo de Ca²⁺ (Pi *et al.*, 2007, Leloup *et al.*, 2009).

Em adição, diversas proteínas envolvidas na sinalização da insulina, tais como o IR (receptor de insulina) e AKT (Proteína quinase B), MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases), mTOR (Mammalian target of rapamycin), PKC (Protein kinase C), PDK (Quinase dependente de fosfoinositol), podem ser moduladas pelo estado redox (Goldestein *et al.*, 2005). A modulação redox da sinalização da insulina pode ocorrer também pela ação de proteínas tirosina fosfatases (PTPs) como a PTEN, PP2A, MKP-1 e PTP1B. O IR e o substrato do receptor de insulina 1 (IRS1) são substratos da PTP1B, enquanto a PI3 quinase e a AKT são substratos da PTEN (Goldestein *et al.*, 2005).

A PTP1B é uma enzima conhecida por desfosforilar e controlar diversos eventos de sinalização celular durante o crescimento celular, apoptose, diferenciação e movimentação celular. Trabalhos mostram que a PTP1B é expressa em tecidos responsáveis à insulina e seus substratos são especificamente o IR e o IRS1 (Cheng *et al.*, 2002). A PTP1B através do seu sítio catalítico liga-se aos fosfatos presentes nos resíduos de tirosina do IR e IRS1, desfosforilando-os. O óxido nítrico (NO) e as ROS modulam resíduos de aminoácidos específicos das moléculas das PTPs em resposta ao estímulo da insulina. A inibição da atividade fosfatase mediada por ROS contribui para potencializar a cascata de sinalização da insulina. (Hsu *et al.*, 2010). Outros trabalhos mostram também que a atividade da PTP1B pode ser modulada pela AKT. Esta fosforila a PTP1B no resíduo de serina 50 tornando-a inativa e permitindo que a sinalização intracelular da insulina ocorra (Ravichandran *et al.*, 2001). Nesta forma ela não desfosforila os resíduos de tirosina do IR e IRS1, permitindo que a via de sinalização da insulina permaneça ativa.

A PTEN (fosfatase e homólogo a tensina), desfosforila o PIP3 gerado pela PI3quinase modulando a sinalização da insulina e de uma série de outros fatores de crescimento

(Nakashima *et al.*, 2000; Goldstein *et al.*, 2005). A PTEN é inativada por exposição a moléculas oxidantes, o que causa uma ligação dissulfureto entre os dois resíduos de cisteína no seu sítio ativo (Lee *et al.*, 2002; Goldstein *et al.*, 2005). A redução subsequente de H₂O₂ oxidada pela PTEN parece ser mediada principalmente por tioredoxina, o que sugere que este sistema de regulação proporciona um novo meio de controlar o acúmulo de 3-fosfoinosítídeos fosforilados na célula (Lee *et al.*, 2002; Goldstein *et al.*, 2005)

2. OBJETIVOS

O objetivo desse trabalho foi verificar os mecanismos moleculares envolvidos no balanço redox em tecidos periféricos (fígado e músculo) e ilhotas de Langerhans, em animais submetidos à restrição proteica e/ou obesidade. Analisamos, ainda, os efeitos da suplementação, desses animais em estudo, com o aminoácido Taurina a fim de verificar sua capacidade de modular a suscetibilidade desses animais aos efeitos do estresse oxidativo induzidos pela dieta hipoproteica e hiperlipídica.

A hipótese desse trabalho era que a dieta hiperlipídica traria um desbalanço no estado redox, gerando prejuízo nas funções dos animais controles e um prejuízo maior ainda nos animais restritos e que a suplementação com taurina poderia reverter esse prejuízo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Caracterização do modelo experimental

3.1.1. Animais:

Foram utilizados camundongos *C57BL/6*, provenientes do Biotério Central da UNICAMP. Logo após desmame (21 dias de vida), os animais foram distribuídos nos seguintes grupos experimentais:

- a) **Controle (C)**: os animais receberam dieta contendo 14% de proteína por todo o período experimental (105 dias).
- b) **Controle + Dieta Hiperlipídica (CH)**: os animais receberam dieta contendo 14% de proteína pelo período de 45 dias e em seguida receberam dieta contendo alto teor de gordura (34% - dieta hiperlipídica) por 60 dias.
- c) **Controle + Dieta Hiperlipídica + Taurina (CHT)** : os animais receberam dieta contendo 14% de proteína pelo período de 45 dias e em seguida receberam dieta contendo alto teor de gordura (34% - dieta hiperlipídica) por 60 dias. A suplementação com taurina foi iniciada juntamente com o desmame e foi fornecida a 5% na água de beber.
- d) **Restritos (R)**: os animais receberam dieta contendo 6% de proteína por todo o período experimental (105 dias).
- e) **Restritos + Dieta Hiperlipídica (RH)**: os animais receberam dieta contendo 6% de proteína pelo período de 45 dias e em seguida receberam dieta contendo alto teor de gordura (34% - dieta hiperlipídica) por 60 dias.
- f) **Restritos + Dieta Hiperlipídica + Taurina (RHT)**: os animais receberam dieta contendo 6% de proteína pelo período de 45 dias e em seguida receberam dieta contendo alto teor de gordura (34% - dieta hiperlipídica) por 60 dias. A suplementação com taurina foi iniciada juntamente com a dieta hipoproteica (desmame) e foi fornecida a 5% na água de beber.

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

As dietas descritas na Tabela 1 foram adquiridas da empresa Prag soluções (Jaú, SP), e seguem as recomendações do Instituto Americano de Nutrição (AIN-93) para roedores na fase de manutenção e, tiveram ainda, o teor de proteínas e lipídios manipulados de forma a gerarem as formulações hipoproteica e hiperlipídica, respectivamente.

Tabela 1. Composição das dietas

Ingredientes	Normoproteica	Hipoproteica	Hiperlipídica
	(14% proteína)	(6% proteína)	(14% proteína)
	g/kg	g/kg	g/Kg
Caseína (84% de proteína)	140	71,5	140
Amido	465,7	502,5	208,7
Dextrina	155	166,5	100
Sacarose	100	121	100
L-cistina	1,8	1	1,8
Fibra pH 101 ou pH102 (microcelulose)	50	50	50
Óleo de soja	40	40	40
Mistura de sais AIN93G*	35	35	35
Mistura de vitaminas AIN93G*	10	10	10
Cloridrato de Colina	2,5	2,5	2,5
Banha Animal	-	-	312

* **Composição detalhada por [Reeves et al., 1993](#)**

3.1.2. Peso corpóreo

O peso corpóreo dos animais estudados foi avaliado semanalmente por um período de 105 dias.

3.1.3. Consumo alimentar

Foi acompanhado o consumo alimentar dos animais que ficaram isolados em gaiolas metabólicas durante a última semana do tratamento. Os valores de ingesta encontrados foram divididos pelo peso do animal e o conteúdo calórico foi medido dividindo o correspondente da dieta consumida em kcal dividido pelos dias. As dietas normoproteica e hipoproteica contém 3,88 Kcal/g e a dieta hiperlipídica contém 5,44 Kcal/g.

3.1.4. Respirometria

Após 2 horas de aclimação ao sistema, e com os animais em completo repouso, foi medido o consumo de oxigênio e produção de CO₂, em gaiolas metabólicas totalmente seladas utilizando o sistema Oxylet system (Pan Lab/Harvad instruments, Barcelona, Espanha), totalizando 4 gaiolas de forma que cada gaiola continha apenas um animal. A concentração dos gases de cada gaiola foi media por 10 minutos no ciclo de claro, sendo realizados dois ciclos de 40 minutos ao total. A partir desses dados foi feito o cálculo do coeficiente respiratório e gasto energético dos animais utilizando-se o software Metabolism[®] (Pan Lab/Harvad instruments, Barcelona, Espanha) acoplado ao sistema.

3.2. Procedimentos experimentais

3.2.1. Avaliação biométrica

Foi verificado a massa corpórea, o peso relativo e absoluto do fígado, músculo, pâncreas, gordura retroperitoneal e gordura epididimal de camundongos *C57Bl/6*.

3.2.2. Avaliação do Estado Nutricional

As análises de parâmetros bioquímicos foram feitas em animais alimentados e em jejum. Os camundongos alimentados foram sacrificados por decapitação e o sangue foi

coletado em tubos *ependorf* contendo anticoagulante (heparina 1:1000 v:v). Para as dosagens em jejum, o sangue foi coletado pela cauda do animal utilizando capilar contendo heparina. O plasma foi separado por centrifugação a 12000 rpm durante 15 minutos e armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior determinação de proteínas totais, triglicérides, colesterol e insulina.

3.2.3. Teste de Tolerância à glicose (ipGTT) e à insulina (ipITT)

Para o ipGTT os animais dos grupos estudados, após 12h de jejum, foram pesados e realizada uma coleta de sangue pela cauda para obtenção da glicemia de jejum (tempo 0), com o uso de um glicosímetro portátil (Accu-Chek Performa). Em seguida os animais receberam uma injeção intra-peritoneal de glicose na concentração de 2g/Kg peso corporal. A glicemia foi verificada nos tempos 0 (jejum), 15, 30, 60 e 120 minutos.

Para o ipITT os animais dos grupos em estudo, após jejum de 2 horas, foram pesados e, em seguida, foi realizada uma coleta de sangue pela cauda, e com o uso de glicosímetro portátil (Accu-Chek Performa) foi obtida a glicemia no tempo 0. Em seguida, foi realizada a aplicação via intra-peritoneal de 1,5U/Kg de insulina (Eli Lilly), e a glicemia foi verificada nos tempos 0, 10, 15, 30, 45 e 60 minutos após a administração de insulina. A taxa constante de decaimento da glicose (kITT) foi calculado utilizando a fórmula $0.693/t_{1/2}$. A glicose ($t_{1/2}$) foi calculada a partir análise das concentrações de glicose plasmáticas durante a fase de decadência linear. (Calegari *et al.*, 2011)

3.2.4. Glicemia

Para os demais experimentos, os animais receberam aplicação de salina ou glicose (2g/Kg de peso) e após 30 min da aplicação, os animais foram sacrificados e foi coletado, fígado e músculo.

3.2.5. Insulinemia

Para análise da insulinemia foi realizada uma coleta de sangue pela cauda dos animais dos grupos em estudo, após jejum de 2 horas (tempo 0) e após 30 minutos da aplicação via intra-peritoneal de 2g/Kg de peso de glicose.

3.2.6. Preparação das amostras de tecido para determinação da produção de H_2O_2 e da concentração GSH

Fígado e músculo (gastrocnêmio e sóleo) foram removidos e colocados em meio gelado contendo EDTA 10mM, Trisma base 100mM, Pirofosfato de Na 100mM, Fluoreto de Na 100mM, Ortovanadato de Na 10mM, PMSF 2mM, Aprotinina 0,1 mg/mL e então, foram homogeneizados utilizando homogeneizador Polytron (Kinematica, Suíça).

3.2.7. Determinação da produção de H_2O_2

As amostras de tecidos isolados (fígado e músculo) foram mantidas em 0,3 mL de solução Krebs-Hepes (KRBH) (em mM: 115 NaCl, 10 $NaHCO_3$, 5 KCl, 1 $MgCl_2$, 2,5 $CaCl_2$, 10 Hepes) em pH 7,4 a 37° C na presença de 50 μ M de *Amplex Ultra-red* (Invitrogen) e *horseradish peroxidase* (0,1U/mL) por 15 min. Após este período, 100 μ L do meio foram coletados e a intensidade de fluorescência determinada em 530 nm de excitação e 590 nm de emissão.

3.2.8. Determinação da concentração GSH

As amostras de tecidos (fígado e músculo) foram centrifugadas a 4°C a 12000 rpm por 15 minuto. Após esse procedimento foi feita uma curva de utilizando GSH [0,5 μ M/mL]. O procedimento seguiu da seguinte forma: foi pipetado 100 μ L de tampão Tris (1mM)/ EDTA (2mM) pH = 8,2, em seguida foi pipetado 100 μ L da amostra e da curva, depois foi feita uma leitura em ELISA, absorvância = 412 nm. E para finalizar o experimento foi pipetado 20 μ L do ácido-5,5- ditiobis-2-nitrobenzóico (10mM - DTNB) em todos pocinhos e após 15 minutos foi feita a leitura em ELISA, absorvância = 412 nm. Esse método foi previamente descrito por Faure e Lafond (1995).

3.2.9. Quantificação do RNA mensageiro (mRNA) por Real-time RT-PCR

Inicialmente os tecidos (fígado e músculo) foram lisados usando Trizol (0.7-1 ml). Três μ g de RNA foram submetidos à reação de transcrição reversa (RT) para obtenção de cDNA. A reação foi composta por primers randômicos, enzima transcriptase reversa, dNTPs e tampão específico, mantidos por 10 min à 25°C, 120 min à 37°C, 5 seg à 85°C e

para finalizar um resfriamento à 4°C. A reação de PCR quantitativo foi de um volume final de 15µl, composta por 0.5µl de cDNA, 10 µmol/l de cada primer e 7,5µl de SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). As condições de ciclagem foram de 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos à 95°C por 10 seg e 60°C por 45 seg. As curvas de amplificação foram analisadas utilizando-se o Sequence Detector System 1.7 (Applied Biosystems). Os resultados estão apresentados como % do controle a partir do valor de RQ (Relative Quantity), que obedece a fórmula matemática $2^{-(\Delta\Delta CT)}$. O valor de $\Delta\Delta CT$ compreende a diferença entre o valor do ciclo da amostra em que se inicia a fase exponencial da curva de amplificação do gene em análise normalizado pelo valor do ciclo do gene utilizado como controle endógeno e o valor do ciclo da amostra referência em que se inicia a fase exponencial da curva de amplificação do gene em análise (Roma *et al.*, 2009). Os primers utilizados estão descritos na tabela abaixo.

Nome do gene	Foward 5'	Reverse 5'
IR	5'- ATTCCAGCAACTTGATGTGCACCC	5'- ATGGAAGAAGAGCTTGCCCTGAGT
AKT	5'- GATGACAGCATGGAGTGTGTGG	5'- TCTCTGAACAGCATGGGACACA
SOD1	5'- CGTCGGCTTCTCGTCTTGCTCTC	5'- CACGCACACCGCTTTCATCGC
SOD2	5'- TGAGGAGAGCAGCGGTCTGTGT	5'- ACGCCGCCCGACACAACATT
GPx1	5'- GCCGCACCCTCTCCCTG	5'- GTGGCATCGCTTCTTTCCG
CAT	5'- GATGAAGCAGTGGAAAGGAGC	5'- TGCCATCTCGTCGGTGAAA
GAPDH	5'- CCTGCACCACCAACTGCTTA	5'- GCCCCACGGCCATCACGCCA

3.2.10. Western Blotting

A expressão das proteínas foi avaliada pela técnica de “Western blotting”. As amostras de fígado e músculo foram homogeneizadas em tampão de imunoprecipitado (IP) (EDTA 10mM pH=7; Trisma base 100mM pH=7,5; pirofosfato de Na 100mM; fluoreto de Na 100mM; Ortovanadato de Na; PMSF 2 mM; aprotinina 0,1mg/ml; água deionizada; triton 10%). Os tecidos (fígado e músculo) foram rompidos utilizando homogenizador tipo polytron (Kinematica, Lucerna, Suíça). Os extratos foram centrifugados a 15.000 g, 4 °C por 15 min para remoção do material insolúvel. As amostras foram tratadas com tampão Laemmli contendo DTT 10 mM, e fervidas em banho seco por 5 min. Alíquotas contendo 60µg (fígado) ou 25µg (músculo) de proteína foram aplicadas em SDS-PAGE (10% Tris

acrilamida) em aparelho minigel (Miniprotean) em paralelo com marcadores de pesos moleculares conhecidos. Após corrida, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose de 0,2 μm (BioRad). Esta foi incubada por 2 h em solução bloqueadora de albumina (5%) para diminuir a ligação inespecífica das proteínas. A seguir as membranas foram incubadas com os seguintes anticorpos primários policlonais: anti-catalase (Sigma), anti-superóxido dismutase 1 (Abcam), anti-glutathiona peroxidase 1 (Abcam), anti-receptor de Insulina (Santa Cruz), anti-AKT (Santa Cruz), anti-p-PTP1B (Abcam), anti-p-PTEN (Cell Signaling) e GAPDH(Santa Cruz). Após 12 horas de incubação, foi feita a lavagem das membranas. Em seguida as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com HRP (Invitrogen), diluído 1:10000 em albumina 5%, por 2h. Após a incubação com o anticorpo secundário as membranas foram expostas por um curto período (2 minutos) ao luminol (Tris 1M, pH=8,5, Luminol 250mM, ácido p-cumárico 90mM, peróxido de hidrogênio 30% e água) e revelada por quimioluminescência no equipamento (ImageQuant LAS 4000).

3.2.11. Isolamento de ilhotas

Os animais foram sacrificados por decapitação. Após uma incisão abdominal e oclusão da extremidade do ducto biliar comum, foi inserida uma cânula através de uma incisão na parte proximal (hepática) neste ducto. Foi injetado através do duto pancreático cerca de 3 mL/animal de solução 0,8 mg/mL de colagenase tipo V. Retirado o pâncreas, o órgão foi mantido por cerca de 17 min a 37 °C para digestão. O material foi lavado repetidamente com solução de Hanks (em mM: 137 NaCl, 5,4 KCl, 4,2 NaHCO₃, 0,4 KH₂PO₄, 0,4 Na₂HPO₄, 0,8 MgSO₄, 1,3 CaCl₂) contendo 5,6 mM de glicose e 0,5 g/L de albumina. Por decantação, as ilhotas foram separadas e coletadas manualmente sob lupa por uma pipeta siliconizada.

3.2.12. Secreção Estática de Insulina

As ilhotas coletadas foram transferidas para placas de cultura com 24 reservatórios contendo 1 mL de solução de Krebs-Hepes (KRBH) (em mM: 115 NaCl, 10 NaHCO₃, 5 KCl, 1 MgCl₂, 2,5 CaCl₂, 10 Hepes) pH 7,4 suplementada com 0,3% de albumina bovina (m/v) e 5,6 mM de glicose com ou sem DPI (inibidor da NADPHoxidase). Em todos os

experimentos 4 ilhotas foram colocadas em cada reservatório. A seguir, as placas foram mantidas por 30 min a 37 °C em ambiente controlado (gaseificado com 95% O₂ + 5% CO₂). A solução foi rapidamente removida e substituída por nova solução de incubação contendo 16,7 mM de glicose com ou sem DPI. Após 60 min de incubação, as placas foram resfriadas em banho de gelo e o sobrenadante removido, transferido para tubos de ensaio e armazenado a -20 °C para posterior dosagem de insulina por radioimunoensaio (Scott *et al.*, 1981; Tanaka *et al.*, 2002).

3.2.13. Análise Estatística

Os resultados foram expressos em média ± erro padrão e foram analisados pela análise de variância ANOVA de uma via seguida do *post test Tukey* e teste “*t*” *student*. O nível de significância adotado foi p<0,05.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização do modelo experimental

4.1.1. Parâmetros de Crescimento

A figura 4 mostra a evolução do peso corpóreo em resposta aos tratamentos com dieta hipoproteica e hiperlipídica ao longo do período experimental de camundongos *C57BL/6* machos, controle (C), controle + dieta hiperlipídica (CH), controle + dieta hiperlipídica + taurina (CHT), restrito (R), restrito + dieta hiperlipídica (RH) e restrito + dieta hiperlipídica + taurina. Os animais do grupo R apresentaram um ganho de peso menor do que o grupo C, enquanto os animais do grupo RH e RHT tiveram um ganho de peso maior do que o grupo R.

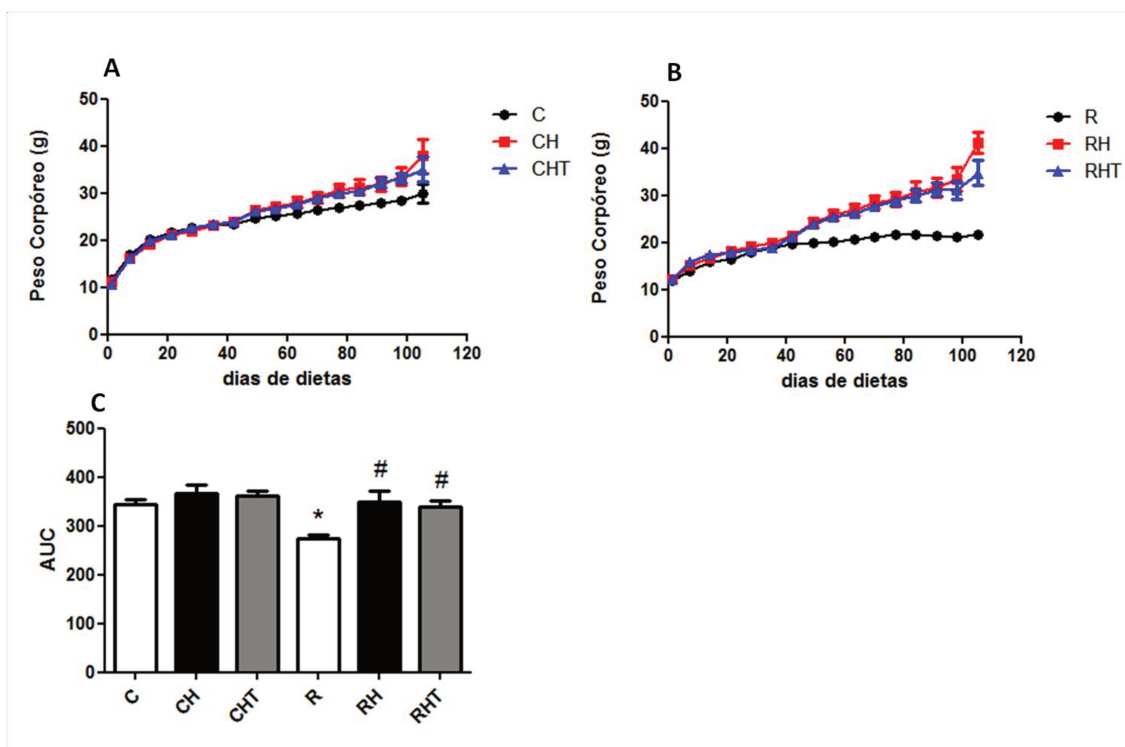
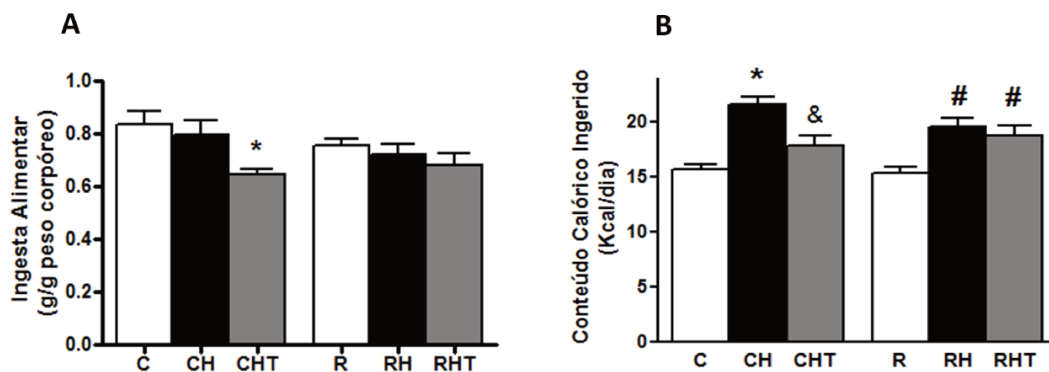


Fig.4 - (A) Peso corpóreo de camundongos *C57BL/6* machos controle (C), controle + dieta hiperlipídica (CH) e controle + dieta hiperlipídica + taurina (CHT). (B) Peso corpóreo de camundongos *C57BL/6* machos restrito (R), restrito + hiperlipídica (RH) e restrito + hiperlipídica + taurina (RHT). (C) área abaixo das curvas de evolução de peso (n = 9-13). Os valores são a média \pm EPM. * diferença significativa em relação ao grupo controle, # diferença significativa em relação ao grupo restrito. $P < 0,05$. ANOVA de uma via e pós teste de Tukey.

Para verificarmos os parâmetros alimentares, analisamos a ingesta alimentar, o conteúdo calórico ingerido e o gasto energético dos camundongos nos diferentes grupos experimentais. Na figura 5A podemos observar uma redução de 22,86% na ingesta

alimentar dos animais CHT em relação ao grupo C, enquanto nenhuma diferença significativa é observada nos demais grupos. Já no conteúdo calórico ingerido, ocorre um aumento significativo nos grupos CH (37,85%), RH (27,23%) e RHT (22,73%), em relação aos seus respectivos controles, enquanto o grupo CHT apresentou conteúdo calórico ingerido semelhante ao grupo C.

Fig.5 - Ingesta Alimentar g/g de peso corpóreo (A) e conteúdo calórico ingerido (B) de camundongos



C57BL/6 machos controle (C), controle + dieta hiperlipídica (CH) e controle + dieta hiperlipídica + taurina (CHT). (B) Peso corpóreo de camundongos *C57BL/6* machos restrito (R), restrito + hiperlipídica (RH) e restrito + hiperlipídica + taurina (RHT). n = 4 -6. Os valores são a média \pm EPM. * diferença significativa em relação ao grupo controle, # diferença significativa em relação ao grupo restrito, & diferença em relação ao grupo CH. P < 0,05. ANOVA de uma via e pós teste de Tukey.

4.1.2. Coeficiente respiratório e Gasto energético

A figura 6A, mostra o coeficiente respiratório (RQ) dos grupos estudados. Nessa figura, podemos observar que o coeficiente respiratório de animais C, CH e CHT não apresentam diferença significativa entre eles. O grupo R, apesar de não apresentar diferença significativa, apresentou coeficiente respiratório 17,95% menor do que o grupo C e o grupo RH apresentou um aumento significativo de 34,47% em relação ao grupo R, no coeficiente respiratório. O grupo RHT não apresenta diferença significativa em relação ao grupo R. Quanto ao gasto energético (figura 6B), ocorreu uma diminuição no grupo CH (29,82%) e no grupo R (26,36%) em relação ao grupo C, enquanto o grupo CHT apresentou um aumento de 23,80% em relação ao grupo C. A administração de taurina aumentou em 76,42% o gasto energético do grupo CHT em relação ao grupo CH, mostrando que a redução parcial da adiposidade nesse grupo (tabela 3) pode ser, em parte, devido à

associação da ingesta alimentar reduzida (figura 5A) e do maior gasto energético (figura 6B). No entanto, ao contrário do observado no grupo CHT, o grupo RHT apresentou ingesta alimentar semelhante ao grupo R, porém conteúdo calórico maior, refletindo, assim, em aumento da adiposidade.

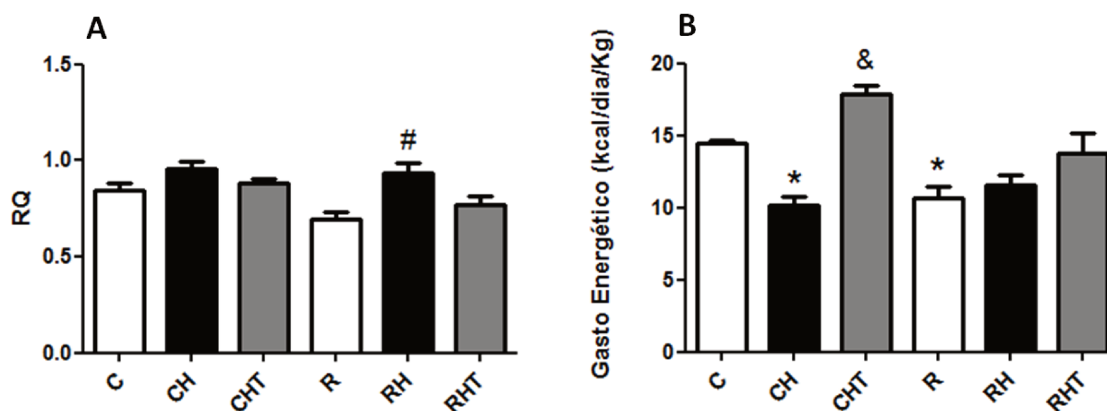


Fig. 6 – Coeficiente respiratório (A) e Gasto energético (B) de camundongos C57BL/6 machos controle (C), controle + dieta hiperlipídica (CH) e controle + dieta hiperlipídica + taurina (CHT), restrito (R), restrito + hiperlipídica (RH) e restrito + hiperlipídica + taurina (RHT). n = 3 -4. Valores representam média ± EPM. * representa diferença estatística em relação ao grupo C. # diferença significativa em relação ao grupo R. & representa diferença estatística em relação ao grupo CH. P < 0.05 (ANOVA de uma via e pós teste de Tukey).

Ao final do tratamento, os animais foram sacrificados e os órgãos removidos e pesados. A tabela 2 mostra o valor absoluto da massa corpórea, fígado, músculo, pâncreas, gordura retroperitoneal e gordura epididimal dos diferentes grupos em estudo.

Tab.2 - Valor Absoluto da massa corpórea, fígado, músculo, pâncreas, gordura retroperitoneal e gordura epididimal de camundongos *C57BL/6* controle (C), controle + hiperlipídica (CH), controle + hiperlipídica + taurina (CHT), restrito (R), restrito + hiperlipídica (RH) e restrito + hiperlipídica + taurina (RHT) tratados durante 105 dias.

	C	CH	CHT	R	RH	RHT
Massa corpórea (g)	27,68 ± 0,8	33,21 ± 1,32 [*]	31,14 ± 1,11	21,10 ± 0,59 [*]	32,48 ± 1,56 [#]	33,33 ± 0,82 [#]
Fígado (g)	1,17 ± 0,03	1,26 ± 0,04	1,28 ± 0,03	0,78 ± 0,18 [*]	1,01 ± 0,03 [#]	1,27 ± 0,07 ^{&#}
Músculo (g)	0,14 ± 0,007	0,16 ± 0,007	0,15 ± 0,008	0,11 ± 0,008	0,15 ± 0,008 [#]	0,15 ± 0,002 [#]
Pâncreas (g)	0,19 ± 0,007	0,22 ± 0,017	0,20 ± 0,013	0,11 ± 0,004 [*]	0,19 ± 0,02 [#]	0,21 ± 0,015 [#]
Gordura Retroperitoneal(g)	0,14 ± 0,01	0,40 ± 0,04 [*]	0,31 ± 0,03 [*]	0,15 ± 0,01	0,37 ± 0,02 [#]	0,44 ± 0,04 [#]
Gordura Epididimal (g)	0,42 ± 0,04	1,07 ± 0,12 [*]	0,83 ± 0,08 [*]	0,37 ± 0,02	1,00 ± 0,09 [#]	1,34 ± 0,13 [#]

1 Valores representam média ± EPM, n = 4-12.

2 * representa diferença estatística em relação ao grupo C, P < 0.05 (ANOVA de uma via e pós teste de Tukey).

3 # representa diferença estatística em relação ao grupo R, P < 0.05 (ANOVA de uma via e pós teste de Tukey).

4 & representa diferença estatística em relação ao grupo RH, P < 0.05 (ANOVA de uma via e pós teste de Tukey).

Em relação à massa corpórea, observamos que os grupos que receberam dieta hiperlipídica (HFD) tiveram um aumento em relação aos respectivos controles, e que a suplementação com a taurina atenuou o peso corpóreo somente do grupo CHT, não tendo efeito no RHT. A HFD aumentou a massa corpórea em 19,97% e 53,93% em relação ao C e R respectivamente. O grupo CHT, apesar de não ter apresentado diferença estatística, teve a massa corpórea 6,23% menor do que o CH enquanto o RHT teve um aumento de 2,61% em relação ao RH.

O fígado dos grupos C, CH e CHT não apresentou diferença significativa entre eles. No entanto, animais do grupo R apresentaram o fígado diminuído em relação ao grupo C. Nos grupos RH e RHT esta variável aumenta em relação a R. Especificamente no grupo RHT, o peso do fígado, aumenta ainda mais em relação a RH. O tecido muscular também não apresentou diferença significativa entre C, CH e CHT. Já os grupos RH e RHT apresentaram um aumento em relação ao grupo R.

Os depósitos de gordura retroperitoneal e epididimal apresentaram aumento nos grupos tratados com HFD em relação aos respectivos controles. A gordura retroperitoneal

dos grupos CH e RH aumentaram 185,71% e 146,66% em relação a C e R, respectivamente. Pudemos observar também uma diminuição (22,5%) e um aumento (18,91%) desta variável nos grupos CHT e RHT em relação aos grupos CH e RH, respectivamente. Na gordura epididimal, pudemos observar nos grupos tratados com HFD, aumento de 154,76% e 170,27% em relação aos seus respectivos controles. Constatamos também uma diminuição de 22,42% do CHT e um aumento de 34% do RHT em relação aos grupos CH e RH.

Quando analisamos o peso relativo (tabela 3), verificou-se que o fígado dos animais do grupo CH e o grupo R apresentaram diminuição de 13,64% e 12,23%, respectivamente, em relação ao C e o grupo CHT aumentou 13,07% em relação ao CH. Em relação ao pâncreas, os animais do grupo R também apresentaram redução de 23,18% em relação ao grupo C.

Os valores relativos das gorduras retroperitoneal e epididimal dos grupos tratados com HFD apresentam-se aumentadas em relação ao grupo controle correspondente. Os grupos CH e RH apresentaram aumento na gordura retroperitoneal de 120,75% e 69,86% em relação a C e a R, respectivamente, enquanto os grupos CHT e RHT apresentaram diminuição de 35,89% e de 6,45% em relação ao CH e RH, respectivamente. A gordura epididimal aumentou 119,48% no grupo CH e 106,89% no grupo RH em relação a C e R, respectivamente. Os grupos CHT e RHT tiveram redução de 15,97% e aumento de 11,11% em relação à CH e RH, respectivamente. Dessa forma, a taurina se mostrou eficiente em restabelecer, total ou parcialmente, os níveis de gordura no grupo CHT, no entanto, não houve melhora significativa na adiposidade do grupo RHT em relação ao grupo RH.

Tab.3 - Valor Relativo (g/ % de g de peso corpóreo) do fígado, músculo, pâncreas, gordura retroperitoneal e gordura epididimal de camundongos *C57BL/6* controle (C), controle + hiperlipídica (CH), controle + hiperlipídica + taurina (CHT), restrito (R), restrito + hiperlipídica (RH) e restrito + hiperlipídica + taurina (RHT) tratados durante 105 dias.

	C	CH	CHT	R	RH	RHT
Fígado	4,25 ± 0,06	3,67 ± 0,07*	4,15 ± 0,15 ^{&}	3,73 ± 0,08*	3,39 ± 0,11	3,70 ± 0,17
Músculo	0,52 ± 0,02	0,49 ± 0,01	0,49 ± 0,01	0,54 ± 0,03	0,50 ± 0,02	0,46 ± 0,009
Pâncreas	0,69 ± 0,03	0,61 ± 0,02	0,66 ± 0,02	0,53 ± 0,01*	0,57 ± 0,02	0,62 ± 0,04
Gordura Retroperitoneal	0,53 ± 0,05	1,17 ± 0,07*	0,75 ± 0,06 ^{&}	0,73 ± 0,06	1,24 ± 0,06 [#]	1,16 ± 0,10 [#]
Gordura Epididimal	1,54 ± 0,14	3,38 ± 0,26*	2,84 ± 0,21*	1,74 ± 0,08	3,60 ± 0,30 [#]	4,00 ± 0,26 [#]

1 Valores representam média ± EPM, n = 4-12.

2 * representa diferença estatística em relação ao grupo C, P < 0.05 (ANOVA de uma via e pós teste de Tukey).

3 [#] representa diferença estatística em relação ao grupo R, P < 0.05 (ANOVA de uma via e pós teste de Tukey).

4 [&] representa diferença estatística em relação ao grupo CH, P < 0.05 (ANOVA de uma via e pós teste de Tukey).

A tabela 4 mostra que animais do grupo R apresentam proteínas plasmáticas totais em jejum diminuída em relação ao C e que os grupos RH e RHT apresentam aumento em relação a R. O colesterol dos grupos CH, CHT, RH e RHT apresentam-se aumentados em relação aos respectivos grupos controle. Em relação à glicemia e insulina em jejum o grupo CH apresenta aumento significativo em relação a C, enquanto o grupo RH apresenta um aumento, porém não significativo, em relação a R. O grupo CHT apresentou redução na insulina em jejum, em relação ao grupo CH. Apesar de não apresentar diferença estatística, na glicemia em jejum, o grupo CHT apresenta valores intermediários entre C e CH. Por outro lado, o grupo RHT apresentou glicemia mais alta em relação a R e RH e valores de insulina intermediários entre R e RH, porém não foi observada diferença estatística. Assim, observamos que o suplemento com a taurina no grupo RHT não é capaz de restabelecer os níveis de colesterol, glicose e insulina como visto no grupo CHT.

Tab.4 - Proteína total, triglicérides, colesterol, glicose e insulina plasmática de camundongos C56BL6 camundongos *C57BL/6* controle (C), controle + hiperlipídica (CH), controle + hiperlipídica + taurina (CHT), restrito (R), restrito + hiperlipídica (RH) e restrito + hiperlipídica + taurina (RHT) tratados durante 105 dias.

	C	CH	CHT	R	RH	RHT
Proteína total em jejum (g/dl)	5,6 ± 0,09	5,42 ± 0,09	5,84 ± 0,23	4,73 ± 0,34 [*]	5,80 ± 0,17 [#]	5,91 ± 0,17 [#]
Triglicérides jejum (g/dl)	72,37 ± 6,13	65,96 ± 5,17	79,10 ± 5,79	60,97 ± 9,12	72,23 ± 5,31	81,40 ± 5,05
Colesterol jejum (g/dl)	88,99 ± 6,93	143,2 ± 7,20 [*]	120,4 ± 5,30 [*]	94,31 ± 4,55	132,7 ± 11,12 [#]	129,8 ± 7,22 [#]
Glicose em jejum (mg/dl)	73,43 ± 3,31	95,20 ± 5,73 [*]	76,00 ± 4,11	65,22 ± 4,38	69,88 ± 5,16	84,20 ± 1,42
Insulina em jejum (ng/ml)	0,26 ± 0,02	0,91 ± 0,26 [^]	0,26 ± 0,06 ^{&}	0,16 ± 0,01	0,56 ± 0,19	0,43 ± 0,10

1 Valores representam média ± EPM. Para Proteína total jejum n = 7-12, triglicérides n = 7-8, colesterol jejum n = 5-10, glicose jejum n = 4-6, insulina jejum n = 7-8.

2 ^{*} representa diferença estatística em relação ao grupo C, P < 0.05 (ANOVA de uma via e pós teste de Tukey).

3 [#] representa diferença estatística em relação ao grupo R, P < 0.05 (ANOVA de uma via e pós teste de Tukey).

4 [&] representa diferença estatística em relação ao grupo CH, P < 0.05 (ANOVA de uma via e pós teste de Tukey).

4.1.3. Teste intraperitoneal de tolerância à glicose (ipGTT)

Para investigar a tolerância à glicose em nossos grupos experimentais, foi realizado o ipGTT. A figura 7 mostra as curvas glicêmicas de animais C, CH e CHT (figura 7A) e R, RH e RHT (figura 7B). Em acordo com dados da literatura, nossos resultados mostram que os grupos CH e RH apresentam-se menos tolerantes à glicose como evidenciado pela maior área abaixo da curva (AUC) comparada aos grupos C e R, respectivamente. O grupo R apresentou redução significativa na AUC em relação ao grupo C. A suplementação com taurina melhorou a tolerância à glicose em CHT, no entanto, o mesmo efeito não foi observado nos camundongos do grupo RHT, mostrando que a taurina não foi capaz de recuperar a intolerância à glicose causada pelos efeitos da dieta hiperlipídica no grupo RHT (figura 7C).

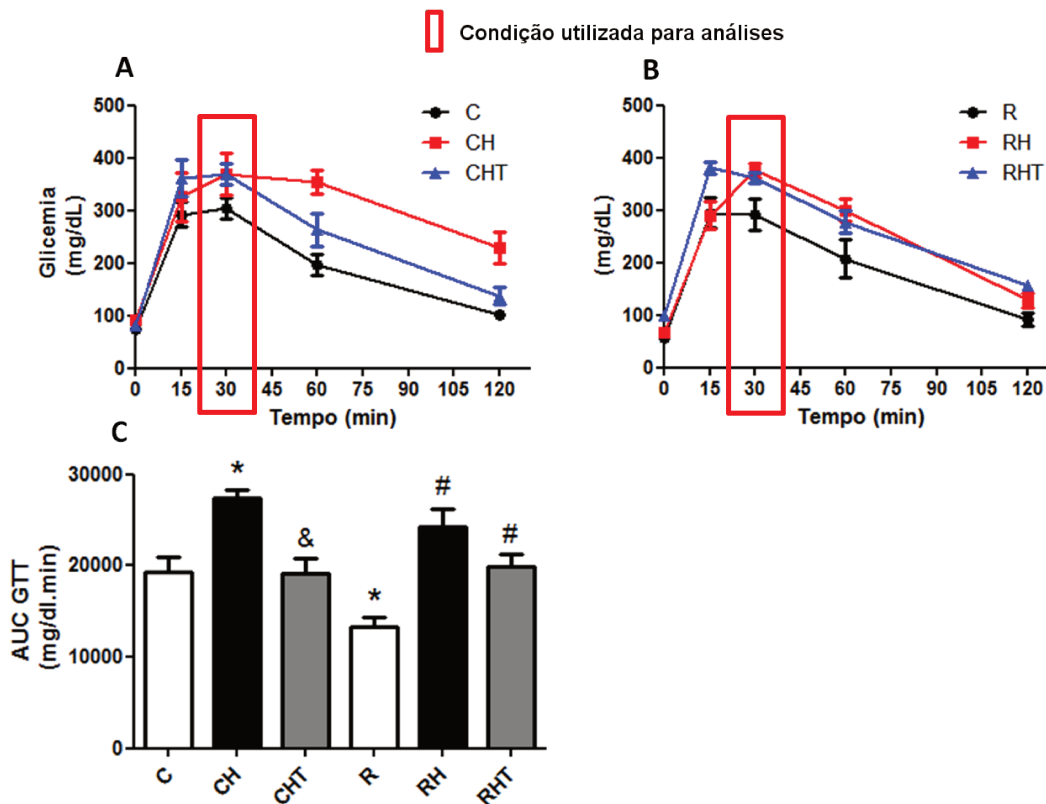


Fig. 7 - Glicemia durante o teste de tolerância à glicose intraperitoneal (ipGTT) (A) animais controle (B) animais restritos (C) área abaixo da curva glicêmica, n = 5-11. Valores representam média ± EPM. * representa diferença estatística em relação ao grupo controle. # representa diferença estatística, em relação ao grupo restrito. & representa diferença estatística em relação ao grupo controle + hiperlipídica, P < 0.05 (ANOVA de uma via e pós teste de Tukey).

4.1.4. Teste intraperitoneal de tolerância à insulina (ipITT) e kITT

A figura 8A mostra as curvas glicêmicas de animais C, CH e CHT. É possível observar que a HFD resultou em menor sensibilidade à insulina nos grupos CH e CHT em relação ao grupo C. A figura 8B mostra curvas glicêmicas dos animais R, RH e RHT. Algo semelhante foi observado no gráfico da área abaixo da curva (AUC) do ITT dos grupos RH e RHT, indicando que esses grupos também apresentam maior resistência à insulina (figura 8C). A figura 8D mostra o decaimento da glicemia em 15 minutos, dos grupos C, CH, CHT, R, RH e RHT, após aplicação de insulina intraperitoneal. Observa-se que apesar dos animais do grupo CH e CHT apresentarem diferença significativa no decaimento da glicemia (figura D) e os animais dos grupos RH e RHT não apresentarem valores significativos comparados ao grupo R, todos os grupos que receberam dieta hiperlipídica

apresentaram aumento da resistência à insulina. Além disso, a administração de taurina não minimizou os efeitos da HFD sobre a sensibilidade à insulina nos grupos CHT e RHT.

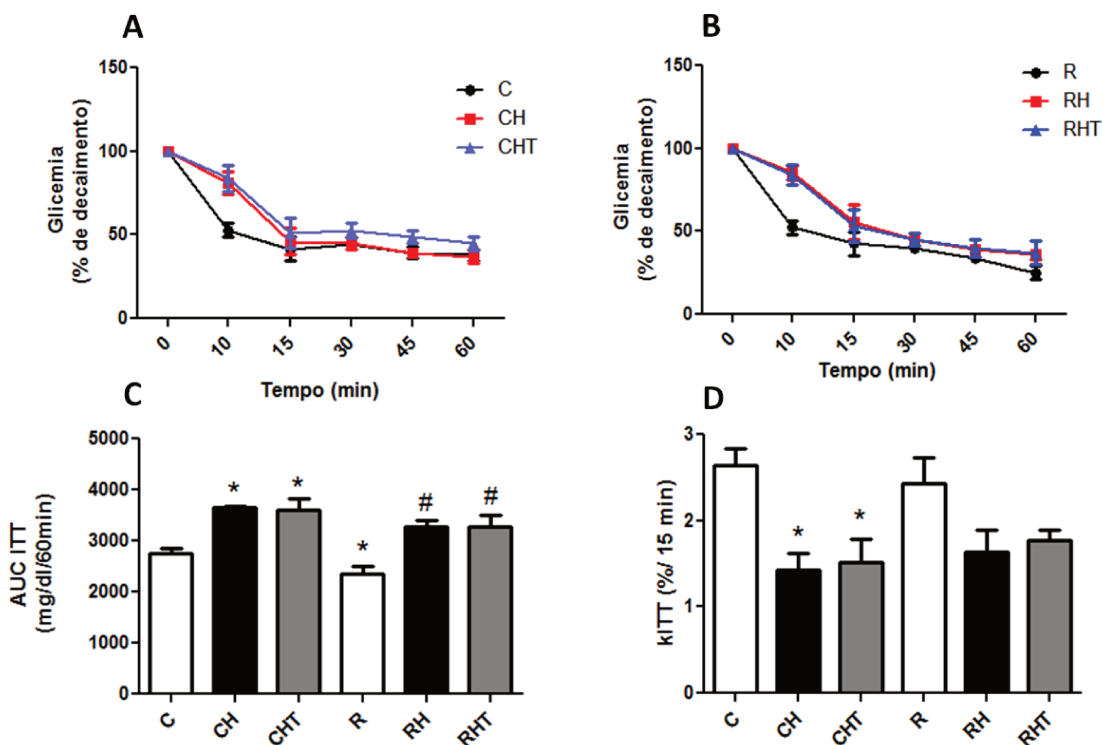


Fig.8 - Glicemia durante o teste de tolerância à insulina intraperitoneal (ipITT) (A) Curva glicêmica de camundongos C57BL/6 machos controle (C), controle + dieta hiperlipídica (CH) e controle + dieta hiperlipídica + taurina (CHT). (B) Curva glicêmica de camundongos C57BL/6 machos restrito (R), restrito + hiperlipídica (RH) e restrito + hiperlipídica + taurina (RHT). (C) Área a baixo da curva referente ao ITT (60 minutos). (D) Porcentagem do decaimento da glicemia em 15 min. (n = 6-12). Os valores são a média ± EPM. * diferença significativa em relação ao grupo C. # diferença significativa em relação ao grupo R. P < 0,05. ANOVA de uma via e pós teste de Tukey e Teste “t” student.

4.1.5. Efeitos de uma carga de glicose intraperitoneal na modulação redox da sensibilidade à insulina

No teste de tolerância à glicose intraperitoneal (ipGTT), o pico de glicemia destes animais ocorre em 30 minutos após a injeção de glicose.

Conforme o principal objetivo do nosso projeto, para avaliarmos a influência do estado redox sobre a resistência periférica à insulina nos tecidos (fígado e músculo), os animais receberam uma aplicação intraperitoneal de glicose ou salina e, após 30 minutos (pico da glicemia) quantificamos as variáveis de interesse. Nosso objetivo com este estímulo é o de obtermos uma resposta mais fisiológica, fornecendo também substrato (glicose) para a

formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), tendo em vista a falta de dados conclusivos acerca das principais fontes de ROS que atuam na modulação da secreção e da cascata de sinalização da insulina. Assim, quantificamos uma série de variáveis que participam do balanço redox e da cascata de sinalização da insulina em condições basais (salina) e após estímulo com uma carga de glicose.

A figura 9 mostra a glicemia dos diferentes grupos, C, CH e CHT (figura 9A) e R, RH e RHT (figura 9B) em jejum e após 30 minutos de aplicação de salina. Notamos que, apesar de um aumento significativo na glicemia, provavelmente devido ao estresse da aplicação, nos grupos C, CH, CHT, R, RH e RHT, a variação da glicemia foi pequena entre os animais em jejum e os que receberam salina, sendo de 23,53%, 37,61%, 30,14%, 22,29%, 26,82%, 34,69%, respectivamente (figura 9A e 9B). No entanto, quando os grupos receberam solução contendo glicose (2g/Kg), a variação da glicemia entre os grupos em jejum e que receberam uma carga de glicose foi de 236% para o grupo C, 286,70% para o grupo CH, 211,43% para o grupo CHT, 233,04% para o grupo R, 305,72% para o grupo RH e 224,80% para o grupo RHT, fato observado na figura 9C e 9D que mostra a glicemia dos animais em jejum e após 30 minutos da aplicação de glicose.

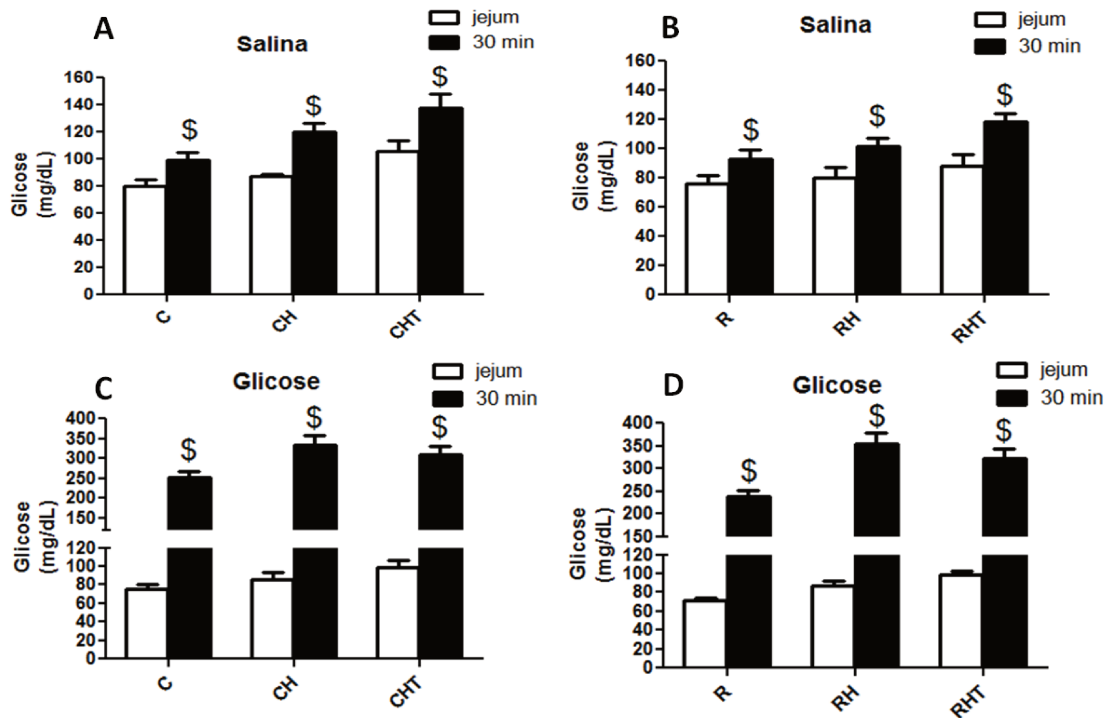


Fig.9 - Glicemia em jejum e após 30 minutos de aplicação de salina (A e B) ou 2g/Kg de glicose (C e D) em camundongos C57BL/6 machos controle (C), controle + dieta hiperlipídica (CH) e controle + dieta hiperlipídica + taurina (CHT), (A e C) e restrito (R), restrito + hiperlipídica (RH) e restrito +hiperlipídica + taurina (RHT) (B e D). n = 5-11. Os valores são a média ± EPM. \$ diferença significativa em relação ao mesmo grupo em jejum. P < 0,05. Teste “t” student.

Na figura 10 mostramos a insulinemia dos animais que receberam salina ou glicose no tempo 0 (jejum) e 30 minutos após a aplicação. Observamos que nos animais que receberam salina, não houve diferença na concentração de insulina plasmática em nenhum dos grupos após 30 minutos da aplicação quando comparados ao jejum (figura 10A e 10B), corroborando nossa análise anterior. Por outro lado, nos animais que receberam aplicação da carga de glicose (2g/Kg de peso), todos os grupos apresentaram aumento da insulinemia após 30 minutos quando comparados aos valores em jejum (figura 10C e 10D). Após 30 minutos do estímulo com glicose, os animais apresentaram aumentos na insulinemia de 244,82% para o C, 139,52% para o CH, 389% para o CHT, 96,59% para o grupo R, 120,21% para o grupo RH e 135,12% para o grupo RHT, quando comparados aos respectivos grupos em jejum.

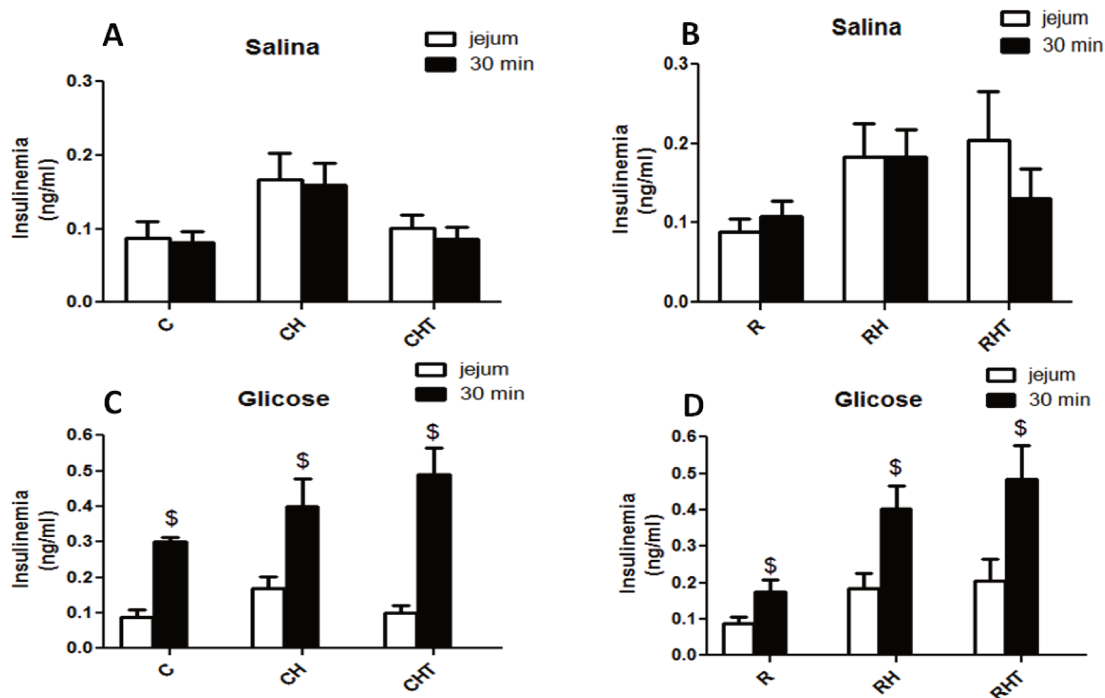


Fig.10 – Insulinemia plasmática. (A e B) Insulinemia em jejum e após 30min após aplicação de salina em camundongos C57BL/6 machos controle (C), controle + dieta hiperlipídica (CH) e controle + dieta hiperlipídica + taurina (CHT), restrito (R), restrito + hiperlipídica (RH) e restrito + hiperlipídica + taurina (RHT). (C e D) Insulinemia em jejum e após 30min após aplicação de glicose (2g/Kg de peso) em camundongos C57BL/6 machos C, CH, CHT, R, RH e RHT. n = 4-11. Os valores são a média ± EPM. ^{\$} diferença significativa em relação ao mesmo grupo em jejum. P < 0,05. Teste “t” student

4.2. Fígado

4.2.1. Verificação do estado redox - Concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e Dosagem da glutathiona reduzida (GSH) em fígado – Após injeção intraperitoneal de salina ou glicose 2g /Kg de peso do animal

Para verificar o balanço redox, foi medida a concentração de peróxido de hidrogênio (figura 11) e da GSH (figura 12) em fígado de camundongos C56BL/6 de nossos grupos experimentais. Observamos que no fígado de animais que receberam a carga de glicose (estimulados), ocorre um aumento de 115,36% (C), 40,76% (CH), 346,66% (CHT), 132,87% (R), 145,89% (RH) e 154,65 (RHT) na produção de H₂O₂, em relação aos animais que receberam salina (basal). Os grupos CHT e RHT apresentaram um incremento na concentração de peróxido de hidrogênio em relação aos grupos C e R, respectivamente (figura 11A e 11B) quando estimulados com glicose.

Dosamos, então, a concentração de GSH, para verificar qual o efeito da carga de glicose no balanço redox desses grupos. Observamos que o fígado de animais C, CH, CHT, R, RH e RHT, quando estimulados, apresentam uma redução de 48,31% (C), 59,05% (CH), 61,31% (CHT), 53,79% (R), 50,46% (RH) e 53,25% (RHT) na concentração de GSH em relação ao seu respectivo basal (figura 12A e 12B).

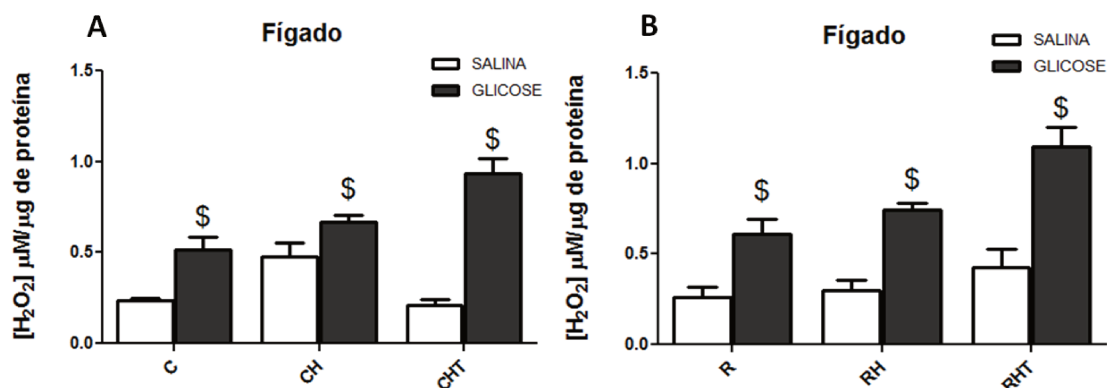


Fig. 11 – Concentração de H₂O₂ em fígado de camundongos *C57BL/6* machos controle (C), controle + dieta hiperlipídica (CH) e controle + dieta hiperlipídica + taurina (CHT), (A) e restrito (R), restrito + hiperlipídica (RH) e restrito + hiperlipídica + taurina (RHT) (B). As barras brancas representam animais sem tratamento (salina) e as barras pretas representam camundongos *C57BL/6* machos após 30 minutos de aplicar glicose (2g G/Kg) (glicose). n = 4–9. Valores representam média ± EPM. \$ representa diferença estatística em relação ao grupo salina dos animais que receberam a mesma dieta, (Teste “t” student).

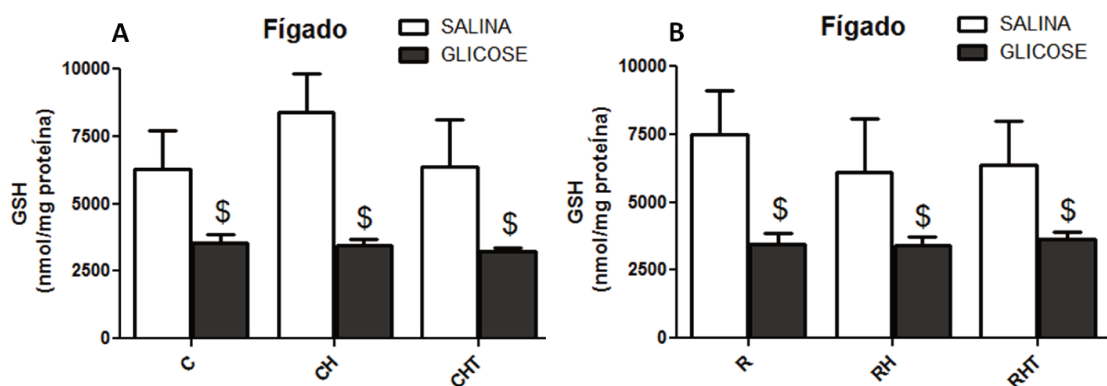


Fig. 12 – Dosagem de Glutathiona total em fígado de camundongos *C57BL/6* machos controle (C), controle + dieta hiperlipídica (CH) e controle + dieta hiperlipídica + taurina (CHT) (A) e restrito (R), restrito + hiperlipídica (RH) e restrito + hiperlipídica + tautina (RHT) (B). As barras brancas representam animais sem tratamento (salina) e as barras pretas representam camundongos *C57BL/6* machos após 30 minutos de aplicar glicose (2g G/Kg) (glicose). n = 4–10. Valores representam média ± EPM. \$ representa diferença estatística em relação ao grupo salina dos animais que receberam a mesma dieta, (Teste “t” student).

A tabela 5 mostra a expressão gênica das enzimas antioxidantes e de proteínas da via de sinalização da insulina no fígado: superóxido dismutase 1 (SOD1), superóxido dismutase 2 (SOD2), glutathiona peroxidase 1 (GPX1) e catalase (CAT), receptor de insulina (IR) e proteína quinase B (AKT). Não observamos mudanças estatisticamente significativas

no perfil da expressão gênica de nenhuma das variáveis analisadas, com exceção do grupo RHT que apresentou um aumento significativo do IR em relação ao grupo R e RH.

Tab.5 – Expressão Gênica da SOD1, SOD2, CAT, GPx1, IR e AKT de fígado de camundongos C56BL/6 controle (C), controle + hiperlipídica (CH), controle + hiperlipídica + taurina (CHT), restrito (R), restrito + hiperlipídica (RH) e restrito + hiperlipídica + taurina (RHT) tratados durante 105 dias. Após 30 minutos da aplicação intraperitoneal de salina.

	C	CH	CHT	R	RH	RHT
SOD1/GAPDH	1,00	1,50± 0,46	1,09± 0,09	1,01± 0,17	1,08± 0,26	1,16± 0,15
SOD2/GAPDH	1,00	1,56± 0,34	1,16± 0,07	0,97± 0,10	1,18± 0,12	1,29± 0,14
CAT/GAPDH	1,00	1,49± 0,27	1,03± 0,27	1,06± 0,16	1,50± 0,02	1,65± 0,23
GPx1/GAPDH	1,00	1,42± 0,18	1,11± 0,14	0,88± 0,05	0,99± 0,20	0,89± 0,07
IR/GAPDH	1,00	1,59± 0,22	2,53± 0,66	0,94± 0,08	1,20± 0,21	3,03± 0,41 ^{&#}
AKT/GAPDH	1,00	1,31± 0,17	1,10± 0,07	0,97± 0,16	1,13± 0,09	1,49± 0,21

1 Valores representam média ± EPM. Para a SOD1 n= 3-4, SOD2 n= 3-4, CAT n= 4, GPx1 n= 3-4, IR n= 3-4 e AKT n= 4.

2[#] representa diferença estatística em relação ao grupo R, P < 0.05 (ANOVA de uma via e pós teste de Tukey).

3[&] representa diferença estatística em relação ao grupo RH, P < 0.05 (ANOVA de uma via e pós teste de Tukey).

De forma similar ao observado na expressão gênica, quando analisamos o conteúdo protéico das enzimas antioxidantes (figura 13 A, B, C, D, E e F), não observamos diferenças significativas entre os grupos.

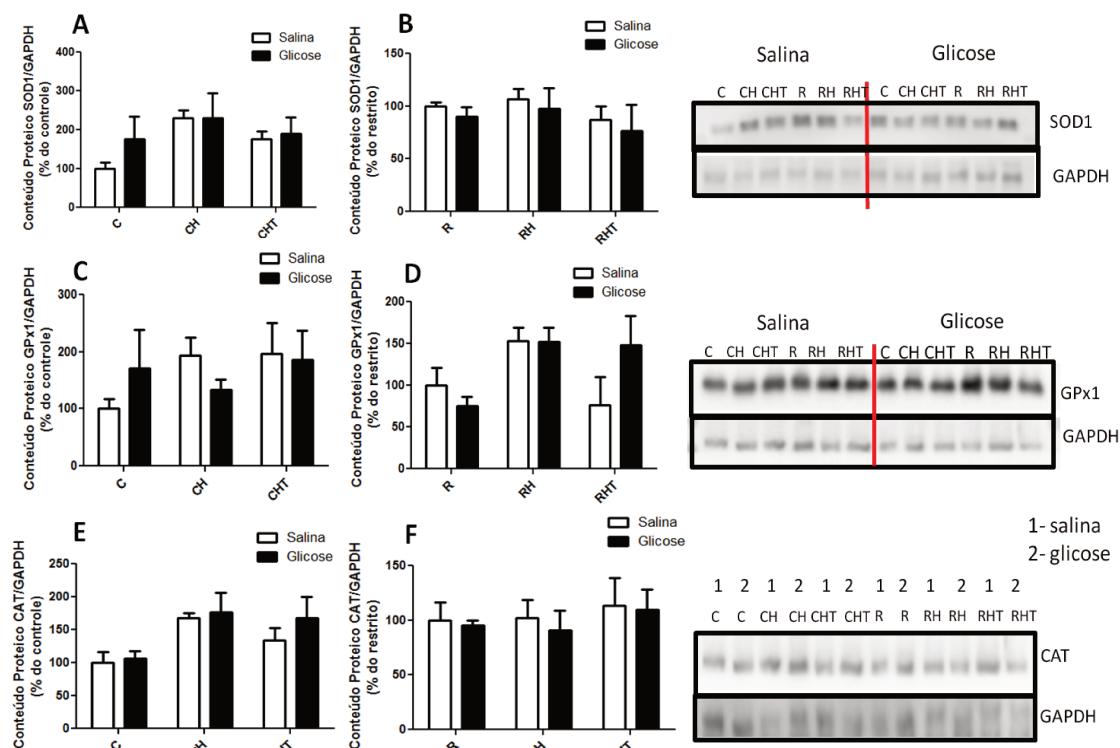


Fig. 13- Análise do conteúdo proteico de fígado (A e B) SOD1, (C e D) GPx1 e (E e F) CAT em camundongos C57BL/6 machos controle (C), controle + dieta hiperlipídica (CH) e controle + dieta hiperlipídica + taurina (CHT) (A) e restrito (R), restrito + hiperlipídica (RH) e restrito + hiperlipídica + taurina (RHT) após 30min da aplicação de salina (barras brancas) ou glicose (barras pretas). n= 3-4. Valores representam média ± EPM. P < 0.05 (ANOVA de uma via e pós teste de Tukey).

Após obtermos os dados moleculares de expressão gênica e conteúdo proteico das enzimas antioxidantes, verificamos o conteúdo proteico das proteínas envolvidas na via de sinalização da insulina.

Podemos observar nas figuras 14 A, B, C, D, E, F, G e H os níveis de ativação do IR, PTP1B, AKT e da PTEN através de suas respectivas fosforilações.

As figuras 14 A e B mostram que não houve diferença no conteúdo proteico do p-IR em nenhum dos grupos. Enquanto as figuras 14 C e D, apesar de não apresentarem diferenças significativas, os grupos que receberam o estímulo com glicose apresentam um aumento, do conteúdo proteico da PTP1B fosforilada, de 133,2% (C), 57,74% (CH) e 22,02% (CHT) em relação ao mesmo grupo que recebeu uma carga de salina.

Em relação à AKT uma importante proteína “*downstream*” da via de sinalização da insulina, observamos aumento, nos grupos que foram suplementados com taurina. O grupo

CHT salina apresentou um aumento significativo em relação ao C salina de 196%, enquanto o CHT glicose, apresentou um aumento não significativo de 60,15% em relação ao C estimulado com glicose. Já o grupo RH (glicose) e RHT (glicose) apresentaram um aumento não significativo de 64,40% e 164,97% em relação ao R (glicose).

As figuras 14 G e H mostraram que animais suplementados com taurina apresentaram um aumento significativo do conteúdo proteico da PTEN fosforilada.

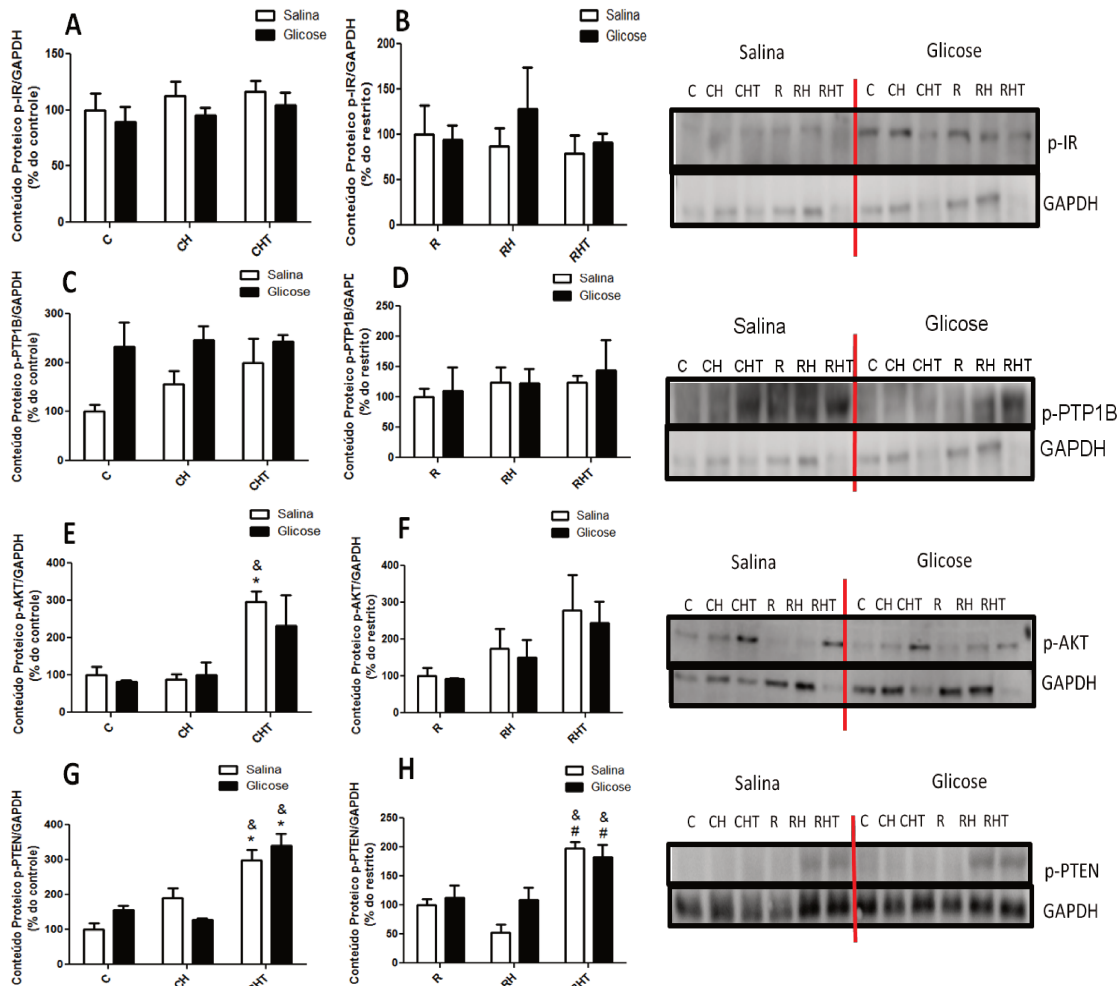


Fig. 14- Análise do conteúdo proteico de fígado (A e B) p-IR, (C e D) p-PTP1B, (E e F) p-AKT, e (G e H) p-PTEN em camundongos C57BL/6 machos controle (C), controle + dieta hiperlipídica (CH) e controle + dieta hiperlipídica + taurina (CHT) (A) e restrito (R), restrito + hiperlipídica (RH) e restrito + hiperlipídica + taurina (RHT) após 30min da aplicação de salina (barras brancas) ou glicose (barras pretas). n= 3-4. Valores representam média \pm EPM. * representa diferença estatística em relação ao C. # diferença significativa em relação ao grupo R. & representa diferença estatística, dentro do mesmo grupo, em relação ao grupo que recebeu dieta hiperlipídica sem suplementação com taurina, P < 0,05 (ANOVA de uma via e pós teste de Tukey).

4.3. Músculo

4.3.1. Verificação do estado redox - Concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e Dosagem da glutathiona reduzida (GSH) em músculo - Após injeção intraperitoneal de salina ou glicose 2g /Kg de peso do animal

Para verificar o balanço redox, foi medida a concentração de peróxido de hidrogênio (figura 15) e da GSH (figura 16) em músculo de camundongos *C56BL/6* de nossos grupos experimentais. Observamos que no músculo de animais que receberam a carga de glicose (estimulados), ocorre uma redução de 83,78% (C), 74,16% (CH), 73,74% (CHT), 74,66% (R), 65,52% (RH) e 81,31% (RHT) nos níveis de H_2O_2 , em relação aos animais que não receberam estímulo (basal).

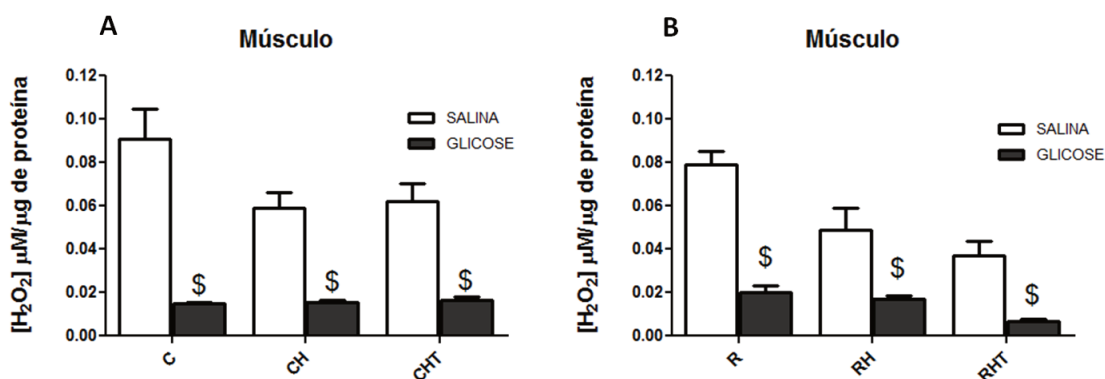


Fig. 15 – Concentração de H_2O_2 em músculo de camundongos *C57BL/6* machos controle (C), controle + dieta hiperlipídica (CH) e controle + dieta hiperlipídica + taurina (CHT), (A) e restrito (R), restrito + hiperlipídica (RH) e restrito + hiperlipídica + taurina (RHT) (B). Os animais receberam dieta entre os 21 e 105 dias de vida. As barras brancas representam animais sem tratamento (salina) e as barras pretas representam camundongos *C57BL/6* machos após 30 minutos de aplicar glicose (2g G/Kg) (glicose). n= 3- 9. Valores representam média \pm EPM. \$ representa diferença estatística em relação ao grupo salina dos animais que receberam a mesma dieta, (Teste “t” student).

Analisamos, então, a concentração de GSH, para verificar qual o efeito da carga de glicose no balanço redox desses grupos. Observamos que o músculo de animais C, CHT, R e RHT, quando estimulados, apresentam uma redução de 32,25% (C), 60,27% (CHT), 45,41% (R) e 59,66% (RHT) na concentração de GSH em relação ao seu respectivo basal (figura 16 e 16B). No entanto, o grupo CH apresentou redução de 0,91% e o grupo RH apresentou aumento de 17,64% em relação ao seu respectivo basal, diferenças estas não significativas.

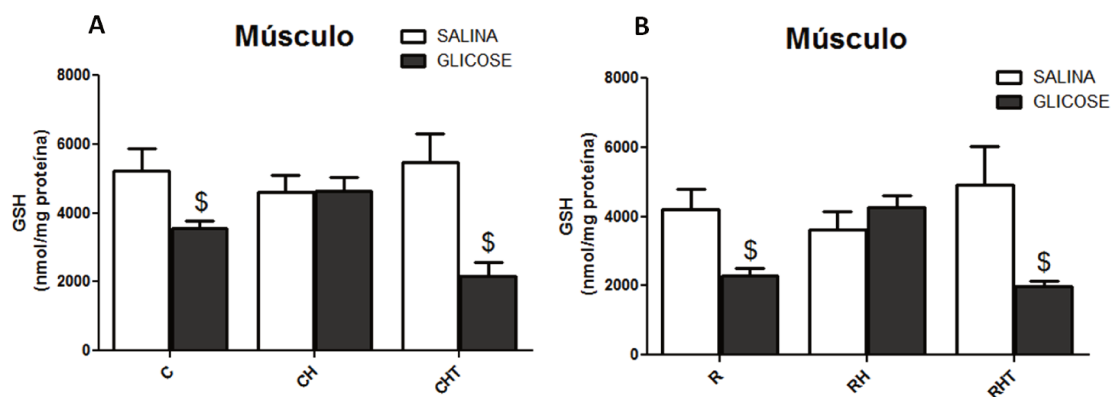


Fig. 16 – Dosagem de Glutathiona total em músculo de camundongos *C57BL/6* machos controle (C), controle + dieta hiperlipídica (CH) e controle + dieta hiperlipídica + taurina (CHT) (A) e restrito (R), restrito + hiperlipídica (RH) e restrito + hiperlipídica + tautina (RHT) (B). As barras brancas representam animais sem tratamento (salina) e as barras pretas representam camundongos *C57BL/6* machos após 30 minutos de aplicar glicose (2g G/Kg) (glicose). n = 6-11. Valores representam média ± EPM. ^{\$} representa diferença estatística em relação ao grupo salina dos animais que receberam a mesma dieta, (Teste “t” student).

A tabela 6 mostra a expressão gênica das enzimas antioxidantes e de proteínas da via de sinalização da insulina no músculo: superóxido dismutase 1 (SOD1), superóxido dismutase 2 (SOD2), glutathiona peroxidase 1 (GPX1), catalase (CAT), receptor de insulina (IR) e proteína quinase B (AKT). Observamos que não há alterações significativas na expressão gênica dessas proteínas.

Tab.6 – Expressão Gênica da SOD1, SOD2, CAT, GPx1, IR e AKT de músculo de camundongos *C56BL/6* controle (C), controle + hiperlipídica (CH), controle + hiperlipídica + taurina (CHT), restrito (R), restrito + hiperlipídica (RH) e restrito + hiperlipídica + taurina (RHT) tratados durante 105 dias. Após 30 minutos da aplicação intraperitoneal de salina.

	C	CH	CHT	R	RH	RHT
SOD1/GAPDH	1,00	1,18± 0,13	1,00± 0,06	1,15± 0,29	0,86± 0,17	1,95± 0,75
SOD2/GAPDH	1,00	1,05± 0,13	0,78± 0,17	0,92± 0,15	0,87± 0,18	1,27± 0,23
CAT/GAPDH	1,00	1,29± 0,20	1,40± 0,15	0,99± 0,23	1,00± 0,10	1,31± 0,13
GPx1/GAPDH	1,00	0,99± 0,21	0,98± 0,28	1,83± 0,33	0,75± 0,14	1,07± 0,42
IR/GAPDH	1,00	0,60± 0,09	0,95± 0,18	0,71± 0,30	1,24± 0,52	0,50± 0,08
AKT/GAPDH	1,00	1,07± 0,11	0,85± 0,07	1,18± 0,09	0,92± 0,07	1,07± 0,04

1 Valores representam média ± EPM. Para a SOD1 n= 3-4, SOD2 n= 4, CAT n= 3-4, GPx1 n= 4, IR n= 3-4 e AKT n= 4.

2 P < 0,05 (ANOVA de uma via e pós teste de Tukey).

Quando analisamos o conteúdo proteico das enzimas antioxidantes após um estímulo com glicose, (figuras 17 A, B, C, D, E e F), apesar de não apresentarem diferenças significativas, essas proteínas apresentaram aumento em grande parte dos grupos, quando comparados ao controle respectivo. Podemos destacar aumentos de 110,55% (C), 77,60% (CH), 148,71% (CHT), 67,73% (R), 63,30% (RH) e 129,46% (RHT) no conteúdo proteico da SOD1 (figura 14 A e B). Quando observamos o conteúdo proteico da GPX1 (figura 14 C e D), observamos que apenas o grupo RHT (glicose) apresentou um aumento significativo de 169,72% em relação ao respectivo grupo injetado com salina.

As figuras 17 E e F mostram aumento, não significativo, quando estimulados com glicose, no conteúdo proteico da CAT de 104,4% (C), 99,91% (R), 68,24% (RHT) e apresentam, ainda, aumentos significativos de 218,80% (CH), 233,72% (CHT) e 112,04% (RH) em relação ao grupo salina correspondente.

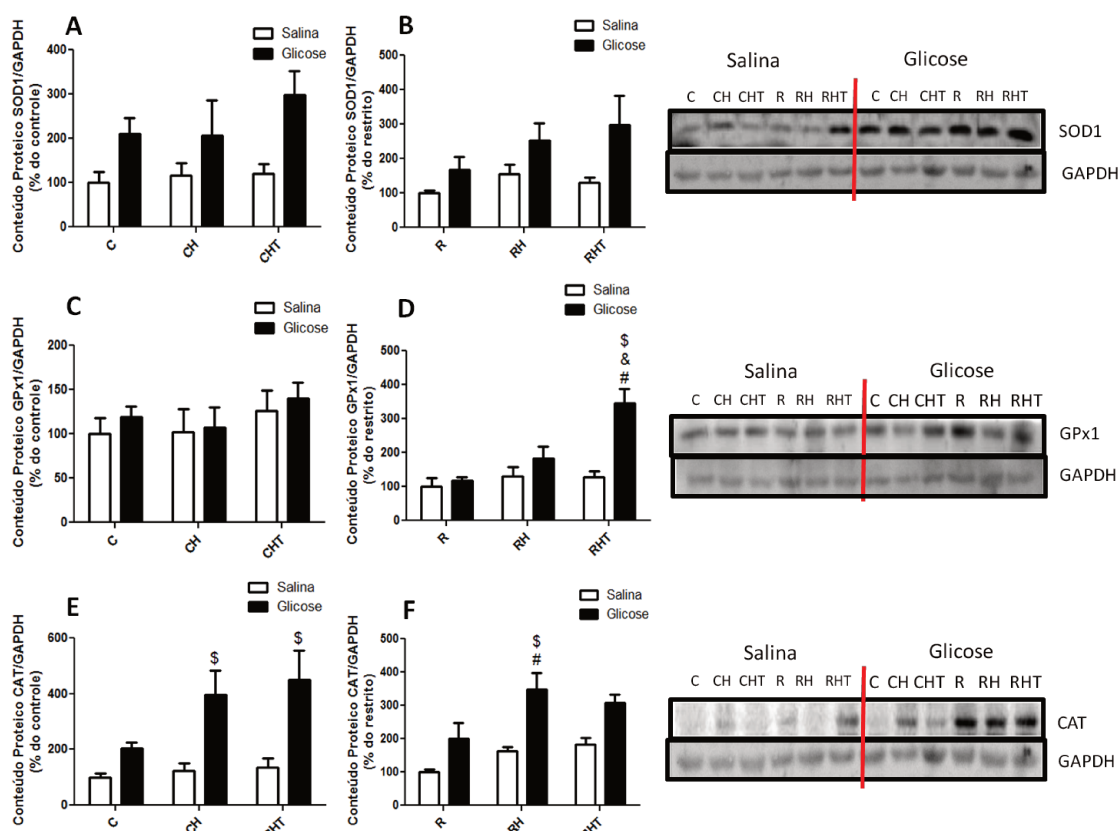


Fig. 17- Análise do conteúdo proteico de músculo (A e B) SOD1, (C e D) GPX1 e (E e F) CAT em camundongos C57BL/6 machos controle (C), controle + dieta hiperlipídica (CH) e controle + dieta hiperlipídica + taurina (CHT) (A) e restrito (R), restrito + hiperlipídica (RH) e restrito + hiperlipídica + taurina (RHT) após 30min da aplicação de salina (barras brancas) ou glicose (barras pretas). n = 3-4. Valores representam média ± EPM. # diferença significativa em relação ao grupo R. & representa diferença estatística em relação ao grupo RH. \$ diferença estatística em relação ao mesmo grupo que recebeu salina. P < 0.05 (ANOVA de uma via e pós teste de Tukey).

Após obtermos os dados moleculares de expressão gênica e conteúdo proteico das enzimas antioxidantes, verificamos o conteúdo proteico das enzimas da via de sinalização da insulina.

Podemos observar nas figuras 18A, B, C, D, E, F, G e H os níveis de ativação do IR, PTP1B, AKT e da PTEN através de suas respectivas fosforilações.

As figuras 18A e B mostram aumentos, não significativos, na fosforilação do IR, quando estimulado com glicose, de 23,2% (C), 25,63% (CH), 27,39% (CHT) e 45,24% (R), em relação ao mesmo grupo que recebeu salina. Os grupos RH (glicose) e RHT (glicose) não apresentaram alterações na fosforilação do IR em relação ao grupo salina correspondente. Quando observamos as figuras 18E e F, verificamos que a fosforilação da AKT apresenta o mesmo perfil de aumento, em relação ao grupo salina, não significativo, mostrando um aumento de 34,92% (C), 73,36% (CHT) e 37,06% (R), no entanto os grupos CH, RH e RHT não apresentaram alterações na fosforilação da AKT quando estimulados com glicose, em relação à fosforilação basal (salina). Como esperado, ocorreu diminuição da fosforilação de IR e AKT nos grupos alimentados com HFD, enquanto aumento da fosforilação das mesmas proteínas foi observado no grupo CHT, e não no grupo RHT. Analisando o conteúdo proteico da fosforilação do IR e da fosforilação da AKT podemos observar que os animais que receberam dieta HFD apresentam maior resistência à insulina e que a taurina consegue reverter esse efeito apenas no animal controle.

As figuras 18C e D mostram a fosforilação em serina 50 (S50) da PTP1B em nossos grupos experimentais. Nossos resultados mostram que quando estimulados com glicose esses grupos apresentam redução, não significativa, na fosforilação da PTP1B de 25,67% (C), 36,12% (CH), 32,23% (R), 41,42% (RH), 60,58% (RHT), o grupo CHT não apresenta diferença entre o grupo salina e glicose. Observamos ainda nas figuras 18G e H que ocorrem o mesmo perfil de redução, não significativo, na fosforilação da PTEN após a administração da carga de glicose, mostrando, redução de 42,97% (C), 28,09% (CH), 25,26% (R), 41,46% (RH), 46,20% (RHT), da mesma maneira que na fosforilação da PTP1B nos respectivos grupos. O grupo CHT não apresentou alterações na fosforilação da PTEN, entre os grupos salina e glicose. Analisando o conteúdo proteico da fosforilação da PTP1B e da fosforilação da PTEN podemos observar que esses resultados não estão de

acordo com o que encontramos na fosforilação do IR e da AKT, indicando que, no músculo, essa modulação pelas fosfatases parece estar ocorrendo por outra via.

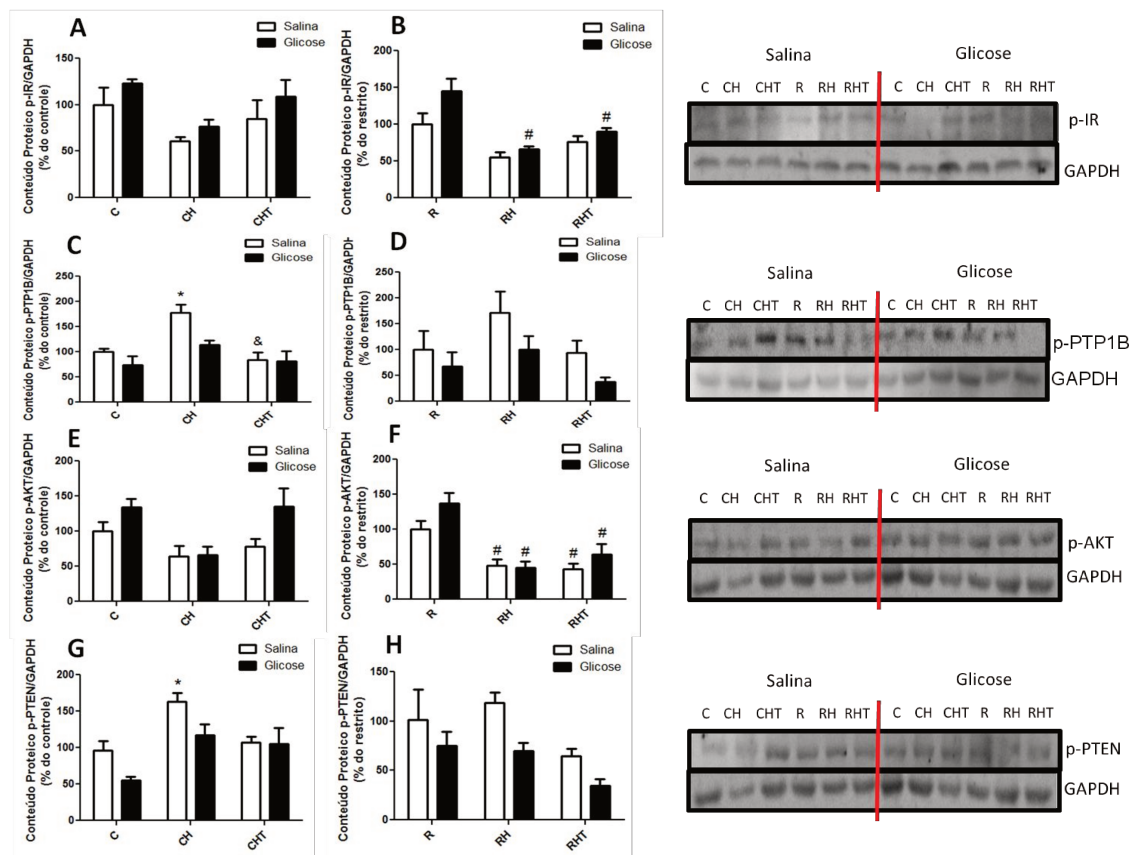


Fig. 18- Análise do conteúdo proteico de músculo (A e B) p-IR, (C e D) p-PTP1B, (E e F) p-AKT, e (G e H) p-PTEN em camundongos C57BL/6 machos controle (C), controle + dieta hiperlipídica (CH) e controle + dieta hiperlipídica + taurina (CHT) (A) e restrito (R), restrito + hiperlipídica (RH) e restrito + hiperlipídica + taurina (RHT) após 30min da aplicação de salina (barras brancas) ou glicose (barras pretas). (n= 3-4). Valores representam média \pm EPM. * representa diferença estatística em relação ao grupo C. # diferença significativa em relação ao grupo R. & representa diferença estatística em relação ao grupo CH. P < 0.05 (ANOVA de uma via e pós teste de Tukey).

4.4. Ilhota pancreática

4.4.1. Verificação da modulação redox - Secreção de insulina

Após tratamento com as dietas, os animais tiveram as ilhotas isoladas e submetidas à secreção estática de insulina. Durante o período de pré-incubação (30 minutos) as ilhotas foram expostas a 5,6 mM de glicose com ou sem 10 μ M de DPI. Após esse período de pré-incubação, as ilhotas ficaram expostas por 1 hora em tampão contendo 16,7 mM de glicose com ou sem 10 μ M de DPI (figura 19). Observa-se na figura 19A que as ilhotas dos

animais controles que receberam HFD apresentam secreção de insulina aumentada em relação às ilhotas de animais controles e que a suplementação com taurina restabeleceu essa secreção a níveis do controle. Essa figura mostra também, que quando expostas ao DPI, as ilhotas de animais controle tratados com HFD diminuem significativamente a secreção de insulina comparada ao mesmo grupo sem DPI.

Quando observamos a figura 19B, vimos que, quando exposta a altas concentrações de glicose (16,7 mM) as ilhotas de animais restritos apresentam secreção de insulina semelhante, independentemente da dieta. Já quando observamos o efeito da inibição da NADPHoxidase pelo DPI, observamos que apenas as ilhotas de restrito apresentaram um aumento na secreção de insulina, indicando que as ilhotas desses animais sofrem ação da NADPHoxidase (maior geração de ROS) prejudicando a secreção de insulina destes.

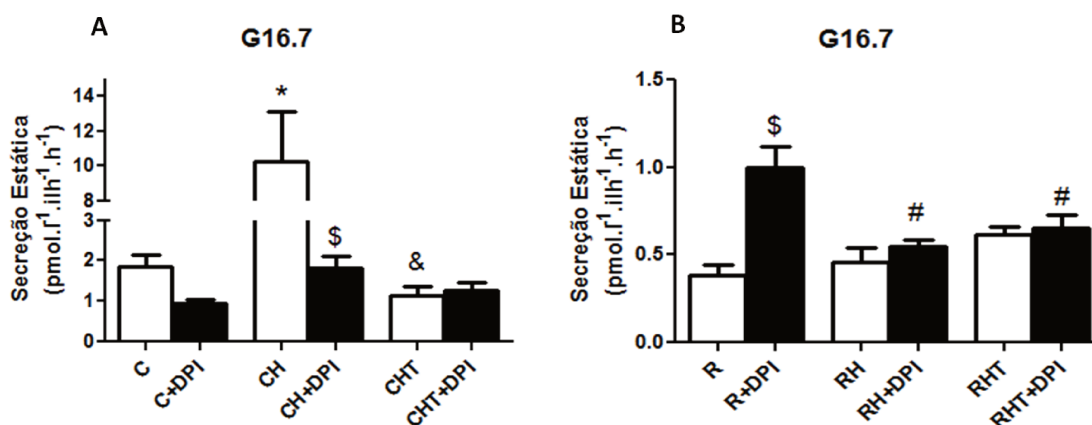


Fig. 19 - Secreção de insulina por ilhotas pancreáticas isoladas de camundongos C57BL/6 machos controle (C), controle + dieta hiperlipídica (CH) e controle + dieta hiperlipídica + taurina (CHT) (A) e restrito (R), restrito + hiperlipídica (RH) e restrito + hiperlipídica + taurina (RHT). As ilhotas foram pré-incubadas em solução de Krebs contendo 5,6 mM de glicose com ou sem 10 μ M DPI durante 30 minutos. Após a retirada do meio de pré-incubação, as ilhotas foram expostas durante 1 hora à solução de Krebs contendo 16,7 mM de glicose na presença (barras brancas) ou ausência (barras pretas) de DPI (n = 12- 45). Valores representam média \pm EPM. * representa diferença estatística em relação ao grupo C. # representa diferença significativa em relação ao grupo R. & representa diferença estatística em relação ao grupo CH. \$ representa diferença estatística entre o mesmo grupo salina. P < 0.05 (ANOVA de uma via e pós teste de Tukey).

5. DISCUSSÃO

5.1. Parâmetros gerais

Com relação ao modelo experimental de desnutrição, nosso grupo vem mostrando que estes animais apresentam aumento da tolerância à glicose e diminuição da secreção de insulina estimulada por glicose (Latorraca *et al.*, 1998; Filiputti *et al.*, 2008). Outros dados da literatura mostram, ainda, menor capacidade das enzimas antioxidantes e maior susceptibilidade das ilhotas de animais desnutridos aos efeitos das ROS (Mann *et al.*, 1975 ; Parra *et al.*, 1975; Cappelli APG – enviado para publicação). Por outro lado, no modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica verifica-se menor sensibilidade periférica à insulina, hiperinsulinemia e aumento na expressão tecidual e níveis circulantes de citocinas inflamatórias acompanhados pelo aumento do estresse oxidativo (Cintra *et al.*, 2008; Lalli *et al.*, 2008).

Tendo em vista essas evidências, postulamos que animais submetidos a um período de restrição proteica possam estar mais susceptíveis aos efeitos deletérios promovidos pela obesidade induzida por dieta hiperlipídica. A investigação do balanço redox nesses animais pode ajudar a compreender como ocorre a modulação e funcionamento dos tecidos de camundongos submetidos à restrição proteica por 45 dias, seguida por dieta hiperlipídica (Hales & Barker 1992; Fagot-Campagna *et al.*, 2000 ; Fleischman *et al.*, 2009). Ainda neste contexto, acreditamos que a suplementação com taurina possa ser uma estratégia eficiente para prevenir os efeitos da dieta hipoproteica e hiperlipídica visto seus efeitos sobre o controle da homeostase glicêmica (Ribeiro *et al.*, 2009), função pancreática (Carneiro *et al.*, 2008), modulação da resposta inflamatória (Park *et al.*, 1993; Park *et al.*, 1995; Park *et al.*, 1998) e efeito antioxidante (Schaffer *et al.*, 2009).

Em acordo com resultados prévios de nosso laboratório, os dados deste estudo mostram que os protocolos de desnutrição e obesidade foram eficientes em induzir as alterações esperadas.

Os animais R tiveram um ganho de peso menor, maior tolerância à glicose, diminuição do fígado, pâncreas e das proteínas totais em relação ao grupo C, característica observada em modelos experimentais de desnutrição (Ferreira *et al.*, 2003; Ferreira *et al.*, 2004; Filiputti, 2006; Filiputti *et al.*, 2008). A redução do ganho de peso na desnutrição tem sido relacionada a alterações funcionais e morfológicas, principalmente no pâncreas

exócrino e no epitélio entérico, que comprometem a digestão e absorção de nutrientes (Torun *et al.*, 1994). Dessa forma, a ingestão inadequada de proteínas retarda o crescimento devido à sua inerente menor oferta de aminoácidos para síntese proteica aliada à redução no aproveitamento alimentar (Manzano, 2001; Marcondes, 1976). O aumento da ingestão de caloria leva a um aumento de peso, o que é um indicativo básico de obesidade (Buettner *et al.*, 2007). A obesidade pode levar a diversas alterações metabólicas como: altos níveis de proteínas totais, colesterol, aumento da glicose e insulina em jejum, resistência à insulina dentre outras alterações (Buettner *et al.*, 2007).

Dados da literatura mostram que a prole de camundongos desnutridos, alimentados a partir de 8 semanas de idade por um período de 12 semanas com dieta rica em gordura apresentam um aumento no peso e na adiposidade em relação à prole de desnutridos que receberam dieta controle (Sutton *et al.*, 2010).

A desnutrição materna (desnutrição calórica, restrição proteica, ou ligadura uterina) durante as várias etapas da gravidez resulta em hiperleptinemia e obesidade na prole. Estes fatores são exacerbados pela alimentação hipercalórica na vida adulta (Langley-Evans., 2006). A restrição proteica materna quando administrada a roedores, reduz o peso dos filhotes ao nascimento, sugerindo um retardo de crescimento intrauterino (RCIU). Isso é compensado pela rápida recuperação do crescimento na idade adulta em ratos que tiveram RCIU relacionadas à desnutrição proteica. Estes animais apresentam, no entanto, uma tendência exacerbada para o desenvolvimento da obesidade induzida por alimentos e hiperinsulinemia (Barker *et al.*, 1993; Hales & Barker, 2001).

Outros fatores que levam ao ganho de peso são: ingesta alimentar, conteúdo calórico e gasto energético. Nossos resultados mostraram que a ingesta alimentar é igual em todos os grupos, com exceção do grupo CHT que ingeriu menos dieta. No entanto, os animais que receberam dieta HFD ingerem mais caloria e gastam menos ou a mesma quantidade de energia, já os grupos suplementados com taurina ingerem a mesma ou maior quantidade de caloria, porém gastam a mesma quantidade de energia quando comparados com o controle correspondente, justificando o aumento de peso nos animais submetidos à HFD e uma pequena redução do ganho de peso quando suplementados com taurina.

O corpo oxida carboidratos, gordura e proteínas para manter seu peso estável, e para isso, devem balancear as quantidades destes nutrientes. Isto é, a manutenção do equilíbrio

energético requer que a mistura desses combustíveis consumidos sejam oxidados. A capacidade do corpo para armazenar carboidratos como glicogênio é muito limitado, assim como sua capacidade de armazenar proteína (Bray GA., 2004). Apenas os estoques de gordura podem facilmente se expandir para acomodar o aumento dos níveis de consumo de energia acima dos exigidos para as necessidades diárias de energia. Há evidências de que o aumento da taxa de oxidação de carboidratos, que pode ser avaliada pelo aumento do coeficiente respiratório, seja um indicativo de um futuro ganho de peso (Zurlo *et al.*, 1990). Uma explicação para isso é que, quando a oxidação de carboidratos excede sua ingestão, os estoques dos mesmos tendem a reduzir. Para substituí-lo, seria necessário aumentar a ingesta de carboidrato ou reduzir sua oxidação, já que o organismo não pode converter ácidos graxos em carboidratos (Bray GA., 2004).

Essas alterações no peso corpóreo se dão devido ao desequilíbrio entre o conteúdo calórico ingerido e o gasto energético. Quando ingerida uma grande quantidade de caloria e o gasto energético é baixo (insuficiente para queima-la) ocorre um aumento do peso corpóreo. Já quando esse conteúdo calórico ingerido é baixo e o gasto energético é alto, ocorre uma diminuição do peso corpóreo (Bray GA., 2004). Assim, de acordo com os resultados do coeficiente respiratório (RQ) dos animais que receberam HFD, com valores próximos a 1, e significativamente aumentado no grupo restrito submetido à HFD, sugere que a ingestão de maior conteúdo calórico (porém, sem alteração na ingesta) levou ao aumento da oxidação de nutrientes indicado pelo RQ.

Dados da literatura mostram diferentes interações da taurina e obesidade. Tsuboyama-Kasaoka *et al.* (2006) verificaram que a suplementação com 5% de taurina a camundongos alimentados com HDF protegeu contra o ganho de peso e acúmulo de gordura corpórea sem interferir na ingesta alimentar. Os autores atribuem esses efeitos a maior expressão no tecido adiposo de genes que regulam o metabolismo lipídico e mitocondrial como PGC-1 α , PPAR γ , fator respiratório nuclear 2 α (NRF2 α) e a lipoproteína lípase (LPL) que contribuíram para a normalização do metabolismo basal, o qual estava reduzido nos animais obesos.

Outro trabalho conduzido em ratos Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF), um modelo de diabetes tipo 2 que apresenta hiperfagia, obesidade e resistência à insulina, mostrou que a suplementação com taurina não reduziu o peso corpóreo nem a gordura

abdominal, mas teve melhora significativa na tolerância a glicose e sensibilidade à insulina (Nakaya *et al.*, 2000). Essas evidências apontam para um requerimento diferencial de taurina entre espécies para que seu efeito antiobesidade se manifeste. No nosso estudo, o tratamento com taurina reduziu, parcialmente, o aumento do coeficiente respiratório, provocado pela HFD, nos grupos CHT e RHT, mostrando um papel benéfico desse aminoácido sobre os efeitos da dieta rica em gordura. Portanto, nossos dados mostraram que o tratamento com dieta hipoproteica induziu desnutrição, observado nos parâmetros estudados, e que o tratamento com HDF foi eficiente para induzir obesidade (tabela 4).

5.1.1. Tolerância à glicose e sensibilidade à insulina

Em acordo com dados da literatura (Ribeiro *et al.*, 2012), nossos resultados mostram que animais que receberam dieta HFD apresentam-se intolerantes à glicose, enquanto os animais desnutridos apresentam uma maior tolerância à glicose. A suplementação com taurina aumentou a tolerância à glicose em CHT embora não tenha sido observado efeito significativo no grupo RHT.

Observamos diferença significativa entre C e R, dado de acordo com a literatura, que indica que a desnutrição proteica (grupo R) aumenta a sensibilidade à insulina (Rao, 1988; Hales & Barker, 1992; De Oliveira *et al.*, 2011), enquanto o tratamento com HFD leva à instalação de um quadro de resistência periférica (Schenk *et al.*, 2008). Em adição, nossos dados evidenciam que a taurina não reverteu esse quadro de resistência à insulina nos grupos CHT nem no RHT.

No entanto, o kITT/15 min não indica essa diferença entre C e R, o que sugere que essa maior sensibilidade apresentada pelo desnutrido se dá após 15 minutos, levantando a hipótese de haver uma participação dos hormônios contra-regulatórios de ação rápida (glucagon e/ou adrenalina) sobre o controle da homeostase glicêmica nesse modelo animal de desnutrição. Estudos recentes mostram que camundongos Swiss, tratados por 8 semanas com dieta hipoproteica apresentam uma maior produção de glicogênio hepático, o que vem sendo associado com o aumento da sensibilidade à insulina hepática, fortalecendo nossos dados (Marroquí *et al.*, 2011).

De acordo com os dados de ITT o coeficiente respiratório (RQ) dos animais que receberam HFD foram próximos a 1, o que indica diminuição da sensibilidade à insulina (Galvani *et al.*, 2008b). De uma forma geral, estes dados corroboram com nossos dados de ITT, os quais mostraram que animais tratados com HFD apresentaram-se resistentes a insulina. Esses dados nos permite dizer que os animais dos grupos CH e RH, que receberam HFD, são menos sensíveis à insulina e que a taurina parece não ter efeito nesse parâmetro. Trabalhos mais recentes vem dando um enfoque diferente, analisando não o valor absoluto mas sim a variação do RQ no jejum e no estado alimentado (Galvani *et al.*, 2008a). Apesar deste trabalho não mostrar a flexibilidade metabólica de nossos grupos experimentais, dados de nosso laboratório mostram que animais que receberam HFD apresentam uma maior inflexibilidade metabólica, de acordo com a literatura.

5.2. Fígado

5.2.1. Estado redox e sinalização hepática da insulina

A fim de obtermos uma resposta fisiológica, avaliamos a influência do estado redox sobre a resistência periférica à insulina nos tecidos (fígado e músculo), para isso, quantificamos uma série de variáveis que participam do balanço redox e da cascata de sinalização da insulina em condições basais (salina) e após estímulo com uma carga de glicose.

Observando os resultados dos animais que foram estimulados com glicose por 30 minutos, vimos em nossos dados que, no fígado, ocorre uma maior produção de H_2O_2 e uma redução na GSH em todos os grupos. A diminuição da concentração de GSH sugere um aumento do consumo desta molécula, a fim de remover a grande quantidade de H_2O_2 produzido. Já no caso dos animais suplementados com taurina, a concentração aumentada de H_2O_2 , aliada ao menor consumo da GSH em relação ao grupo salina, sugere um desbalanço redox nos grupos CHT e RHT. De fato, não foram observadas diferenças significativas na expressão gênica e conteúdo proteico das enzimas antioxidantes em relação ao grupo controle correspondente, indicando que no fígado a manutenção redox não está ocorrendo via o sistema glutatona reduzida/ glutatona oxidada.

Neste sentido, trabalhos utilizando suplementação com substâncias antioxidantes mostraram melhora no balanço redox de animais submetidos à dieta hiperlipídica. Estudo utilizando camundongos C57BL/6J tratados por 12 semanas com dieta hiperlipídica + apocinina (antioxidante), diluída na água de beber, por 5 semanas, mostrou aumento da atividade da SOD, glutathiona peroxidase e conteúdo de GSH. Em adição, o mesmo estudo mostrou que a atividade da catalase hepática diminuiu significativamente após o tratamento com antioxidante, indicando que a apocinina reduziu o peróxido de hidrogênio e o desbalanço redox no fígado. Os autores sugerem que a apocinina pode melhorar a sensibilidade à insulina, reduzindo o estresse oxidativo sistêmico em ratos alimentados com dieta hiperlipídica (Meng *et al.*, 2011).

Em adição, outro trabalho utilizando ratos tratados por 6 semanas com dieta hiperlipídica e suplementados com raiz de lótus e taurina (3%), mostrou que a atividade das enzimas antioxidantes foi maior nos grupos que receberam suplementação com os antioxidantes em relação ao grupo que recebeu apenas dieta hiperlipídica. Estes dados demonstram o efeito antioxidante protetor contra a obesidade induzida pela dieta hiperlipídica (Du *et al.*, 2010).

A literatura mostra que a taurina além de ter um efeito antioxidante, (Aerts & Van Assche, 2002; Ragheb *et al.*, 2009) melhora a tolerância a glicose e sensibilidade à insulina (Nakaya *et al.*, 2000). Assim, utilizamos neste estudo a suplementação com taurina diluída na água de beber, como antioxidante, a fim de investigarmos seu efeito em nossos modelos experimentais.

Nossos resultados mostraram que a taurina não foi totalmente eficiente em reduzir o desbalanço redox hepático, causado pela carga de glicose. Entretanto, nossos dados mostram uma possível associação entre o efeito da taurina na sinalização intracelular da insulina. Podemos observar nas figuras 16 A, B, C, D, E, F, G e H os níveis de ativação do IR, PTP1B, AKT, e PTEN através de suas respectivas fosforilações.

Os animais tratados com dieta hiperlipídica e suplementados com taurina demonstraram uma tendência de aumento na fosforilação da AKT, e aumento na fosforilação da PTEN, proporcionando assim, aumento na ativação da cascata de sinalização da insulina no fígado.

Estudos anteriores utilizando protocolo de restrição proteica intra-uterina e pós desmame mostraram que não houve efeito significativo de privação de proteína sobre os

níveis de fosforilação do IR no fígado e no músculo de ratos desnutridos por 8 semanas (Reis *et al.* 1997). Por outro lado, estudos utilizando os mesmos modelos, mostraram que a privação de proteína até a 12^a semana de idade aumentou significativamente os níveis de fosforilação do IR no músculo esquelético. Portanto parece existir uma relação tempo dependente entre os níveis de fosforilação do IR e a desnutrição proteica (Latorraca *et al.*, 1998). Sabe-se ainda que, animais tratados com dieta rica em lipídeos são mais resistentes à insulina (Schenk *et al.*, 2008). Nossos resultados corroboram os dados da literatura, demonstrando que os animais que receberam HFD apresentaram maior resistência à insulina enquanto os animais que receberam HFD e foram suplementados com taurina apresentam maior sensibilidade, considerando-se o nível de fosforilação da AKT.

A proteína fosfatase e homóloga a tensina (PTEN), sofre modulação redox, transformando fosfatidilinositol (3-4-5) trifosfato (PIP3) em fosfatidilinositol (4-5) bifosfato (PIP2). Devido essa característica redox, fomos investigar esta proteína a fim de identificar um possível mecanismo envolvido na modulação redox da sinalização da insulina em nossos grupos (Lee *et al.*, 2002; Maehama *et al.*, 1998; Maehama *et al.*, 2001).

Os estudos envolvidos nos mecanismos de regulação redox da sinalização da PI3-quinase, concentraram-se principalmente sobre a família das fosfatases dependentes de cisteína, o que inclui a PTEN, e proteínas tirosina fosfatase (PTPs). Fortes evidências suportam um papel fisiológico para essas proteínas como alvos de ROS na regulação da sinalização da PI3-quinase por muitos estímulos (Leslie NR, 2006; Leslie *et al.*, 2004; Rhee *et al.*, 2005; Salmeen *et al.*, 2005; Tonks *et al.*, 2005).

Outros trabalhos mostram, ainda, que a PTP1B pode ser modulada pela AKT. Esta fosforila a PTP1B no resíduo de serina 50 tornando-a inativa e permitindo que a sinalização intracelular da insulina ocorra (Ravichandran *et al.*, 2001). Nesta forma ela não desfosforila os resíduos de tirosina do IR e IRS1, permitindo que a via de sinalização da insulina fique ativa, porém esse efeito parece ocorrer em uma fase mais tardia, pois não conseguimos observar em nossos resultados essa modulação na PTP1B.

Se observarmos nossos dados de H₂O₂, GSH e conteúdo proteico da p-PTEN, podemos ver que nossos resultados mostram que animais suplementados com taurina não alteram sua capacidade antioxidante enquanto a concentração de H₂O₂ está aumentada e esta, por sua

vez, modula a PTEN aumentando a fosforilação desta e consequentemente ativando a via de sinalização da insulina no fígado.

Portanto, nossos resultados permitem sugerir que a taurina atua na modulação da PTEN e, consequentemente, sobre a sinalização hepática da insulina via ativação da AKT, favorecendo a ação deste hormônio em animais que receberam dieta hiperlipídica e foram suplementados com taurina.

5.3. Músculo

5.3.1. Estado redox e sinalização da insulina no músculo esquelético

Os experimentos em músculo procederam da mesma maneira que os experimentos em fígado. Observando os resultados dos animais que foram estimulados com glicose por 30 minutos, vimos que em músculo, diferentemente do fígado, ocorre uma menor concentração de H_2O_2 e uma redução na concentração de GSH nos grupos C, CHT, R, RHT. Os grupos CH e RH não alteraram a concentração de GSH em relação ao seu respectivo salina. A redução dos níveis de H_2O_2 em 30 minutos após uma carga de glicose mostra que a modulação redox, nesse tempo, apresenta um padrão distinto do que observamos na literatura, que mostra aumento na sua produção (Goldstein *et al.*, 2005). Embora, nosso objetivo tenha sido analisar uma regulação aguda da modulação redox, nós não observamos resultados semelhantes ao encontrado na literatura provavelmente devido ao tempo utilizado. Podemos observar em nossos dados de GTT que após 45 minutos a glicemia já apresenta redução em relação ao pico (30 minutos), indicando influxo de glicose no músculo por ação da insulina. O aumento da metabolização da glicose eleva os níveis de H_2O_2 (Goldstein *et al.*, 2005). Embora, em 30 minutos, verificamos aumento dos níveis de glicemia e insulinemia conforme o esperado, os níveis de H_2O_2 apresentaram-se baixos em relação aos animais que receberam salina. Esses dados sugerem que, nesse tempo, o influxo de glicose seria menor e consequentemente a produção de H_2O_2 também.

Anderson *et al.*, (2009) trataram ratos machos Sprague-Dawley por 6 semanas com dieta hiperlipídica com ou sem administração intraperitoneal diária de um antioxidante (SS31) e verificaram que animais que receberam HFD apresentaram uma produção

aumentada de H_2O_2 mitocondrial e que a presença do antioxidante reverteu esse aumento no músculo. Verificaram ainda que após 1 hora da aplicação de uma carga oral de glicose, o músculo dos animais controle e dos animais que receberam HFD apresentaram um aumento na glutatona oxidada (GSSG) e uma redução na razão GSH/GSSG enquanto os animais que receberam antioxidante não apresentaram alterações nesses parâmetros. O aumento de H_2O_2 associado ao aumento da GSSG e diminuição da GSH/GSSG leva a um estado oxidado neste tecido (Anderson et al., 2009). Nossos dados também mostraram um aumento do estado oxidado, sugerindo que a diminuição da GSH pode estar ocorrendo devido ao aumento do consumo desta molécula a fim de remover o H_2O_2 produzido. Já no caso dos animais tratados com HFD, a menor quantidade de H_2O_2 , aliada a não alteração no conteúdo de GSH, pode ser um indicativo do desbalanço redox mais acentuado nestes grupos.

O fato do estímulo com glicose não ter alterado a quantidade de GSH nos animais que receberam HFD levantou algumas hipóteses. Uma delas é de que o animal obeso não seja capaz de reduzir a GSSG adequadamente, corroborando com resultados de Anderson et al., (2009), devido a um prejuízo da função da glutatona redutase. A segunda hipótese é que o animal que recebeu HFD apresenta uma redução nos níveis de NADPH e, dessa maneira, menor quantidade de substrato para reduzir a GSSG em GSH. A terceira hipótese é que esses animais simplesmente não utilizam o ciclo da glutatona, sendo suficiente apenas a utilização da CAT para remover o H_2O_2 .

Por outro lado, a taurina parece reverter o efeito gerado pela HFD na quantidade de GSH após estímulo com glicose, diminuindo a concentração de GSH, mostrando que a taurina é importante para a manutenção do ciclo da glutatona no músculo.

Analisando nossos resultados, após 30 minutos de uma aplicação intraperitoneal de glicose, não observamos alterações na expressão gênica das enzimas antioxidantes em amostras de músculo. No entanto, apesar do conteúdo proteico da SOD não ter apresentado diferença significativas após uma carga de glicose, todos os grupos apresentaram aumento, o que foi acompanhado por um aumento ainda mais significativo no conteúdo proteico da CAT, o que justifica a redução dos níveis de H_2O_2 nos grupos CH, CHT e RH. Já quando observamos o conteúdo proteico da GPx1 verificamos que o grupo RHT (glicose) apresentou aumento significativo em relação ao grupo R, RH e ao RHT (salina), indicando

que, para esse grupo, o ciclo da glutathiona reduzida/ glutathiona oxidada está sendo essencial para a manutenção do estado redox.

O músculo responde de forma diferente do fígado a variações do estado redox, o que incorre numa sinalização insulínica diferenciada entre esses tecidos.

Analisando os níveis de fosforilação do IR e da AKT observamos que, quando estimulados com glicose, os grupos apresentaram uma tendência de aumento, o que não ocorre nos grupos que receberam HFD. Observamos, ainda, que as fosfatases não modularam o IR e nem a AKT, diferentemente do que ocorre no fígado, sugerindo que essa modulação redox no músculo deve ocorrer por outra via.

Trabalhos mostram que o H_2O_2 por si só pode induzir a autofosforilação em tirosina do receptor de insulina na ausência de insulina, e que a oxidação de cisteínas no domínio quinase do receptor de insulina, previne a inibição causada pela ligação do ADP (Schmid *et al.*, 1998; de Keizer *et al.*, 2011). Além disso, a AKT é diretamente regulada pela oxidação de cisteínas, formando uma ligação de dissulfeto entre Cys 297 e Cys 311 na AKT quando na presença de ROS (Huang *et al.*, 2003; de Keizer *et al.*, 2011). Essa formação de dissulfeto sob a exposição a altas concentrações de ROS inativa a AKT por criar uma superfície de ligação para a proteína fosfatase 2 (PP2A), aumentando a resistência à insulina (de Keizer *et al.*, 2011).

Dessa maneira, uma explicação possível, é de que no músculo, os baixos níveis de H_2O_2 estão modulando diretamente o IR e AKT, de forma que o H_2O_2 estaria induzindo a autofosforilação do IR e diminuindo as ligações dissulfetos na AKT, conseqüentemente diminuindo a ação das PP2A e melhorando a ativação da AKT. Corroborando com os dados da literatura, os animais que receberam HFD apresentaram maior resistência à insulina, analisados pelo nível de fosforilação do IR (Schenk *et al.*, 2008). A taurina reverteu esse efeito apenas no grupo CHT. Sugerindo que, para esse grupo, a ação antioxidante da taurina é eficaz em manter os níveis de H_2O_2 necessários para modular o IR e AKT. Esses dados sugerem que a HFD desregula a modulação redox no músculo enquanto a taurina, de alguma forma, atenua o efeito induzido pela HFD. Esses dados até agora nos permite verificar que frente a um aporte de glicose os tecidos respondem de maneiras diferentes à modulação redox.

No entanto, nossos dados de H_2O_2 no músculo esquelético, são controversos e não apresentaram os resultados por nós esperados (semelhantes aos encontrados no fígado). Acreditamos que esta diferença possa ser devido ao tempo de exposição à alta glicose antes da coleta das amostras. É possível que o músculo leve um tempo maior para sofrer alterações redox, tendo em vista o diferente tempo da ação da insulina entre estes tecidos. (Kraegen et al., 1991).

5.4. Ilhota

5.4.1. Secreção de insulina na ilhota pancreática

Nossos resultados mostraram que a modulação redox leva a alterações na resistência à insulina nos tecidos periféricos. Essa modulação redox ocorre, também, na ilhota pancreática aumentando ou diminuindo a secreção de insulina frente a diferentes concentrações de H_2O_2 (Newsholme et al., 2007; Leloup et al., 2009; Pi et al., 2007), e alguns trabalhos mostram possíveis vias envolvidas nessa modulação redox na ilhota (Newsholme et al., 2009; Morgan et al., 2009; Garciano et al., 2011). Dessa maneira, iniciamos um estudo com ilhotas pancreáticas para tentar mostrar como essa modulação pode estar ocorrendo nos nossos grupos experimentais.

Levando-se em conta que ilhotas isoladas expostas a baixas concentrações de H_2O_2 (1-4 μ M), na presença de 3mM de glicose, promovem aumento da secreção de insulina (Pi et al., 2007) e que o sistema NADPH oxidase é uma fonte de O_2^- e, subsequentemente, de H_2O_2 (Peter et al., 2011), avaliamos a participação da enzima NAD(P)H oxidase na produção de ROS em nossos modelos experimentais sobre a função da célula-beta. Para isso, avaliamos qual o efeito da inibição dessa enzima sobre a secreção de insulina.

Visto que alguns trabalhos mostraram papel fundamental da NADPH oxidase na secreção de insulina de ilhotas de animais controle quando estimulados com 16,7mM de glicose (Morgan D et al, 2009), realizamos, então, ensaios de secreção de insulina em que ilhotas isoladas dos diferentes grupos foram expostas a altas concentrações de glicose, na presença ou ausência do inibidor da NADPH oxidase, DPI.

A literatura mostra que a inibição do complexo NADPH oxidase pelo DPI provoca uma redução na secreção de insulina na concentração de 16,7 mM de glicose (Morgan D *et al.*, 2009). Nossos dados de secreção de insulina de ilhotas de animais controle nas mesmas condições, apesar de não ter apresentado diferença estatística, apresentou redução de 48,75%, semelhante a do trabalho citado acima. Essa diferença significativa é vista quando aplicamos teste “t” Student entre os grupos C e C+DPI.

Esse papel importante da NADPH oxidase sobre a secreção de insulina de ilhotas de animais controle, incubadas com 16,7mM de glicose, parece estar relacionado ao aumento do metabolismo de glicose e da atividade da NADPH oxidase, levando a um aumento da produção de H₂O₂ e aumentando a secreção de insulina. (Morgan D *et al.*, 2009; Rebelato E *et al.*, 2012)

As ilhotas dos grupos CH expostas à alta glicose (16,7mM) apresentaram um aumento na secreção de insulina em relação ao grupo C, em parte, devido ao aumento da concentração de ROS (Ribeiro *et al.*, 2012). A importância da NADPH oxidase pode ser observada através da secreção de insulina *in vitro* na presença do inibidor da enzima, o DPI. As ilhotas dos animais restritos quando expostas a 16,7mM de glicose + DPI têm aumento na secreção de insulina. A presença do DPI inibi a atividade da NADPH oxidase e consequentemente diminui os níveis de ROS. Essa concentração de ROS diminuída favoreceu a secreção de insulina no grupo R. Nas ilhotas de animais dos grupos RH e RHT a NADPH oxidase não interfere na secreção de insulina, o que pode ser observado através da secreção de insulina destes grupos quando as ilhotas foram expostas ao DPI. Assim, as ilhotas dos grupos RH e RHT não alteram o padrão de secreção de insulina, na presença de DPI, em relação ao respectivo grupo na ausência de DPI, o que indica provável perda dessa modulação pela NADPH oxidase.

Vários estudos têm demonstrado que a taurina está presente em células fagocíticas e oferece proteção contra a citotoxicidade causada por ROS. A reação entre a taurina e HOCl, um produto tóxico do sistema mieloperoxidase (MPO), gera um produto mais estável e menos tóxicos, chamado taurina cloramina (TauCl). A TauCl inibe a superprodução de O₂⁻ em neutrófilos murinos e humanos, de maneira dose-dependente e reversível (Kim *et al* 1996;. Park *et al* 1998;. Witko *et al* 1992.). Estes trabalhos sugerem que a TauCl inibe a produção excessiva de O₂⁻ e protege as células da citotoxicidade causada pelo estresse

oxidativo. Sabe-se ainda, que a TauCl inibe a fosforilação da p47^{phox} estimulada por PMA (ativador da PKC) em neutrófilos, a qual é necessária para a formação do complexo NADPH oxidase funcional (Choi et al. 2006) sendo a etapa seguinte igualmente inibida pela TauCl, fazendo com que não ocorra a translocação da p47^{phox} e p67^{phox} para interagir com o citocromo b558, que está localizada na membrana plasmática (Choi et al. 2006).

Nossos dados mostram que a suplementação dos animais com taurina em alta concentração de glicose inibe a ação da NADPH oxidase nas ilhotas, visto que o perfil de secreção das ilhotas expostas ao DPI é semelhante ao do respectivo grupo sem a presença do mesmo. Esses dados sugerem que a taurina tenha ação sobre a PKC inibindo a fosforilação e translocação da p47^{phox} para a membrana plasmática e, conseqüentemente, diminuindo a produção de ROS (Choi et al, 2006).

Com esses dados levantamos a hipótese de que a ação da NADPH oxidase ocorreria através da mobilização de cálcio intracelular, uma vez que estudos mostraram um aumento na secreção de insulina de ilhotas pancreáticas expostas a baixas concentrações de H₂O₂ (1-4μM) na presença de 3mM de glicose. Esse efeito é parcialmente abolido em meio livre de cálcio, mostrando que o H₂O₂ promove secreção de insulina dependente de Ca⁺² extracelular (Pi et al., 2007). Por outro lado H₂O₂ induz fosforilação em tirosina da PLCγ nas células HL60, produzindo IP₃, o qual se liga ao receptor IP₃/Ca⁺² no retículo endoplasmático elevando o cálcio intracelular (Kamata et al., 1999). Além disso, a atividade do canal de Ca⁺²/ATPase e a do trocador Na⁺/Ca⁺² é modulada pelo estado redox da célula, regulando os níveis de Ca⁺² intracelular.

Dessa forma, o H₂O₂ pode agir aumentando o [Ca⁺²]_i por dois mecanismos nas células-beta: aumentando a liberação de Ca⁺² dos estoques intracelulares e pelo aumento do influxo do Ca⁺² através da membrana plasmática por ativação do canal de Ca⁺² tipo L (Nakazaki et al., 2000).

Com esses dados acima apresentados, podemos concluir que a desnutrição proteica no pós desmame seguida pela HFD e suplementação com taurina elimina a modulação da secreção da insulina via NADPH oxidase.

Como dito acima, esse trabalho é apenas o início de uma investigação mais profunda. Para elucidar os mecanismos que atuam na modulação redox da secreção de

insulina é necessário verificar a atividade da PKC, SERCA3, a $[Ca^{2+}]_i$, as possíveis modulações nos canais de Ca^{2+} , bem como do trocador Na^+ / Ca^{2+} .

6. CONCLUSÃO

Nossos dados sugerem que as concentrações aumentadas de ROS nos grupos CHT e RHT, aumentam a ativação da PTEN, no entanto, a taurina teria ação sobre esta proteína induzindo sua fosforilação e inativando-a, permitindo uma maior fosforilação da AKT. A PTEN, quando regulada pela taurina, age, também, diretamente fosforilando a AKT, o que sugere que a taurina estimularia a sinalização da insulina no fígado.

No músculo, observamos que o grupo CHT não apresentou alterações no conteúdo proteico da SOD e da GPx, porém, apresentou diminuição da concentração de GSH e aumento do conteúdo proteico da CAT, sugerindo uma diminuição da concentração de H₂O₂ nesse grupo, mediante injeção de glicose. Esta concentração de H₂O₂ favorece diretamente a fosforilação do IR e, conseqüentemente, ativação da PI3K e fosforilação da AKT. Além disso, essa concentração de H₂O₂ apresentada pelo grupo CHT também estaria agindo diretamente sobre a AKT, aumentando sua fosforilação, favorecendo, assim, maior translocação de GLUT4 para a membrana plasmática, permitindo maior influxo de glicose. Já o grupo RHT não apresentou alterações na SOD, GPx e CAT, apenas uma diminuição da GSH, sugerindo uma redução menos acentuada dos níveis de H₂O₂. Este age sobre o IR e AKT, inibindo-os, e dessa maneira não ocorre à sinalização da insulina.

Na ilhota, sugerimos que a taurina teria ação sobre a secreção de insulina inibindo a formação do complexo NADPH oxidase. A taurina agiria sobre a PKC inibindo-a, e desta maneira, diminuindo a fosforilação da p47^{phox} e, portanto, desfavorecendo sua translocação até a membrana para formar o complexo NADPH oxidase. A concentração de ROS nestes grupos (CHT e RHT) parece não ser suficiente para promover o aumento de Ca²⁺ no citosol para promover, junto as ROS, um aumento da secreção de insulina.

Dessa maneira, concluímos que a taurina no grupo CH favorece a sinalização da insulina, no fígado e tende a melhorar a sinalização da insulina no músculo, e melhora a tolerância à glicose, sem alteração da secreção de insulina. No grupo RH, a taurina melhora a sinalização da insulina no fígado, mas não altera a sinalização da insulina no músculo e melhora parcialmente a tolerância à glicose, sem alteração da secreção de insulina. Assim, a suplementação com taurina poderia ser utilizada como terapia complementar no tratamento da resistência à insulina e diabetes tipo 2, no entanto, essa terapia seria mais eficiente em animais que receberam dieta nornoproteica e hiperlipídica do que em animais que receberam dieta hipoproteica e hiperlipídica.

7. REFERÊNCIAS

- Abo A, Webb MR, Grogan A, Segal AW.** Activation of NADPH oxidase involves the dissociation of p21rac from its inhibitory GDP/GTP exchange protein (rhoGDI) followed by its translocation of the plasma membrane. **Biochem J.** v. 298, n. 3: p. 585-91, 1994
- Aerts L & Van Assche FA.** Taurine and taurine-deficiency in the perinatal period. **J Perinat Med** v. 30, p. 281-286, 2002
- Amati F, Dubé JJ, Alvarez-Carnero E, Edreira MM, Chomentowski P, Coen PM, Switzer GE, Bickel PE, Stefanovic-Racic M, Toledo FG, Goodpaster BH.** Skeletal muscle triglycerides, diacylglycerols, and ceramides in insulin resistance: another paradox in endurance-trained athletes? **Diabetes.** v.60, n. 10, p. 2588-97, 2011.
- Anderson EJ, Lustig ME, Boyle KE, Woodlief TL, Kane DA, Lin CT, Price JW 3rd, Kang L, Rabinovitch PS, Szeto HH, Houmard JA, Cortright RN, Wasserman DH, Neuffer PD.** Mitochondrial H₂O₂ emission and cellular redox state link excess fat intake to insulin resistance in both rodents and humans. **J Clin Invest.** v. 119, n. 3, p. 573-81, 2009
- Aruoma OI., Halliwell B., Hoey BM., and Butler J.** The antioxidant action of taurine, hypotaurine and their metabolic precursors. **Biochem. J.** v. 256, p. 251-255, 1988
- Barker DJ, Gluckman PD, Godfrey KM, Harding JE, Owens JA, Robinson JS** Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. **Lancet** v. 341, p. 938–941, 1993
- Batandier C, Guigas B, Detaille D, El-Mir MY, Fontaine E, Rigoulet M, and Leverve XM.** The ROS production induced by a reverse-electron flux at respiratory-chain complex 1 is hampered by metformin. **J Bioenerg Biomembr** v. 38, p. 33–42, 2006
- Bindokas VP, Kuznetsov A, Sreenan S, Polonsky RS, Roe MW, Philipson LH.** Visualizing superoxide production in normal and diabetic rat islets of Langerhans. **J. Biol. Chem.** v. 278, p. 9796–9801, 2003
- Bokoch GM, Diebold BA.** Current molecular models for NADPH oxidase regulation by Rac GTPase. **Blood.** v. 100, n. 8, p. 2692-6, 2002
- Bokoch GM, Knaus UG.** Ras-related GTP-binding proteins and leukocyte signal transduction. **Curr Opin Hematol.** v. 1, n. 1, p. 53-60, 1994
- Bol VV, Delattre AI, Reusens B, Raes M, Remacle C.** Forced catch-up growth after fetal protein restriction alters the adipose tissue gene expression program leading to obesity in adult mice. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** v. 297, n. 2, p. R291-9, 2009
- Bourne LC, Rice-Evans CA.** Detecting and measuring bioavailability of phenolics and flavonoids in humans: pharmacokinetics of urinary excretion of dietary ferulic acid. **Methods in Enzymology** v. 299, p. 91-106, 1999
- Bray GA.** How do we get fat? An epidemiologic and metabolic approach. **Clin Dermatol.** v. 22, n. 4, p. 281-8, 2004
- Buettner R, Schölmerich J, Bollheimer LC.** High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. **Obesity (Silver Spring).** v. 15, n. 4, p. 798-808, 2007
- Calegari VC, Zoppi CC, Rezende LF, Silveira LR, Carneiro EM and Boschero AC.** Endurance training activates AMP-activated protein kinase, increases expression of uncoupling protein 2 and reduces insulin secretion from rat pancreatic islets. **Journal of Endocrinology** v. 208, p. 257–264, 2011

- Cappelli APG. **Modulação da secreção de insulina por estresse oxidativo induzido em ilhotas pancreáticas de animais submetidos à restrição protéica.** 2009. Tese de mestrado Curso de pós-graduação BFM: Fisiologia, UNICAMP, Campinas, 2009
- Carneiro EM, Latorraca MQ, Araujo E, Beltra M, Oliveras MJ, Navarro M, Berna G, Bedoya FJ, Velloso LA, Soria B & Martin F. **Taurine supplementation modulates glucose homeostasis and islet function.** *J Nutr Biochem.* , 2008
- Carneiro EM, Mello MAR, Gobatto CA & Boschero AC. **Low protein diet impairs glucose-induced insulin secretion from and ⁴⁵Ca uptake by pancreatic rat islets.** *J. Nutr Biochem v. 6, p. 314- 318, 1995*
- Cerqueira FM, Medeiros MHG, Augusto A. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. *Química Nova v. 30, n. 2, p. 441-449, 2007*
- Cheng A, Dubé N, Gu F, Tremblay ML. Coordinated action of protein tyrosine phosphatases in insulin signal transduction. *Eur J Biochem.* v. 269, n. 4, p. 1050-9, 2002
- Choi HS, Cha YN, Kim C. Taurine chloramine inhibits PMA-stimulated superoxide production in human neutrophils perhaps by inhibiting phosphorylation and translocation of p47(phox). *Int Immunopharmacol.* v. 6, n. 9, p. 1431- 40, 2006
- Cintra DE, Pauli JR, Araujo EP, Moraes JC, de Souza CT, Milanski M, Morari J, Gambero A, Saad MJ & Velloso LA. **Interleukin-10 is a protective factor against diet-induced insulin resistance in liver.** *J Hepatol v. 48, p. 628-637, 2008*
- Cheong SH, Moon SH, Lee SJ, Kim SH, Chang KJ. Antioxidant and dna protective effects of taurine by eletron spin resonance spectroscopy. In: **Taurine 8.** New York: Springer, 2013
- Cook DL & Hales CN. Intracellular ATP directly blocks K⁺ channels in pancreatic B-cells. *Nature v. 311, p. 271-273, 1984*
- Czech MP, Lawrence JC Jr., and Lynn WS. Evidence for the involvement of sulfhydryl oxidation in the regulation of fat cell hexose transport by insulin. *Proc Natl Acad Sci USA v. 71, p. 4173-4177, 1974*
- De Oliveira CA, Latorraca MQ, de Mello MA, Carneiro EM. Mechanisms of insulin secretion in malnutrition: modulation by amino acids in rodent models. *Amino Acids.* v. 40, n. 4, p. 1027-34, 2011
- De Souza JC. Atividade Antioxidante in vitro e in vivo de suco de uva e da Norbixina. **Tese de Mestrado.** Curso de pós graduação FEA: Alimentos e nutrição, UNICAMP, 2008
- Diederichs F. Ion homeostasis and the functional roles of SERCA reactions in stimulus-secretion coupling of the pancreatic beta-cell: A mathematical simulation. *Biophys Chem.* v. 134, n. 3, p. 119-43, 2008
- Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* v. 82, n. 1, p. 47-95, 2002
- Du H, Zhao X, You JS, Park JY, Kim SH, Chang KJ. Antioxidant and hepatic protective effects of lotus root hot water extract with taurine supplementation in rats fed a high fat diet. *J Biomed Sci.* v. 17 p. Suppl 1:S39, 2010
- Eizirik DL, Cardozo AK, Cnop M. The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. *Endocr Rev.* v. 29, n. 1, p. 42-61, 2008
- Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? *Diabetes v. 52, n. 1, p. 1-8, 2003*

- Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM.** Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. **Endocr Rev.** v. 23, n. 5, p. 599-622, 2002
- Fagot-Campagna A, Pettitt DJ, Engelgau MM, Burrows NR, Geiss LS, Valdez R, Beckles GL, Saaddine J, Gregg EW, Williamson DF, Narayan KM.** Type 2 diabetes among North American children and adolescents: an epidemiologic review and a public health perspective. **J Pediatr.** v. 136, p. 664–672, 2000
- Faure, P.; Lafond, J.L.** Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. **In: Analysis of free Radicals in biological systems.** Ed. Verla Boston p. 237-248, 1995
- Fernandez-Twinn DS, Wayman A, Ekizoglou S et al.** Maternal protein restriction leads to hyperinsulinemia and reduced insulin-signaling protein expression in 21-mo-old female rat offspring. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** v. 288, R368-R373, 2005
- Ferreira F, Barbosa HCL, Stoppiglia LF, Delghingaro – Augusto V, Pereira EA, Boschero AC and Carneiro EM.** Decreased insulin secretion in islets from rats fed a low protein diet is associated with a reduced PKA alpha expression **J. Nutr.** v. 134, p. 63-67, 2004
- Ferreira F, Filiputti E, Arantes VC, Stoppiglia LF, Araújo RP, Delghingaro – Augusto V, Latorraca MQ, Toyama MH, Boschero AC, Carneiro EM.** Decreased cholinergic stimulation of insulin secretion by islets from rats fed a low protein diet is associated with reduced protein kinase calpha expression., **J Nutr.** v. 133, n. 3, p. 695-9, 2003
- Filiputti E, Ferreira F, Souza KLA, Stoppiglia LF, Arantes VC, Boschero AC and Carneiro EM.** Impaired insulin secretion and decreased expression of the nutritionally responsive ribosomal kinase protein S6K-1 in pancreatic islets from malnourished rats. **Life Sci.** v. 82, n. 9-10, p. 542-8, 2008
- Filiputti E. **Regulação da Secreção de Insulina em Ilhotas de Langherhans de Ratos Submetidos à Restrição Protéica e Suplementados com Leucina.** 2006. 103f. Tese Doutorado. Curso de pós-graduação BFM: Fisiologia, UNICAMP, Campinas, 2006
- Fischer LJ, Hamburger SA.** Inhibition of alloxan action in isolated pancreatic islets by superoxide dismutase, catalase, and a metal chelator. **Diabetes.** v. 29, n. 3, p. 213-6, 1980
- Fleischman A, Kron M, Systrom DM, Hrovat M, and Grinspoon SK.** Mitochondrial Function and Insulin Resistance in Overweight and Normal-Weight Children **J Clin Endocrin Metab.** First published ahead of print October 21, 2009
- Fujimoto S, Mukai E, Inagaki N.** Role of endogenous ROS production in impaired metabolism-secretion coupling of diabetic pancreatic β cells. **Prog Biophys Mol Biol.** v. 107, n. 2, p. 304-10, 2011
- Galgani JE, Heilbronn LK, Azuma K, Kelley DE, Albu JB, Pi-Sunyer X, Smith SR, Ravussin E; Look AHEAD Adipose Research Group.** Metabolic flexibility in response to glucose is not impaired in people with type 2 diabetes after controlling for glucose disposal rate. **Diabetes.** v. 57, n.4, p.841-5, 2008 (a)
- Galgani JE, Moro C, Ravussin E.** Metabolic flexibility and insulin resistance. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** v. 295, n. 5, p. E1009-17, 2008 (b)
- Golden MHN.** The development of concepts of malnutrition, **J. Nutrition.** v. 132, n. 7, p. 2117S-2122S, 2002

- Goldstein BJ, Mahadev K, Wu X, Zhu L, Motoshima H.** Role of Insulin-Induced Reactive Oxygen Species in the Insulin Signaling Pathway. **Antioxid Redox Signal.** v. 7, n. 7-8, p. 1021-31, 2005
- Graciano MF, Valle MM, Kowluru A, Curi R, Carpinelli AR.** Regulation of insulin secretion and reactive oxygen species production by free fatty acids in pancreatic islets **Islets.** v. 3, n. 5, p. 213-23, 2011
- Gual P, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF** Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. **Biochimie** v. 87, p. 99–109, 2005
- Gurgul E, Lortz S, Tiedge M, Jorns A, Lenzen S.** Mitochondrial catalase overexpression protects insulin-producing cells against toxicity of reactive oxygen species and proinflammatory cytokines. **Diabetes.** v. 53, p. 2271–2280, 2004
- Hales CN & Barker DJ. **Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis.** **Diabetologia** v. 35, p. 595-601, 1992
- Hales CN, Barker DJ** The thrifty phenotype hypothesis. **Br Med Bull** v. 60, p.5–20, 2001
- Halliwell B. & Gutteridge JMC. **Free radicals in biology and medicine.** 2^a ed. Oxford Claredon Press, 1999
- Hanna J., Chahine R., Aftimos G., Nader M., Mounayar A., Esseily F., and Chamat S.** Protective effect of taurine against free radicals damage in the rat myocardium. **Exp. Toxicol. Pathol.** v. 56, p. 189-194, 2004
- Henquin JC, Nenquin M, Stiernet P, Ahren B.** In vivo and in vitro glucose-induced biphasic insulin secretion in the mouse: pattern and role of cytoplasmic Ca²⁺ and amplifications signals in B-cells. **Diabetes.** v. 55, p. 441-451, 2006
- Hsu MF, Meng TC.** Enhancement of Insulin Responsiveness by Nitric Oxide-mediated Inactivation of Protein-tyrosine Phosphatases **J Biol Chem.** v. 285, n. 11, p. 7919-28, 2010
- Huang CJ & Fwu ML.** Degree of protein deficiency affects the extent of the depression of the antioxidative enzyme activities and the enhancement of tissue lipid peroxidation in rats. **J Nutr** v. 123, p. 803-810, 1993
- Huang TT, Qiu XS, Shen ZY et al.** The effects of pregnancy malnutrition on the development of insulin resistance in rat offspring. **Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi** v. 38, p. 182-185, 2004
- Imoto H, Sasaki N, Iwase M et al** Impaired insulin secretion by diphenyleneiodium associated with perturbation of cytosolic Ca²⁺ dynamics in pancreatic beta-cells. **Endocrinology** v. 149, p. 5391–5400, 2008
- Kahn SE, Hull RL & Utzschneider KM.** Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature** v. 444, p. 840-846, 2006
- Kamata H, Hirata H.** Redox Regulation of Cellula Signalling. **Cell. Signal.** v. 11, p. 1-14, 1999
- Kappeler L, De Magalhaes Filho C, Leneuve P et al.** Early postnatal nutrition determines somatotropic function in mice. **Endocrinology** v. 150, p. 314-323, 2009
- Kelly AS, Steinberger J, Kaiser DR, Olson TP, Bank AJ, Dengel DR.** Oxidative stress and adverse adipokine profile characterize the metabolic syndrome in children. **J Cardiometab Syndr** v. 1, n.4, p. 248-252, 2006
- Kim, C., Park, E., Quinn, M. R., and Schuller-Levis, G.,** The production of superoxide anion and nitric oxide by cultured murine leukocytes and the accumulation of TNF- α in the conditioned media is inhibited by taurine chloramine. **Immunopharmacology** v. 34, p. 89–95, 1996.

- Kraegen EW, Clark PW, Jenkins AB, Daley EA, Chisholm DJ, Storlien LH.** Development of muscle insulin resistance after liver insulin resistance in high-fat-fed rats. **Diabetes**.v. 40, n. 11, p. 1397-403, 1991
- Kreck ML., Freeman JL, Abo A., Lambeth JD.** Membrane association of Rac is requires for high activity of the respiratory burst oxidase. **Biochemistry**. v. 35, p. 15683-92, 1996
- Lalli CA, Pauli JR, Prada PO, Cintra DE, Ropelle ER, Velloso LA & Saad MJ. **Statin modulates insulin signaling and insulin resistance in liver and muscle of rats fed a high-fat diet.** **Metabolism** v. 57, p. 57-65, 2008
- Langley-Evans SC** Developmental programming of health and disease. **Proc Nutr Soc** v. 65, p. 97–105, 2006
- Langley-Evans SC, Bellinger L, McMullen S** Animal models of programming: early life influences on appetite and feeding behaviour. **Matern Child Nutr** v. 1, p. 142–148, 2005
- Latorraca MQ, Reis MAB, Carneiro EM, Mello MAR, Velloso LA, Saad MJA, Boschero AC.** Protein deficiency and nutritional recovery modulate insulin secretion and the early steps of insulin action in rats, **J. Nutr.** v. 128, p. 1643–1649, 1998
- Lee SR, Yang KS, Kwon J, Lee C, Jeong W, and Rhee SG.** Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H₂O₂. **J Biol Chem** v. 277, p. 20336–20342, 2002.
- Leloup C, Cuzin CT, Magnan C, Karaca M, Castel J, Carneiro L, Colombani AL, Ktorza A, Casteilla L, Pénicaud L.** Mitochondrial Reactive Oxygen Species Are Obligatory Signals for Glucose-Induced Insulin Secretion. **Diabetes** v. 58, n. 3, p. 673-681, 2009
- Lenzen S.** The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**. v. 51, n. 2, p. 216-26, 2008
- Leslie NR** The Redox Regulation of PI 3-Kinase–Dependent Signaling **Antioxid Redox Signal**.v. 8, n. 9-10, p. 1765-74, 2006
- Leslie NR, Lindsay Y, Ross SH, Downes CP.** Redox regulation of phoohate function. **Biochem Soc Trans**. v. 32, n. 6, p, 1018-20, 2004
- Li Y, Kim JG, Kim HJ, Moon MY, Lee JY, Kim J, Kim SC, Song DK, Kim YS, Park JB.** Small GTPases Rap1 and RhoA regulate superoxide formation by Rac1 GTPases activation during the phagocytosis of IgG-opsonized zymosans in macrophages. **Free Radic Biol Med**. v. 1, n. 52(9), p. 1796-805, 2012
- MacDonald MJ, Fahien LA, Brown LJ et al.** Perspective: emerging evidence for signaling roles of mitochondrial anaplerotic products in insulin secretion. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. v. 288, p. E1-E15, 2005
- Maechler P, Carobbio S, Rubi B.** In beta-cells, mitochondria integrate and generate metabolic signals controlling insulin secretion. **The Internal Journal of Biochemistry & Cell Biology** v. 38, p. 696-709, 2006
- Maehama T, Dixon JE.** The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. **J Biol Chem**. v. 29, n. 273(22), p. 13375-8, 1998
- Maehama T, Taylor GS, Dixon JE.** PTEN and myotubularin: novel phosphoinositide phosphatases. **Annu Rev Biochem**.v. ;70, p. 247-79, 2001
- Mahadev K, Motoshima H, Wu X, Ruddy JM, Arnold RS, Cheng G, Lambeth JD, and Goldstein BJ.** The NAD(P)H oxidase homolog Nox4 modulates insulin-

- stimulated generation of H₂O₂ and plays an integral role in insulin signal transduction. **Mol Cell Biol** v. 24, p. 1844–1854, 2004
- Malaisse WJ, Sener A.** Glucose-induced changes in cytosolic ATP content in pancreatic islets. **Biochim Biophys Acta.** v. 927, n. 2, p. 190-5, 1987
- Mandrup-Poulsen T.** beta-cell apoptosis: stimuli and signaling. **Diabetes** v. 50 Suppl 1, p. S58-63, 2001
- Mann MD, Becker DJ, Pimstone BL et al.** Potassium supplementation, serum immunoreactive insulin concentrations and glucose tolerance in protein-energy malnutrition. **Br. J. Nutr.** v. 33, p. 55-61, 1975
- Manzano AMC.** Hipoalbuminemia en diálisis: es marcador de desnutrición o de inflamación? **La Revista de Investigación Clínica** v. 53, n. 2, p. 152-8, 2001
- Marcondes E. **Desnutrição.** São Paulo: Savier, 1976
- Marroquí L, Batista TM, Gonzalez A, Vieira E, Rafacho A, Colleta SJ, Taboga SR, Boschero AC, Nadal A, Carneiro EM, Quesada I** Functional and structural adaptations in the pancreatic alpha-cell and changes in glucagon signaling during protein malnutrition **Endocrinology.** v. 153, n. 4, p. 1663-72, 2012
- Martin-Gronert MS, Tarry-Adkins JL, Cripps RL et al.** Maternal protein restriction leads to early life alterations in the expression of key molecules involved in the aging process in rat offspring. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** v. 294, R494-R500, 2008
- Matsuzawa-Nagata N, Takamura T, Ando H, Nakamura S, Kurita S, Misu H, Ota T, Yokoyama M, Honda M, Miyamoto K, Kaneko S.** Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and obesity. **Metabolism.** v. 57, n. 8, p. 1071-7, 2008
- Mehmeti I, Gurgul-Convey E, Lenzen S, Lortz S.** Induction of the intrinsic apoptosis pathway in insulin-secreting cells is dependent on oxidative damage of mitochondria but independent of caspase-12 activation. **Biochim Biophys Acta.** v. 1813, n. 10, p. 1827-35, 2011
- Meng R, Zhu DL, Bi Y, Yang DH, Wang YP.** Anti-oxidative effect of apocynin on insulin resistance in high-fat diet mice. **Ann Clin Lab Sci.** v. 41, n. 3, p. 236-43. 2011
- Morgan D, Oliveira-Emilio HR, Keane D et al.** Glucose, palmitate and pro-inflammatory cytokines modulate production and activity of a phagocyte-like NADPH oxidase in rat pancreatic islets and a clonal beta cell line. **Diabetologia** v. 50, p. 359–369, 2007
- Morgan D, Rebelato E, Abdulkader F et al.** Association of NAD(P)H oxidase with glucose-induced insulin secretion by pancreatic beta cells. **Endocrinology** v. 150, p. 2197–2201
- Morgan D, Rebelato E, Abdulkader F, Graciano MF, Oliveira-Emilio HR, Hirata AE, Rocha MS, Bordin S, Curi R, Carpinelli AR.** Association of NAD(P)H oxidase with glucose-induced insulin secretion by pancreatic beta-cells. **Endocrinology.** v. 150, n. 5, p. 2197-201, 2009
- Nakashima N, Sharma PM, Imamura T, Bookstein R, and Olefsky JM.** The tumor suppressor PTEN negatively regulates insulin signaling in 3T3-L1 adipocytes. **J Biol Chem** v. 275, p. 12889–12895, 2000

- Nakaya Y, Minami A, Harada N, Sakamoto S, Niwa Y, Ohnaka M.** Taurine improves insulin sensitivity in the Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rat, a model of spontaneous type 2 diabetes. **Am J Clin Nutr.** v. 71, n. 1, p. 54-8, 2000
- Nakazaki M., Kakei M., Yaekura K., Koriyama N., Morimitsu S., Ichinari K., Yada T, Tei C.** Diverse effects of hydrogen peroxide on cytosolic Ca⁺² homeostasis in rat pancreatic beta-cells. **Cell Struct Funct.** v.25, n. 3, p. 187-93, 2000
- Nardelli TR, Ribeiro RA, Balbo SL, Vanzela EC, Carneiro EM, Boschero AC, Bonfleur ML.** Taurine prevents fat deposition and ameliorates plasma lipid profile in monosodium glutamate-obese rats. **Amino Acids.** v. 41, n. 4, p. 901-8, 2011
- Newsholme P, Haber EP, Hirabara SM, Rebelato EL, Procopio J, Morgan D, Oliveira-Emilio HC, Carpinelli AR, Curi R.** Diabetes associated cell stress and dysfunction: role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity. **J Physiol.** v. 15, n. 583(Pt 1), p. 9-24, 2007
- Newsholme P, Morgan D, Rebelato E, Oliveira-Emilio HC, Procopio J, Curi R, Carpinelli A.** Insights into the critical role of NADPH oxidase(s) in the normal and dysregulated pancreatic beta cell. **Diabetologia.** v. 52, n. 12, p. 2489-98, 2009
- Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I, Brownlee M.** Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. **Nature.** v. 404, n. 6779, p. 787-90, 2000
- Nordberg J, Arnér ES.** Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radic Biol Med.** v. 31, n. 11, p. 1287-312, 2001
- Oprescu AI, Bikopoulos G, Naassan A, Allister EM, Tang C, Park E, Uchino H, Lewis GF, Fantus IG, Rozakis-Adcock M, Wheeler MB & Giacca A.** **Free fatty acid-induced reduction in glucose-stimulated insulin secretion: evidence for a role of oxidative stress in vitro and in vivo.** **Diabetes** v. 56, p. 2927-2937, 2007
- Oumi M, Miyoshi M & Yamamoto T.** Ultrastructural changes and glutathione depletion in the skeletal muscle induced by protein malnutrition. **Ultrastruct Pathol.** v. 25, p. 431-436, 2001
- Ozanne SE, Dorling MW, Wang CL, Petry CJ.** Depot-specific effects of early growth retardation on adipocyte insulin action. **Horm Metab Res.** v. 32, n. 2, p. 71-5, 2000
- 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** v. 442, p. 177-182, 1998
- 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** v. 54, p. 119-124, 1993
- 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** v. 154, p. 4778-4784, 1995
- Park KS, Kim SK, Kim MS, et al.** Fetal and early postnatal protein malnutrition cause long-term changes in rat liver and muscle mitochondria. **J Nutr** v.133, p.3085-3090, 2003.
- Parra A, Klish W, Cuellar A et al.** Energy metabolism and hormonal profile in children with edematous protein-calorie malnutrition. **J Pediatr** v. 87, p. 307-314, 1975

- Peter L.J. de Keizer,* Boudewijn M.T. Burgering, and Tobias B.** Dansen Forkhead Box O as a Sensor, Mediator, and Regulator of Redox Signaling **ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING** v. 14,n. 6, 2011
- Pi J, Bai Y, Zhang Q, Wong V, Floering LM, Daniel K, Reece JM, Deeney JT, Andersen ME, Corkey BE, Collins S.** Reactive Oxygen Species as a Signal in Glucose-Stimulated Insulin Secretion **Diabetes** v. 56, n. 7, p. 1783-91, 2007
- Popov D.** Novel protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors: interaction requirements **Biochem Biophys Res Commun.** v. 8, n. 410(3), p. 377-81, 2011
- Quinn MT, Gauss KA.** Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases. **J Leukocyte Biol.** v. 76, p. 760-81, 2004
- Rabinovitch A.** An update on cytokines in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. **Diabetes Metab Rev** v. 14, n. 2, p. 129-51, 1998
- Ragheb R., Shanab GML., Medhat AMM., Seoudi DM., Adeli K., Fantus IG.** Free fatty acid-induced muscle insulin resistance and glucose uptake dysfunction: Evidence for PKC activation and oxidative stress-activated signaling pathways **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 389, p. 211–216, 2009
- Rao RH.** Diabetes in the undernourished: coincidence or consequence? **Endocr Rev.** v. 9, p. 67-87, 1988
- Ravichandran LV, Chen H, Li Y, Quon MJ.** Phosphorylation of PTP1B at Ser50 by Akt Impairs Its Ability to Dephosphorylate the Insulin Receptor **Mol Endocrinol.** v. 15, n. 10, p. 1768–1780, 2001.
- Rebelato E, Mares-Guia TR, Graciano MF, Labriola L, Britto LR, Garay-Malpartida HM, Curi R, Sogayar MC, Carpinelli AR.** Expression of NADPH oxidase in human pancreatic islets. **Life Sci.** v. 17, n. 91(7-8), p. 244-9, 2012
- Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr.,** AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet, **J Nutr.** v. 123, n. 11, p. 1939-51, 1993
- Reis MAB, Carneiro EM, Mello MAR, Boschero AC, Saad MJA and 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.** v. 127, n. 3, p. 403-10, 1997
- Rhee SG, Kang SW, Jeong W, Chang TS, Yang KS, Woo HA.** Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins. **Curr Opin Cell Biol.** v. 17, n. 2, p. 183-9, 2005
- 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.** v. 25, p. 370-379, 2009
- Ribeiro RA, Santos-Silva JC, Vettorazzi JF, Cotrim BB, Molioli DD, Boschero AC, Carneiro EM.** Taurine supplementation prevents morpho-physiological alterations in high-fat diet mice pancreatic β -cells. **Amino Acids.** v. 43, n. 4, p. 1791-801, 2012
- Ribeiro SMR, et al.** A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal,** v. 21, n. 3, p. 133-149, 2005
- Robertson RP, Harmon JH, Tran PO, Tanaka Y, Takahashi H.** Glucose toxicity in β -cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection, **Diabetes** v. 62, p. 581-587, 2003

- Rodríguez-Rodríguez E, Perea JM, López-Sobaler AM, Ortega RM.** Obesity, insulin resistance and increase in adipokines levels: importance of the diet and physical activity. *Nutr Hosp.* v. 24, n. 4, p. 415-21, 2009
- Rorsman P, Eliasson L, Renström E, Gromada J, Barg S, Göpel S.** The Cell Physiology of Biphasic Insulin Secretion. *News Physiol Sci.* v. 15, p. 72-77, 2000
- Salmeen A and Barford D.** Functions and mechanisms of redox regulation of cysteine-based phosphatases. *Antioxid Redox Signal* v. 7, p, 560–677, 2005.
- Satin LS, Cook DL.** Voltage-gated Ca²⁺ current in pancreatic B-cells. *Pflugers Arch.* v. 404, n. 4, p. 385-7, 1985
- Schaffer SW., Azuma J., and Mozaffari M.** Role of antioxidant activity of taurine in diabetes. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* v. 87, p. 91-99, 2009
- Schenk S, Saberi M & Olefsky JM. **Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation.** *J Clin Invest* v. 118, p. 2992-3002, 2008
- Schmid E, El Benna J, Galter D, Klein G, and Droge W.** Redox priming of the insulin receptor beta-chain associated with altered tyrosine kinase activity and insulin responsiveness in the absence of tyrosine autophosphorylation. *FASEB J* v. 12, p. 863–870, 1998
- Scott, AM., Atewter, I., Rojas, E, A.** method for the simultaneous measurement of insulin release and B cell membrane potential in single mouse islets of Langerhans, *Diabetologia* v. 21, n. 5, p. 470-5, 1981
- Sen CK, Packer L.** Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB* v. 10, p. 709-20, 1996
- Sen CK.** Cellular thiols and redox-regulated signal transduction. *Curr Top Cell Regul* v. 36, p. 1-30, 2000
- Sies H.** Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.* v. 215, n. 2, p. 213-219, 1993
- Silveira LR, Hirabara SM, Lambertucci RH, Leandro CV, Fiamoncini J, Pinheiro CHJ, D'Angelo ACA, Bassit RA, Pithon-Curi TC, Curi R.** Metabolic Regulation and Production of Oxygen Reactive Species During Musclic Contraction: Effect of Glycogen on Intracellular Redox State *Rev Bras Med Esporte.* v. 14, n. 1, 2008
- Slonim AE, Surber ML, Page DL, Sharp RA, Burr IM.** Modification of chemically induced diabetes in rats by vitamin E. Supplementation minimizes and depletion enhances development of diabetes. *J Clin Invest.* v. 71, n. 5, p. 1282-8, 1983
- Sutton GM, Centanni AV, Butler AA.** Protein malnutrition during pregnancy in C57BL/6J mice results in offspring with altered circadian physiology before obesity. *Endocrinology.* v. 151, n. 4, p. 1570-80, 2010
- Tanaka Y, Tran P, Harmon J, Robertson RP.** A role for glutathione peroxidase in protecting pancreatic beta cells against oxidative stress in a model of glucose toxicity. *Proc Natl Acad SciUSA.* v. 99, p. 12363–12368, 2002
- Tanti JF, Jager J.** Cellular mechanisms of insulin resistance: role of stress-regulated serine kinases and insulin receptor substrates (IRS) serine phosphorylation. *Curr Opin Pharmacol.* v. 9, n. 6, p.753-62, 2009
- Theys N, Bouckenoghe T, Ahn MT, Remacle C, Reusens B.** Maternal low protein diet alters pancreatic islet mitochondrial function in a sex-specific manner in the adult rat. *Am J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol* 2009 Sep 16. [Epub ahead of print]
- (b)

- Theys N, Clippe A, Bouckennooghe T, Reusens B, Remacle C.** Early low protein diet aggravates unbalance between antioxidant enzymes leading to islet dysfunction. **Plos One** v. 4, n. 7, p. e6110, 2009 (a)
- Tonks NK.** Redox redux: revisiting PTPs and the control of cell signaling. **Cell.** v. 3, n. 121(5), p. 667-70, 2005
- Torun B, Chew F. Protein energy malnutrition. In: Shils, ME: Olson JA.: Hike M. **Modern nutrition in health and disease.** 8^a ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1994
- Travacio M. & Lesuy S.** Antioxidant enzymes and their modifications under oxidative stress conditions. **J. Bras. Assoc. Adv. Sci.** v. 48, n. ½, p. 9-13, 1996
- 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.** v. 147, n. 7, p. 3276-84, 2006
- Ungvari Z, Wolin MS, Csiszar A.** Mechano sensitive production of reactive oxygen species in endothelial and smooth muscle cells: role in microvascular remodeling? **Antioxid Redox Signal** v. 8, p. 1121-9, 2006
- Valle MM, Graciano MF, Lopes de Oliveira ER, Camporez JP, Akamine EH, Carvalho CR, Curi R, Carpinelli AR.** Alterations of NADPH oxidase activity in rat pancreatic islets induced by a high-fat diet. **Pancreas.** v. 40, n. 3, p. 390-5, 2011
- Vannucchi H, et al.** Papel dos nutrientes na peroxidação lipídica e no sistema de defesa antioxidante. **Medicina (Ribeirão Preto).** v. 31, n. 1, p. 31-44, 1998
- Wei Y, Chen K, Whaley-Connell AT et al.** Skeletal muscle insulin resistance: role of inflammatory cytokines and reactive oxygen species. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** v. 294, R673-R680, 2008
- Weyer C, Bogardus C, Mott DM, Pratley RE.** The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. **J Clin Invest** v. 104, p. 787–794, 1999
- Williams CD.** A nutritional disease of childhood associated with a maize diet, **Arch. Dis. Child.** v. 8, p. 423–433, 1933
- Witko, V., Nguyen, A. T., and Descamps-Latscha, B.,** Microtiter plate assay for phagocyte-derived taurine-chloramines. **J. Clin. Lab. Anal.** v.6, p. 47–53, 1992.
- Xiao C, Giacca A & Lewis GF.** Oral taurine but not N-acetylcysteine ameliorates NEFA-induced impairment in insulin sensitivity and beta cell function in obese and overweight, non-diabetic men. **Diabetologia** v. 51, p. 139-146, 2008
- Youfa Wang, Carlos Monteiro, and Barry M.** Popkin Trends of obesity and underweight in older children and adolescents in the United States, Brazil, China, and Russia **Am J Clin Nutr.** v. 75, p. 971–7, 2002
- Yu BP.** Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiol. Rev.** v. 74, n. 1, p. 139-162, 1994
- Zawalich WS, Zawalich KC.** Enhanced activation of phospholipase C and insulin secretion from islets incubated in fatty acid-free bovine serum albumin. **Metabolism** v. 57, p. 290–298, 2008
- Zhu MJ, Ford SP, Means WJ, et al.** Maternal nutrient restriction affects properties of skeletal muscle in offspring. **J Physiol** v. 575, p. 241–250, 2006
- Zoppi CC, Silveira L.R, Oliveira CAM., Boscheiro AC, Curi R and Carneiro EMC** Insulin release, peripheral insulin resistance and muscle function in protein malnutrition: a role of tricarboxylic acid cycle anaplerosis. **British Journal of Nutrition.** v.103, n. 9, p.1237-1250, 2010

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 gainstudy of 24-h RQ **Am J Physiol.** v. 259, n. 5 Pt 1, p. E650-7, 1990.

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação tese de Doutorado intitulada **Mecanismos moleculares envolvidos na modulação redox da secreção e ação da insulina em ilhotas pancreáticas, fígado e músculo esquelético de camundongos desnutridos submetidos à obesidade experimental:**

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

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

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

(X) CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto No. 2017-1, Instituição:
Universidade Estadual de Campinas (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: Ana Paula Gameiro Cappelli


Orientador: Everardo Magalhães Carneiro

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura



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

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura

9. ANEXO II

TAURINE-INDUCED INSULIN SIGNALING IMPROVEMENT OF OBESE
MALNOURISHED MICE IS ASSOCIATED WITH REDOX BALANCE AND PROTEIN
PHOSPHATASES ACTIVITY MODULATION

Ana Paula Cappelli, Claudio Cesar Zoppi, Helena Cristina Barbosa-Sampaio, José Maria Costa Jr., André Otávio Protzek, Antonio Carlos Boschero, Everardo Magalhães Carneiro

Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, CEP: 13083-865, Brazil.

Correspondence should be addressed to:

Dr. Everardo Magalhães Carneiro:

Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP). P.O. Box 6109, Campinas, SP. CEP: 13083-865, Brazil.

Tel.: +55 19 3521 6203; Fax: +55 19 3521 6185.

E-mail address: emc@unicamp.br

Abstract word count: 249

Main text word count: 3,568

A.P. Cappelli and C.C. Zoppi contributed equally to the present work.

Running Head: Insulin signaling and liver redox state

ABSTRACT

Background: Obese protein malnourished mice display liver insulin resistance and taurine (TAU) seems to attenuate this effect. The association between early life malnutrition and hepatic redox balance in diet-induced insulin resistance is unknown. **Aims:** We investigated TAU supplementation effects upon liver redox state and insulin signaling in obese protein malnourished mice. **Methods:** Weaned male C57BL-6 mice were fed a control (14% protein - C) or a protein restricted diet (6% protein - R) for 6 weeks. Afterwards, mice received a high fat diet (34% fat - HFD) for 8 weeks (CH - RH). Half of the HFD-mice were supplemented with TAU (5%) throughout the treatment (CHT – RHT). Body and tissues' weight, respiratory quotient (RQ), glucose tolerance and insulin sensitivity, hepatic oxidant and antioxidant markers and insulin cascade proteins were assessed. **Results:** Protein restriction leads to typical features whereas HFD was able to induce a catch-up growth in RH. HFD-groups showed higher energy intake and adiposity, lower energy expenditure and altered RQ. Glucose tolerance and insulin sensitivity were impaired in HFD groups and TAU attenuated these effects. H₂O₂ content was increased in CHT and RHT despite no differences in antioxidant enzymes and GSH concentration. AKT and PTEN phosphorylation were significantly increased in CHT but not in RHT. **Conclusion:** Our data provide evidence for an association between TAU-induced improved glycaemic control due to PTEN inactivation and higher AKT phosphorylation. These effects seem to be related with altered hepatic redox balance in obese mice, and this effect is impaired by protein malnutrition.

Keywords: liver; hydrogen peroxide; antioxidant enzymes; PTP1B; PTEN

INTRODUCTION

Liver is one of the major organs regarding blood glucose homeostasis control. Under conditions of increased glucose availability it is stored as glycogen, whereas during fasting conditions, glycaemia levels could be maintained by releasing liver glucose into the bloodstream.

During post-prandial condition, elevated blood glucose clearance is regulated by insulin. The classical pathway by which insulin exerts its effect is through the binding to the insulin receptor (IR), activating phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K)-protein kinase B (Akt) pathway. The phosphorylation cascade triggered by insulin binding to its receptor seems to be modulated by redox state (1, 2). It was reported that insulin binding to IR stimulates reactive oxygen species (ROS), namely H_2O_2 , production that may act as a second messenger in the insulin cascade (3). The notion that hydrogen peroxide (H_2O_2) exerts insulin-like effects was previously described showing that incubation with H_2O_2 resulted in increased glucose uptake in skeletal muscle and adipose tissue (4, 5). Although several insulin cascade proteins have been proposed to be targets of redox modulation (2, 6), the family of protein phosphatases, mainly the tyrosine phosphatases appears as main candidate. In this sense, the protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) and the phosphatase and tensin homolog (PTEN) are highlighted as main targets of insulin signaling redox control, as they are thiol-dependent enzymes, regulated by the cellular redox state (1, 2, 6, 7).

Early life malnutrition as well as high fat diet (HFD)-induced obesity, are known to induce hepatic insulin resistance (8, 9). Despite several other alterations, both conditions were reported to alter intracellular redox balance by increasing ROS production and/or reducing antioxidant capacity, leading to glucose control impairment (10, 11).

On the other hand, it has been reported that taurine (TAU), a sulfur-containing amino acid, that is found in very high concentration in mammalian tissues possesses a

variety of biological actions, such as ion movement, antioxidant capacity, osmoregulation and mitochondrial function (12-15). Moreover, TAU was reported to improve insulin secretion and sensitivity in malnourished and obese rodents (16, 17), although the mechanisms are still not completely understood. In this sense, we hypothesize that TAU may exert its action in these models also by modulating the intracellular redox status.

Considering that early life malnutrition followed by HFD is a common outcome in developing countries, a phenomenon that is in line with epidemiological data of increased obesity, metabolic syndrome and diabetes incidence in these countries (18, 19), we aimed to investigate the effects of this nutritional behavior upon liver insulin signaling cascade redox control. In addition, we tested the effect of TAU supplementation upon insulin action in the liver of these models. Our hypothesis was that protein malnourished mice followed by HFD-induced obesity would favor hepatic insulin resistance by altering cellular redox balance and TAU supplementation might attenuate this effect.

MATERIAL AND METHODS

All the experiments described herein were approved by the State University of Campinas Committee for Ethics in Animal Experimentation and performed according to the “Principles of laboratory animal care” (NIH publication no. 85-23, revised 1985).

Animals and diet

Male *C57BL/6* mice (21 day-old) from the breeding colony at UNICAMP were housed at 24°C on a 12 h light/dark cycle at the department animal facilities. Mice were maintained in collective cages (four per cage), and randomly assigned into six groups and treated for 105 days as follows: Control group (C) – received diet containing 14% protein throughout the treatment (105 days); Control + HFD (CH) - received diet containing 14% protein for 45 days and afterwards received HFD (34% of fat) for 60 days; Control + HFD +

TAU (CHT) - received diet containing 14% protein for 45 days and afterwards received HFD (34% of fat) for 60 days and was also supplemented with TAU. TAU supplementation started immediately after weaning and was supplied in the drinking water (5%); Protein restrict group (R) - received diet containing 6% of protein throughout the treatment (105 days); Protein restricted + HFD (RH) - received diet containing 6% of protein for 45 days and afterwards received HFD (34% of fat) for 60 days; Protein restrict + HFD + TAU (RHT) - received diet containing 6% of protein for 45 days and afterwards received HFD (34% of fat) for 60 days and was also supplemented with TAU. TAU supplementation started immediately after weaning and was supplied in the drinking water (5%). Mice were weighted weekly throughout the treatment (105 days).

Diets were prepared according to AIN-93 guidelines (20) for adult rodents, with the aforementioned macronutrients alterations.

Food Intake

During the last week of the treatment, animals remained in metabolic cages and food intake was measured. We obtained the total food intake/animal's weight ratio and correspondent energy intake was calculated in Kcal per day.

Indirect calorimetry

Before data collection, mice were allowed a two hours acclimation to the system. After that, animals remained at rest in sealed metabolic cages; O₂ and CO₂ were measured by Oxylet system (Pan Lab/Harvard Instruments, Barcelona, Spain). Respiratory quotient (RQ) was calculate from these data using the Metabolism[®] software (Pan Lab/Harvard Instruments, Barcelona, Spain) coupled to the system.

Blood samples collection and plasma measurements

Blood samples were collected from the tail for *in vivo* experiments or after decapitation in heparinized tubes. Plasma was obtained by centrifugation at 12,000 rpm at 4°C and the samples stored at -80°C, unless otherwise stated. Plasma total protein was measured using specific kit PROtal (Laborlab, Sao Paulo, Brazil). Glycaemia was measured in whole blood using the hand held glycosimeter Accu-Check Advantage II (Roche Ltd., Basel, Switzerland). Plasma insulin concentration was measured by RIA using rat insulin as standard, ¹²⁵I-labelled bovine insulin was used as the radioactive tracer and guinea-pig anti-porcine insulin serum used as the antibody (21).

Intraperitoneal glucose tolerance test (ipGTT) and intraperitoneal insulin tolerance test (ipITT)

IpGTT and ipITT were conducted in different days separated by one week, as previously described (22). Briefly, for the ipGTT mice were maintained in a fasted state for 8 h. Previously to 2 g/Kg of a 50% (w/v) glucose solution injection was administrated intraperitoneally, fasting glycaemia was measured (time 0). Glycaemia and insulinaemia were measured at 15, 30, 60, 120 and 180 minutes after glucose infusion. The area under the curve calculation estimated glucose tolerance. For the ipITT mice remained fasted for 2 h. Before intraperitoneal human insulin (1,5 U/kg) (Eli Lilly, IN, USA) infusion, blood glucose was measured (time 0). Afterwards, glycaemia was measured at 5, 10, 15, 20, 25 and 30 min. The constant rate for glucose disappearance (kITT) was calculated using the formula $0.693/t_{1/2}$. Glucose $t_{1/2}$ was calculated from the slope of the least-squares analysis of plasma glucose concentrations during the linear decay phase.

Experimental design and sample extraction

For a more physiological approach, to stimulate insulin signaling, rather than an insulin injection, we used an intraperitoneal glucose load (2 g/Kg of a 50% [w/v] glucose solution) or the same volume of a saline solution (control) were administrated. Thirty minutes after the injection, which was the glycaemia and insulinaemia peak as observed during IpGTT, mice were culled and liver samples were quickly frozen in liquid nitrogen and stored at -80° until further analysis. After thawing, unless otherwise stated, liver samples were sliced with scissor and placed on ice-cold buffer containing EDTA 10mM, Trisma base 100mM, Sodium Pyrophosphate 100mM, Sodium Fluoret 100mM, Sodium Orthovanadate 10mM, PMSF 2mM, Aprotinine 0,1 mg/mL. After that, samples were homogenized with a Polytron (Kinematica, Switzerland). Protein content was quantified by the method of Bradford (23).

H₂O₂ content measurement

To measure H₂O₂ content, fresh liver samples were maintained in a Krebs-Hepes (KRBH) buffer (containing in mM: 115 NaCl, 10 NaHCO₃, 5 KCl, 1 MgCl₂, 2.5 CaCl₂, 10 Hepes), pH 7.4 at 37° C in the presence of *Amplex Ultra-red* (Invitrogen, Sao Paulo, Brazil) probe and horseradish peroxidase (0,1U/mL) during 15 min. After that, 100 µL of the supernatant were used to determine the fluorescence intensity at 530 nm excitation and 590 nm emission. Liver H₂O₂ concentration was calculated against a H₂O₂ concentration curve.

Reduced glutathione (GSH) content measurement

GSH was measured photometrically in fresh liver samples using 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (24). Samples values were interpolated from a standard GSH curve.

RNA extraction and quantitative polymerase chain reaction (PCR)

Liver samples were thawed at room temperature and homogenized in TRIzol reagent (Invitrogen, São Paulo, Brazil) for 30 s. Total RNA was extracted according to the manufacturer's guidelines and quantified by a spectrophotometer. The integrity of RNA was verified by agarose gel electrophoresis. Complementary DNA was prepared using 3 µg of total RNA and a MultScribe™ reverse transcriptase (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The sequence of the primers is described below and Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as the house-keeping gene. SOD1: Forward 5'- CGTCGGCTTCTCGTCTTGCTCTC Reverse 5'- CACGCACACCGCTTTCATCGC; SOD2: Forward 5'-TGAGGAGAGCAGCGGTCTGT Reverse 5'- ACGCCGCCCGACACAACATT; GPx1: Forward 5'- GCCGCACCCTCTTCCCTG Reverse 5'- GTGGCATCGCTTTCTTTCCG; CAT: Forward 5'- GATGAAGCAGTGGAAGGAGC Reverse 5' –TGCCATCTCGTCGGTGAAA; GAPDH: Forward 5' – CCTGCACCACCAACTGCTTA Reverse 5' – GCCCCACGGCCATCACGCCA.

Real-time PCR was carried out in the StepOne cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Reactions conditions were 95°C for 10 min, followed by 40 cycles at 95° for 10 s and 60°C for 45 s. Real-time data were analyzed using the Sequence Detector System 1.7 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Western blotting

After samples homogenization, Triton X-100 was added at 1% (v:v) for 30 min. Samples were then centrifuged at 15,000g for 20 min, at 4°C. Equal amounts of proteins of each sample (50 µg) were separated by using 10% SDS-PAGE. After electrophoresis, protein samples were transferred from the gel to a nitrocellulose membrane at 120 V for 90 min. After 2h blocking in 5 % non-fat milk solution at room temperature, immunodetection

was performed following an incubation with anti-catalase (Sigma, MO, USA), anti-SOD1 (Abcam, Cambridge, UK), anti-GPx 1 (Abcam, Cambridge, UK), anti-phospho insulin receptor (IR) (Santa Cruz, CA, USA), anti-phospho AKT (Santa Cruz, CA, USA), anti-phospho PTP1B (Abcam, Cambridge, UK) and anti-GAPDH (Santa Cruz, CA, USA). Membranes were then exposed to 150 ng/ml specific secondary peroxidase-conjugated antibody (anti IgG–HRP, Invitrogen, São Paulo, Brazil) at room temperature, and visualized by chemiluminescence signal (SuperSignal, Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL, USA) that was detected using a LAS-3000 CCD camera (Fuji, Japan) and quantified by the image J software (ScionCorp., Frederick, MD, USA).

Statistical analysis

Results are expressed as means \pm SEM. Statistical analyses were performed with Statistic 6.0 for Windows software, using Student-t-test and One-way ANOVA with student-Newman-Keuls post-hoc test. *P* values of less than 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

Growth, nutritional and metabolic parameters

Our protocol of protein malnourishment followed by HFD-induced obesity was successfully reached. Protein restricted group (R) showed 30% reduced weight gain when compared with C group. HFD increased RH group weight to the same range of normoprotein-fed groups (figure 1). Hence, table 1 shows that several absolute tissues mass; such as skeletal muscle, liver and pancreas, displayed the same pattern among experimental groups; being lower in R and increased until reach control values, after HFD feeding. Interestingly, fat content, analyzed here by the epididymal and retroperitoneal fat pads, was not reduced in R. As expected, it was increased after HFD treatment, although

remaining at similar levels in all-experimental groups. In a general manner, when absolute tissues weight was normalized by total body mass, this effect was attenuated. However, low-protein-fed tissues values were usually lower than normoprotein treated mice. HFD treatment increased the values observed in protein-restricted group (RH) to the same range reported in normoprotein-fed groups (CH) (table 2). Considering the relative tissues weight, it is interesting to note retroperitoneal fat content. R group displayed higher levels of retroperitoneal fat content than C, which might suggest an increased obesity development tendency, induced by protein restriction when followed by HFD treatment. In addition, regarding the aforementioned parameters, our data show that TAU supplementation had no effect in any group, regarding growth parameters.

In agreement with abovementioned effects, figure 2 shows that, despite no overall differences were noticed regarding relative food consumption, energy intake was higher in HFD-treated groups. Also interesting of note was that TAU was able to reduce food and consequently energy intake only in CHT, maintaining near to C levels (figure 2 A, B). Such effect was not observed in RHT group.

In addition to food consumption and energy intake, energy expenditure was significantly lower in R and CH as compared to C values. RH and RHT energy expenditure levels remained at the same low levels reached by R. Nevertheless, TAU was able to increase this parameter in CHT, and despite an observed tendency, it did not exert the same effect in RHT (figure 3A). Despite higher fat availability in HFD treated groups, it was reported a significant increase in RH respiratory quotient value (figure 3B), evidencing whole body higher carbohydrate oxidation and probably some level of mitochondrial dysfunction. These effects have been reported in obese insulin resistant and diabetic humans and rodents (25, 26).

In agreement with previous data, plasma variables also reflected dietary treatments (table 3). Whereas total protein, fasting blood insulin and glucose content were reduced in

R, HFD increased these parameters to control levels in RH and RHT. In addition, HFD increased cholesterol levels in both, normoprotein and protein-restricted groups.

Glucose metabolism

Glucose metabolism was also altered by our dietary treatments. Whereas protein restriction increased glucose tolerance and insulin sensitivity, HFD reduced these parameters in all groups, as shown by ipGTT and ipITT data (figures 4 and 5), providing evidence of insulin resistance development. Regarding whole body glucose homeostasis data, TAU was able to restore glucose homeostasis mainly in CHT, whereas its effect in RHT was not as efficient as observed in normo-protein group, showing only an improvement tendency.

Liver redox state and insulin signaling

After the characterization of our experimental models and their effect on blood glucose metabolism, we aimed to investigate liver redox state and insulin signaling. To activate insulin cascade, we used a glucose load (2g/Kg) instead of insulin injection directly, for a more physiological approach. Figure 6 shows that although a slight blood glucose increase was observed in most groups, when saline was administrated (figure 6 A and B), glucose load induced a huge increase in blood glucose after 30 min (figure 6 C and D). In addition, the stimulatory effect of glucose load was clearly demonstrated when we analyzed blood insulin content. Whereas saline solution did not change insulinaemia (figure 7 A and B), glucose load significantly increased blood insulin in all experimental groups (figure 7 C and D). TAU did not alter blood glucose neither insulin levels in any group.

In line with these data, during basal (saline infusion) condition, liver H₂O₂ levels were similar among our experimental groups. However, after the glucose load-stimulated

insulin release we reported increased H₂O₂ production in all groups. Interestingly, both CHT and RHT groups presented higher H₂O₂ content when compared with the other C and R groups, providing a more oxidized environment in hepatocytes within these groups (figure 8 A, B). As expected, in response to increased H₂O₂ content, GSH levels were lowered to the same extent in all groups (figure 9 A, B), whereas the main antioxidant (SOD, GPx1 and CAT) enzymes protein levels were, in general, not altered. Exception made to GPx1 in RHT group, which showed a significant increase as compared to R and consequently higher antioxidant capacity induced by TAU supplementation (figure 10). These data provide evidence for a transient alteration in the intracellular redox balance after glucose load.

Despite no evidence of increase in the content of insulin cascade-involved proteins, as suggested by unaltered mRNA content from all studied proteins (table 4), some proteins from insulin signaling pathway displayed altered activities in the liver, specifically in the groups that received TAU supplementation. Whereas low protein and HFD treatment did not induce any significant alterations, TAU supplementation was reported to improve upstream insulin signaling cascade, regardless of glucose load. Although it was not observed any alteration in pIR (figure 11 A and B) and pPTP 1B content (figure 11 C, D), a significant increase in AKT phosphorylation in CHT group, and a tendency of increase ($p=0,09$) in RHT group (figure 11 E, F) were demonstrated. Accordingly, pPTEN presented also significantly increased phosphorylation in both CHT and RHT groups (figure 11 G, H), and consequently decreased activation in these groups, favoring AKT activation, as shown by our data.

DISCUSSION

Low birth weight, altered growth pattern in infancy or childhood can predispose obesity, insulin resistance and even type 2 diabetes development later in life, mainly when

there is an association of weight reduction and catch-up growth (27, 28). In agreement, we recently demonstrated in an animal model that obese protein malnourished mice display altered systemic glucose control (16). Here, we investigated the consequences of early life protein malnutrition followed by HFD-induced obesity on the redox control of insulin signaling in the liver as well as the effect of TAU supplementation on these markers.

As expected, our data revealed that obese protein malnourished mice displayed a reduction in body weight, followed by a catch-up growth. In agreement with literature data, these changes were accompanied by increased adipose tissue deposition and blood lipids content, lower fat oxidation and energy expenditure, leading to whole body glucose tolerance and insulin sensitivity impairment (29, 30). Furthermore, in line with several other reports (31, 32), our protocol of TAU supplementation had no effect upon body weight and fat content, however, it contributed to reducing food intake and increasing energy expenditure, enhancing fat oxidation, as well as improving glucose tolerance and insulin sensitivity mainly in normo-protein-fed, but also in protein-restricted obese mice. Even though we analyzed here only whole body glucose metabolism by the GTT and ITT, we focused on the liver insulin signaling as it appears as a main organ in glycaemia homeostasis. In addition, our group demonstrated that the same models lead to liver insulin resistance, evidenced by increased glucose output, an effect that was reversed by TAU (16).

As previously stated, insulin signaling cascade seems to be modulated by intracellular redox state. In this sense, low birth weight as well as HFD-induced obesity has been described to alter hepatic redox balance by increased free radical production and/or reduced antioxidant capacity (33, 34). However, the alterations in the fine-tune redox control of insulin signaling specifically in obese malnourished mice have not been addressed.

In opposite to the aforementioned works, our data of H₂O₂ and antioxidant enzymes

content did not reveal evidence for an oxidative stress situation in most of our experimental groups. In contrast to the damaging high levels of free radicals, small amounts of these species are recognized as intracellular signaling molecules. It was demonstrated that under physiological conditions, H_2O_2 is needed to start intracellular insulin action; this effect was called the redox priming (35). Similar to the observed in adipocytes, where high glucose concentration was able to induce increase in H_2O_2 levels, then enhancing insulin signaling (36), our results show that increased blood glucose was associated with higher levels of H_2O_2 and reduced GSH content in the liver. Hence, it was detected higher H_2O_2 and GPX1 levels in TAU supplemented groups. Interestingly, a positive relationship between these redox markers and insulin signaling, specifically at PTEN and AKT activation, were found only in TAU supplemented group. As previously proposed, glucose load induced a transient change to a more oxidized environment in the adipocytes and skeletal muscle cells, which seems to be essential for insulin action (4, 5). In this sense, TAU supplementation might favor intracellular redox balance by increasing H_2O_2 production and antioxidant capacity. TAU antioxidant capacity to protect hepatocytes, has already been described (37), however, the mechanism involved in the improved H_2O_2 production, as showed by our results, needed to be further investigated. Thus an increased TAU content might favor hepatocytes redox balance and insulin signaling in our HFD-treated mice.

Regarding insulin signaling modulation, several kinases and phosphatases have been proposed as candidates of the redox control of insulin action (2). PTP1B and PTEN are pointed as the main phosphatases involved in insulin cascade that are regulated by the redox state. For instance, PTP1B and PTEN were described to be involved with insulin resistance in obese mice (38, 39). PTP1B and PTEN counteract insulin effects by removing the phosphates from IR, insulin receptor 1(IRS1) and PI3K, respectively (1, 2, 40). On the other hand, H_2O_2 oxidizes the catalytic cysteine thiol of these enzymes reducing

their affinity for their substrates, allowing enhanced insulin signal transduction. Although several studies described the association between PTP1B and insulin resistance in HFD treated models, suggesting this enzyme as possible therapeutic target against metabolic syndrome (41), our results did not show any alterations in PTP1B and IR phosphorylation in the liver from obese mice. However, AKT and PTEN phosphorylation were significantly increased when TAU was supplemented, mainly in CHT and to a lesser extent in RHT. Whereas AKT phosphorylation increases its activity, the same effect impairs PTEN binding to membrane reaching the active conformation (42) removing its capacity to inactivate PI3K. Thus, reduced PTEN activity may allow the observed increase in AKT activation and insulin signal transduction in the liver then, favoring improved glucose tolerance and insulin sensitivity in TAU supplemented mice.

In conclusion, our data provide evidence for an association between TAU-induced improved liver insulin signal transduction and enhanced whole body glucose tolerance due to alterations in hepatic redox balance in obese mice. In addition, early life protein malnutrition seems to impair these TAU effects. However, the mechanisms by which this impairment occurs need to be established.

ACKNOWLEDGEMENTS: FAPESP, CNPq and National Institute of Obesity and Diabetes (NICTOD) grants are acknowledged here.

LEGENDS

Figure 1 - (A) Body weight of male C57BL/6 mice in control (C), control + high fat diet (CH) and control + high fat diet + taurine (CHT). (B) Body weight of male C57BL/6 mice in restricted (R), restricted + high fat diet (RH) and restricted + high fat diet + taurine (RHT). (C) area under the curves referring to graphs A and B (n = 9-13). Values are mean \pm SEM. * $P < 0.05$ vs. control, # $P < 0.05$ vs. restricted group. One-way ANOVA followed by Tukey.

Figure 2 - (A) Food Ingestion (g / g body weight) and (B) calorie intake of male C57BL / 6 mice in control (C), control + high fat diet (CH), control + high fat diet + taurine (CHT), restricted (R), restricted + high fat diet (RH) and restricted + high fat diet + taurine (RHT). (n = 4 -6). Values are mean \pm SEM. * $P < 0.05$ vs. control, # $P < 0.05$ vs. restricted group. & $P < 0.05$ vs. control + high fat diet. One-way ANOVA followed by Tukey.

Figure 3 - (A) Respiratory Coefficient and (B) Energy Expenditure of male C57BL/6 mice in control (C), control + high fat diet (CH), control + high fat diet + taurine (CHT), restricted (R), restricted + high fat diet (RH) and restricted + high fat diet + taurine (RHT). Animals were fed between 21 and 105 days of life. Values are mean \pm SEM. * $P < 0.05$ vs. control. # $P < 0.05$ vs. restricted group. & $P < 0.05$ vs. control + high fat diet. One-way ANOVA followed by Tukey.

Figure 4- Intraperitoneal glucose tolerance test (ipGTT). (A) Control (C), control + high fat diet (CH) and control + high fat diet + taurine (CHT). (B) restricted (R), restricted + high fat diet (RH) and restricted + high fat diet + taurine (RHT). (C) area under the curves referring to graphs A and B (n = 5-11). Values are mean \pm SEM. * $P < 0.05$ vs. control. # $P < 0.05$ vs. restricted. & $P < 0.05$ vs. control + high fat diet. One-way ANOVA followed by Tukey.

Figure 5 – Intraperitoneal insulin tolerance test (ipITT). (A) Glycemic curve of male C57BL/6 mice in control (C), control + high fat diet (CH) and control + high fat diet +

taurine (CHT). (B) Glycemic curve of male C57BL/6 mice in restricted (R), restricted + high fat diet (RH) and restricted + high fat diet + taurine (RHT). (C) area under the curves referring to the graphs A and B. (D) Percentage of decay of glucose (kITT) in 15 min. (n = 6-12). Values are mean \pm SEM. * P<0.05 vs. control. # P<0.05 vs. restricted. One-way ANOVA followed by Tukey. "T" student.

Figure 6 - (A) Fasting plasma glucose and after 30 minutes of application of saline or (B) 2g/Kg glucose C57BL/6 injection in male C57BL/6 mice. Control (C), control + high fat diet (CH), control + high fat diet + taurine (CHT), restricted (R), restricted + high fat diet (RH) and restricted + high fat diet + taurine (RHT). (n = 5-11). Values are mean \pm SEM. \$ P<0.05 vs. the same group in fasting condition. Student's *t* test.

Figure 7 - (A) Fasting plasma insulin and after 30 min after application of saline or (B) 2g/Kg glucose in C57BL/6 male mice. Control (C), control + high fat diet (CH) and control + high fat diet + taurine (CHT), mice restricted (R), restricted + high fat diet (RH) and restricted + high fat diet + taurine (RHT). (n = 4-11). Values are mean \pm SEM. \$ Represents statistical difference compared to the baseline group of animals that received the same diet (Student's *t* test.).

Figure 8 - H₂O₂ concentration in the liver of male C57BL / 6. (A) Control (C), control + high fat diet (CH) and control + high fat diet + taurine (CHT). (B) Restricted mice (R), restricted + high fat diet (RH) and restricted + high fat diet + taurine (RHT). White bars represent animals that received intraperitoneal injection of saline (control) and black bars represent C57BL / 6 mice 30 minutes after glucose load (2U/Kg) (stimulated). (n= 4-9). Values represent mean \pm SEM. * Represents statistical difference in the control group. # Represents a statistical difference in relation to the restricted group. & Represents a statistical difference within the same group that received a high fat diet without

supplementation with taurine \$ $P < 0.05$ vs. the same group in saline condition. Student's *t* test.

Figure 9- GSH concentration in the liver of male C57BL / 6 mice. (A) Control (C), control + high fat diet (CH) and control + high fat diet + taurine (CHT). (B) Restricted mice (R), restricted + high fat diet (RH) and restricted + high fat diet + taurine (RHT). White bars represent animals that received intraperitoneal injection of saline (control) and black bars represent C57BL / 6 mice 30 minutes after glucose load (2U/Kg) (stimulated). (n =4- 10). Values represent mean \pm SEM. \$ Represents statistical difference compared to the baseline group of animals that received the same diet (test "t" student).

Figure 10- Protein content of the liver main antioxidant enzymes. (A and B) SOD1, (C and D) GPx1 and (E and F) CAT in C57BL / 6 mice. Control (C), control + high fat diet (CH) and control + high fat diet + taurine (CHT), restricted (R), restricted + high fat diet (RH) and restricted + high fat diet + taurine (RHT) 30min after the application of saline (white bars) or glucose (black bars). (n = 3-4). Values represent mean \pm SEM. (one-way ANOVA and Tukey post test).

Figure 11- Liver regulatory insulin cascade proteins phosphorylation. (A and B) p-IR, (C and D) p-PTP1B, (E and F) p-AKT, and (G and H) p-PTEN in C57BL / 6 mice. Control (C), control + high fat diet (CH) and control + high fat diet + taurine (CHT), restricted (R), restricted + high fat diet (RH) and restricted + high fat diet + taurine (RHT) 30min after saline (white bars) or glucose injection (black bars). (n = 3-4). Values represent mean \pm SEM. * Represents statistical difference in the control group. # Represents a statistical difference in relation to the restricted group. & Represents a statistical difference within the same group in the group that received a high fat diet without supplementation with taurine. $P < 0.05$ (one-way ANOVA and Tukey post test).

REFERENCES

1. Bashan N, Kovsan J, Kachko I, Ovadia H, Rudich A. Positive and negative regulation of insulin signaling by reactive oxygen and nitrogen species. *Physiological reviews*. 2009;89(1):27-71.
2. Goldstein BJ, Mahadev K, Wu X, Zhu L, Motoshima H. Role of insulin-induced reactive oxygen species in the insulin signaling pathway. *Antioxidants & redox signaling*. 2005;7(7-8):1021-31.
3. Mahadev K, Motoshima H, Wu X, Ruddy JM, Arnold RS, Cheng G, et al. The NAD(P)H oxidase homolog Nox4 modulates insulin-stimulated generation of H₂O₂ and plays an integral role in insulin signal transduction. *Molecular and cellular biology*. 2004;24(5):1844-54.
4. Mukherjee SP, Lynn WS. Role of cellular redox state and glutathione in adenylate cyclase activity in rat adipocytes. *Biochimica et biophysica acta*. 1979;568(1):224-33.
5. Higaki Y, Mikami T, Fujii N, Hirshman MF, Koyama K, Seino T, et al. Oxidative stress stimulates skeletal muscle glucose uptake through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2008;294(5):E889-97.
6. de Keizer PL, Burgering BM, Dansen TB. Forkhead box o as a sensor, mediator, and regulator of redox signaling. *Antioxidants & redox signaling*. 2011;14(6):1093-106.
7. Monteiro HP, Arai RJ, Travassos LR. Protein tyrosine phosphorylation and protein tyrosine nitration in redox signaling. *Antioxidants & redox signaling*. 2008;10(5):843-89.
8. Feres NH, Reis SR, Veloso RV, Arantes VC, Souza LM, Carneiro EM, et al. Soybean diet alters the insulin-signaling pathway in the liver of rats recovering from early-life malnutrition. *Nutrition*. 2010;26(4):441-8.

9. Lalli CA, Pauli JR, Prada PO, Cintra DE, Ropelle ER, Velloso LA, et al. Statin modulates insulin signaling and insulin resistance in liver and muscle of rats fed a high-fat diet. *Metabolism: clinical and experimental*. 2008;57(1):57-65.
10. Begriche K, Massart J, Robin MA, Bonnet F, Fromenty B. Mitochondrial adaptations and dysfunctions in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2013.
11. Spoelstra MN, Mari A, Mendel M, Senga E, van Rheenen P, van Dijk TH, et al. Kwashiorkor and marasmus are both associated with impaired glucose clearance related to pancreatic beta-cell dysfunction. *Metabolism: clinical and experimental*. 2012;61(9):1224-30.
12. Hansen SH, Andersen ML, Cornett C, Gradinaru R, Grunnet N. A role for taurine in mitochondrial function. *Journal of biomedical science*. 2010;17 Suppl 1:S23.
13. Ito T, Pastukh V, Solodushko V, Azuma J, Schaffer SW. Effect of taurine on protein kinase C isoforms: role in taurine's actions? *Advances in experimental medicine and biology*. 2009;643:3-11.
14. Schaffer SW, Azuma J, Mozaffari M. Role of antioxidant activity of taurine in diabetes. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 2009;87(2):91-9.
15. Militante JD, Lombardini JB, Schaffer SW. The role of taurine in the pathogenesis of the cardiomyopathy of insulin-dependent diabetes mellitus. *Cardiovascular research*. 2000;46(3):393-402.
16. Batista TM, Ribeiro RA, da Silva PM, Camargo RL, Lollo PC, Boschero AC, et al. Taurine supplementation improves liver glucose control in normal protein and malnourished mice fed a high-fat diet. *Molecular nutrition & food research*. 2012.
17. 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. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2012;23(3):306-12.

18. Fagot-Campagna A. Emergence of type 2 diabetes mellitus in children: epidemiological evidence. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism* : JPEM. 2000;13 Suppl 6:1395-402.
19. Silva AA, Santos CJ, Amigo H, Barbieri MA, Bustos P, Bettioli H, et al. Birth weight, current body mass index, and insulin sensitivity and secretion in young adults in two Latin American populations. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases* : NMCD. 2012;22(6):533-9.
20. Reeves PG, Rossow KL, Lindlauf J. Development and testing of the AIN-93 purified diets for rodents: results on growth, kidney calcification and bone mineralization in rats and mice. *The Journal of nutrition*. 1993;123(11):1923-31.
21. 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(5):470-5.
22. Filiputti E, Rafacho A, Araujo EP, Silveira LR, Trevisan A, Batista TM, et al. Augmentation of insulin secretion by leucine supplementation in malnourished rats: possible involvement of the phosphatidylinositol 3-phosphate kinase/mammalian target protein of rapamycin pathway. *Metabolism: clinical and experimental*. 2010;59(5):635-44.
23. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 1976;72:248-54.
24. Faure P, Lafond JP. Measurement of plasma sulphhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. In: Favier AE, ed. *Analysis of free radicals in biological systems*. Basel: Birkhäuser Verlag; 1995: 237-48.
25. Muoio DM, Noland RC, Kovalik JP, Seiler SE, Davies MN, DeBalsi KL, et al. Muscle-specific deletion of carnitine acetyltransferase compromises glucose tolerance and metabolic flexibility. *Cell metabolism*. 2012;15(5):764-77.

26. Galgani JE, Moro C, Ravussin E. Metabolic flexibility and insulin resistance. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2008;295(5):E1009-17.
27. Dulloo AG. Thrifty energy metabolism in catch-up growth trajectories to insulin and leptin resistance. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*. 2008;22(1):155-71.
28. Dulloo AG, Antic V, Yang Z, Montani JP. Propellers of growth trajectories to obesity and the metabolic syndrome. *Int J Obes (Lond)*. 2006;30 Suppl 4:S1-3.
29. Martins VJ, Toledo Florencio TM, Grillo LP, do Carmo PFM, Martins PA, Clemente AP, et al. Long-lasting effects of undernutrition. *International journal of environmental research and public health*. 2011;8(6):1817-46.
30. Dunger DB, Salgin B, Ong KK. Session 7: Early nutrition and later health early developmental pathways of obesity and diabetes risk. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 2007;66(3):451-7.
31. Solon CS, Franci D, Ignacio-Souza LM, Romanatto T, Roman EA, Arruda AP, et al. Taurine enhances the anorexigenic effects of insulin in the hypothalamus of rats. *Amino acids*. 2012;42(6):2403-10.
32. Harada N, Ninomiya C, Osako Y, Morishima M, Mawatari K, Takahashi A, et al. Taurine alters respiratory gas exchange and nutrient metabolism in type 2 diabetic rats. *Obesity research*. 2004;12(7):1077-84.
33. Morita M, Ishida N, Uchiyama K, Yamaguchi K, Itoh Y, Shichiri M, et al. Fatty liver induced by free radicals and lipid peroxidation. *Free radical research*. 2012;46(6):758-65.
34. Fetoui H, Garoui M, Zeghal N. Protein restriction in pregnant- and lactating rats- induced oxidative stress and hypohomocysteinaemia in their offspring. *Journal of animal physiology and animal nutrition*. 2009;93(2):263-70.
35. Schmid E, Hotz-Wagenblatt A, Hacj V, Droge W. Phosphorylation of the insulin receptor kinase by phosphocreatine in combination with hydrogen peroxide: the structural

basis of redox priming. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1999;13(12):1491-500.

36. Wu X, Zhu L, Zilbering A, Mahadev K, Motoshima H, Yao J, et al. Hyperglycemia potentiates H₂O₂ production in adipocytes and enhances insulin signal transduction: potential role for oxidative inhibition of thiol-sensitive protein-tyrosine phosphatases. *Antioxidants & redox signaling*. 2005;7(5-6):526-37.

37. Das J, Ghosh J, Manna P, Sil PC. Acetaminophen induced acute liver failure via oxidative stress and JNK activation: protective role of taurine by the suppression of cytochrome P450 2E1. *Free radical research*. 2010;44(3):340-55.

38. Meshkani R, Adeli K. Hepatic insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Clinical biochemistry*. 2009;42(13-14):1331-46.

39. Garcia-Ruiz I, Solis-Munoz P, Gomez-Izquierdo E, Munoz-Yague MT, Valverde AM, Solis-Herruzo JA. Protein-tyrosine phosphatases are involved in interferon resistance associated with insulin resistance in HepG2 cells and obese mice. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(23):19564-73.

40. Stoker AW. Protein tyrosine phosphatases and signalling. *The Journal of endocrinology*. 2005;185(1):19-33.

41. Bence KK. Hepatic PTP1B Deficiency: The Promise of a Treatment for Metabolic Syndrome? *Journal of clinical metabolism & diabetes*. 2010;1(1):27-33.

42. Ross AH, Gericke A. Phosphorylation keeps PTEN phosphatase closed for business. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(5):1297-8.

Table 1 - Absolute Value of body mass, liver, muscle, pancreas, retroperitoneal fat and epididymal fat of C57BL/6 control (C), control + high fat diet (CH) and control + high fat diet + taurine (CHT), restricted (R), restricted + high fat diet (RH) and restricted + high fat diet + taurine (RHT) treated for 105 days.

	C	CH	CHT	R	RH	RHT
Body Mass(g)	27,68 ± 0,8	34,42 ± 1,32 ^{*#}	31,14 ± 1,11 [#]	21,10 ± 0,59 [*]	29,93 ± 1,03 ^{*#}	34,43 ± 0,93 ^{*#}
Liver (g)	1,17 ± 0,03	1,26 ± 0,04 [#]	1,28 ± 0,03 [#]	0,78 ± 0,18 [*]	1,01 ± 0,03 ^{*#}	1,27 ± 0,07 [#]
Muscle (g)	0,14 ± 0,007	0,16 ± 0,007 [#]	0,15 ± 0,008 [#]	0,11 ± 0,008 [*]	0,15 ± 0,008 [#]	0,15 ± 0,002 [#]
Pancreas (g)	0,18 ± 0,013	0,22 ± 0,017 [#]	0,20 ± 0,013 [#]	0,12 ± 0,011 [*]	0,19 ± 0,02 [#]	0,21 ± 0,015 [#]
Retroperitoneal Fat (g)	0,14 ± 0,01	0,40 ± 0,04 ^{*#}	0,31 ± 0,03 ^{*#}	0,15 ± 0,01	0,37 ± 0,02 ^{*#}	0,44 ± 0,04 ^{*#}
Epididymal Fat (g)	0,42 ± 0,04	1,07 ± 0,12 ^{*#}	0,83 ± 0,08 ^{*#}	0,37 ± 0,02	1,00 ± 0,09 ^{*#}	1,34 ± 0,13 ^{*#}

A Values represent mean ± SEM, n = 4-12.

2 * represents a statistical difference compared to the control group, P < 0.05 (one-way ANOVA and Tukey post test).

3 # represents a statistical difference compared to the restricted group, P < 0.05 (one-way ANOVA and Tukey post test).

Tab. 2 - Relative Value (g/ % g body weight) of body mass, heart, liver, muscle, spleen, kidney, pancreas, retroperitoneal fat and epididymal fat of C57BL/6 control (C), control + high fat diet (CH) and control + high fat diet + taurine (CHT), restricted (R), restricted + high fat diet (RH) and restricted + high fat diet + taurine (RHT) treated for 105 days.

	C	CH	CHT	R	RH	RHT
Liver (g)	4,25 ± 0,06	3,67 ± 0,07 [*]	4,15 ± 0,15 [#]	3,73 ± 0,08 [*]	3,39 ± 0,11 [*]	3,70 ± 0,17 [*]
Muscle (g)	0,52 ± 0,02	0,49 ± 0,01	0,49 ± 0,01	0,54 ± 0,03	0,50 ± 0,02	0,46 ± 0,009
Pancreas (g)	0,66 ± 0,04	0,61 ± 0,02	0,66 ± 0,02	0,53 ± 0,01 [*]	0,57 ± 0,02	0,62 ± 0,04
Retroperitoneal Fat (g)	0,53 ± 0,05	1,17 ± 0,07 ^{*#}	0,75 ± 0,06	0,73 ± 0,06 [*]	1,24 ± 0,06 ^{*#}	1,16 ± 0,10 ^{*#}
Epididymal Fat (g)	1,54 ± 0,14	3,38 ± 0,26 ^{*#}	2,84 ± 0,21 ^{*#}	1,74 ± 0,08	3,60 ± 0,30 ^{*#}	4,00 ± 0,26 ^{*#}

1 A Values represent mean ± SEM, n = 4-12.

2 * represents a statistical difference compared to the control group, P < 0.05 (one-way ANOVA and Tukey post test).

3 # represents a statistical difference compared to the restricted group, P < 0.05 (one-way ANOVA and Tukey post test).

Table 3 - The total protein, triglycerides, cholesterol, blood glucose and insulin for C56BL / 6 mice C57BL / 6 control (C), control + high fat diet (CH) and control + high fat diet + taurine (CHT), restricted (R), restricted + high fat diet (RH) and restricted + high fat diet + taurine (RHT) treated for 105 days.

	C	CH	CHT	R	RH	RHT
Total protein fasting (g/dl)	5,6 ± 0,09	5,42 ± 0,09 [#]	5,84 ± 0,23 [#]	4,83 ± 0,32 [*]	5,80 ± 0,17 [#]	5,91 ± 0,17 [#]
Fasting Triglycerides (g/dl)	72,37 ± 6,13	65,96 ± 5,17	79,10 ± 5,79	60,97 ± 9,12	72,23 ± 5,31	81,40 ± 5,05
Fasting Cholesterol (g/dl)	92,83 ± 7,29	143,2 ± 7,20 ^{*#}	119,7 ± 7,65 ^{*#}	94,31 ± 4,55	132,7 ± 11,12 ^{*#}	129,8 ± 7,22 ^{*#}
Fasting Glucose (mg/dl)	81,00 ± 3,96	89,29 ± 5,50 [*]	76,00 ± 4,11	65,22 ± 4,38 [*]	69,88 ± 5,16	87,83 ± 3,81
Fasting Insulin (ng/ml)	0,28 ± 0,03	0,91 ± 0,26 ^{*#}	0,41 ± 0,15	0,16 ± 0,01 [*]	0,56 ± 0,19	0,43 ± 0,10

A Values represent mean ± SEM. Total protein to fast n = 7-12, n = 7-8 triglycerides, cholesterol fasting n = 5-10, n = 4-6 fasting glucose, fasting insulin n = 7-8.

2^{*} represents a statistical difference compared to the control group, P < 0.05 (one-way ANOVA and Tukey post test).

3[#] represents a statistical difference compared to the restricted group, P < 0.05 (one-way ANOVA and Tukey post test).

Tab 4 – Gene Expression of SOD1, SOD2, CAT, GPx1, IR and AKT liver of mice C56BL / 6 control (C), control + high fat diet (CH) and control + high fat diet + taurine (CHT), restricted (R), restricted + high fat diet (RH) and restricted + high fat diet + taurine (RHT) treated for 105 days.

	C	CH	CHT	R	RH	RHT
SOD1/GAPDH	1,00	1,50 ± 0,46	1,09 ± 0,09	1,01 ± 0,17	1,08 ± 0,26	1,16 ± 0,15
SOD2/GAPDH	1,00	1,56 ± 0,34	1,16 ± 0,07	0,97 ± 0,10	1,18 ± 0,12	1,29 ± 0,14
CAT/GAPDH	1,00	1,49 ± 0,27	1,03 ± 0,27	1,06 ± 0,16	1,50 ± 0,02	1,65 ± 0,23
GPx1/GAPDH	1,00	1,42 ± 0,18	1,11 ± 0,14	0,88 ± 0,05	0,99 ± 0,20	0,89 ± 0,07
IR/GAPDH	1,00	1,59 ± 0,22	2,53 ± 0,66	0,94 ± 0,08	1,20 ± 0,21	3,03 ± 0,41 ^{&#}
AKT/GAPDH	1,00	1,31 ± 0,17	1,10 ± 0,07	0,97 ± 0,16	1,13 ± 0,09	1,49 ± 0,21

1 Values represent mean ± SEM. For n = 3-4 SOD1, SOD2 n = 3-4, CAT n = 4, n = 3-4 GPx1, IR and Akt n = 3-4 n = 4.

2[#] represents a statistical difference compared to the restricted group, P < 0.05 (one-way ANOVA and Tukey post test).

3[&] represents statistical difference within the same group, compared to the group receiving high-fat diet without taurine supplementation, P < 0.05 (one-way ANOVA and Tukey post test).

Figure 1

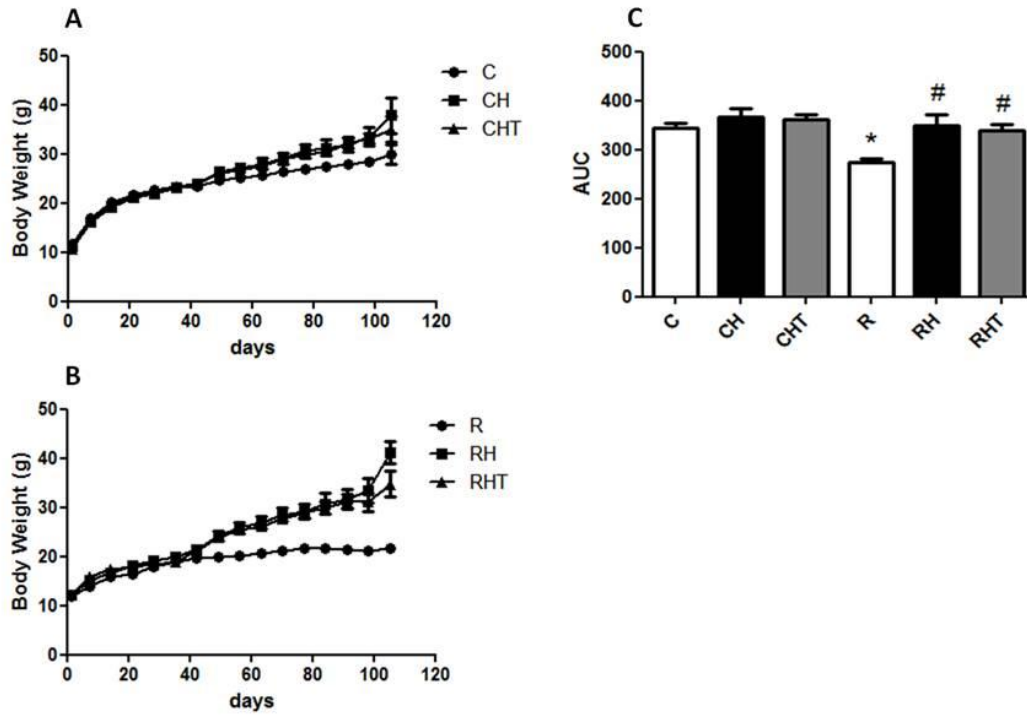


Figure 2

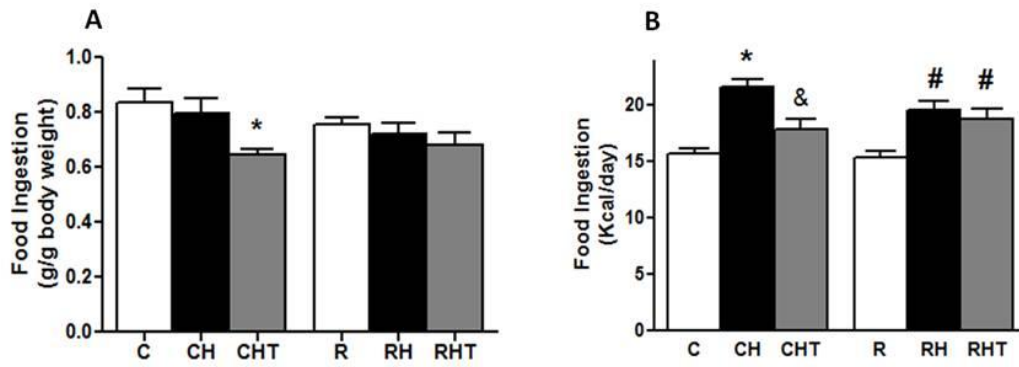


Figure 3

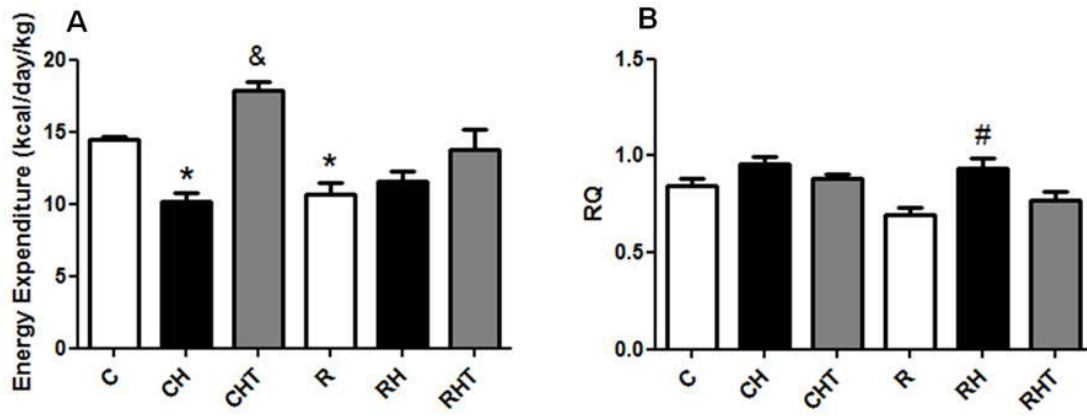


Figure 4

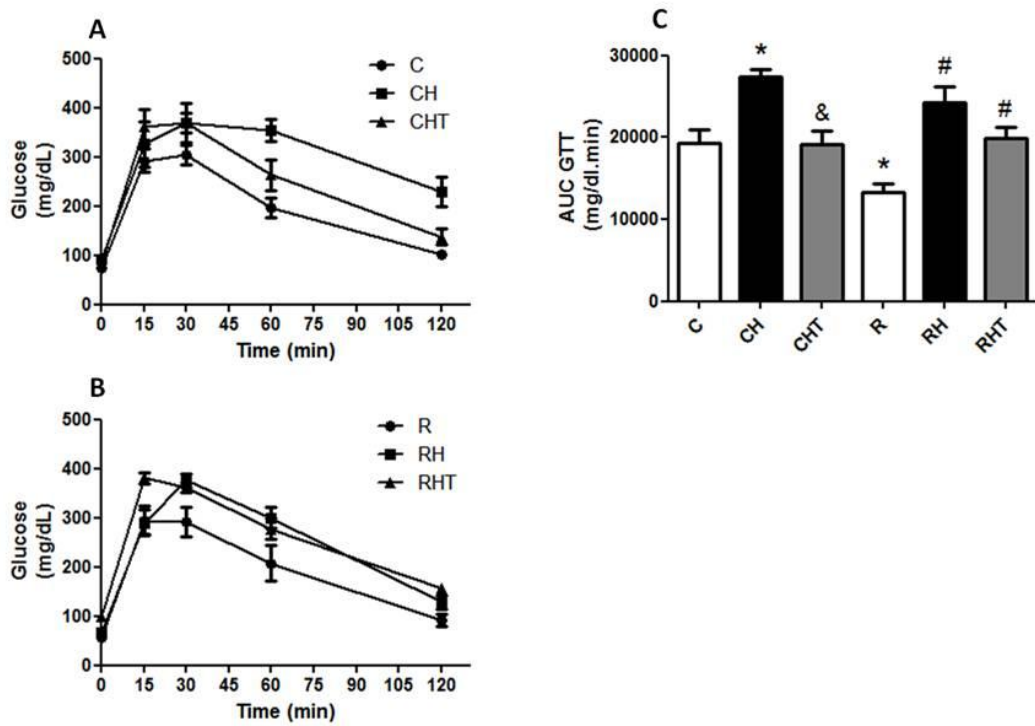


Figure 5

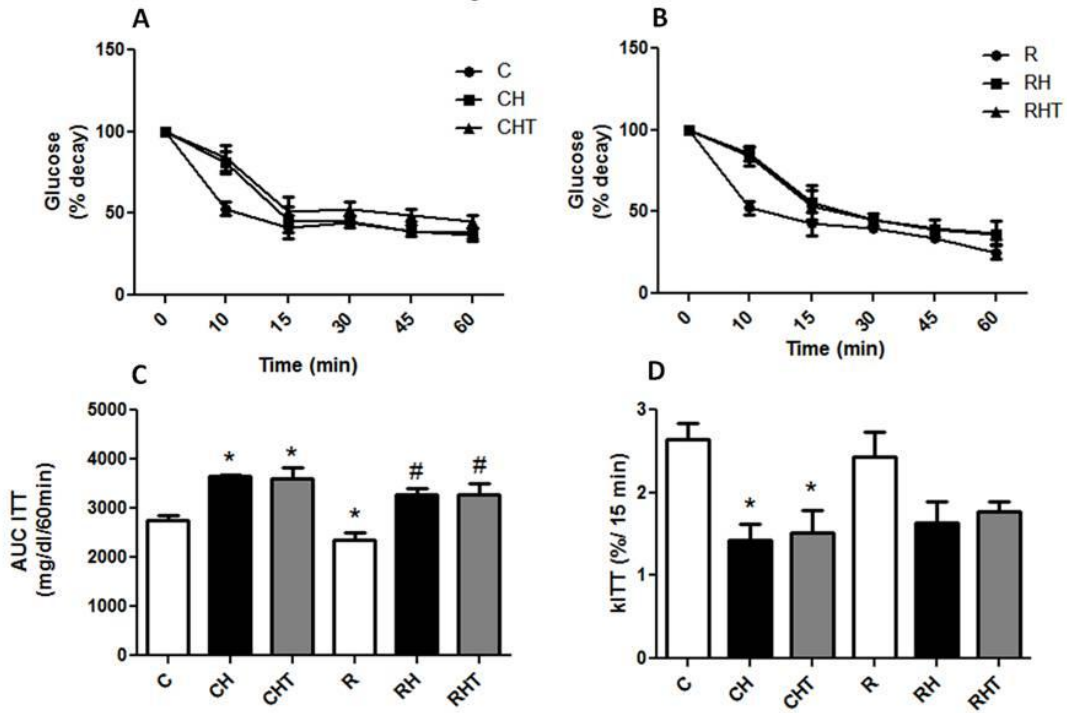


Figure 6

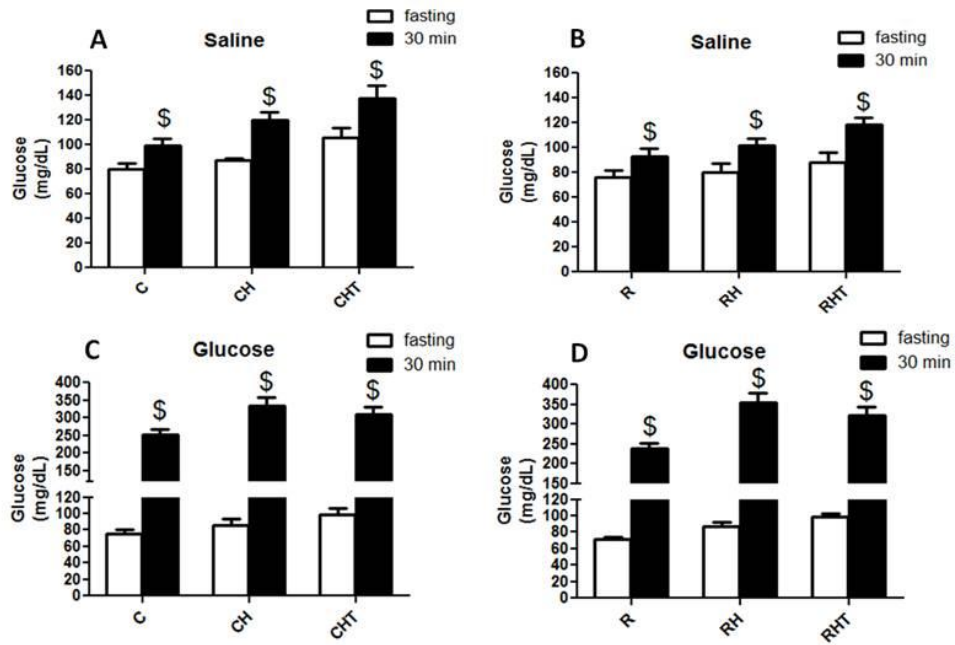


Figure 7

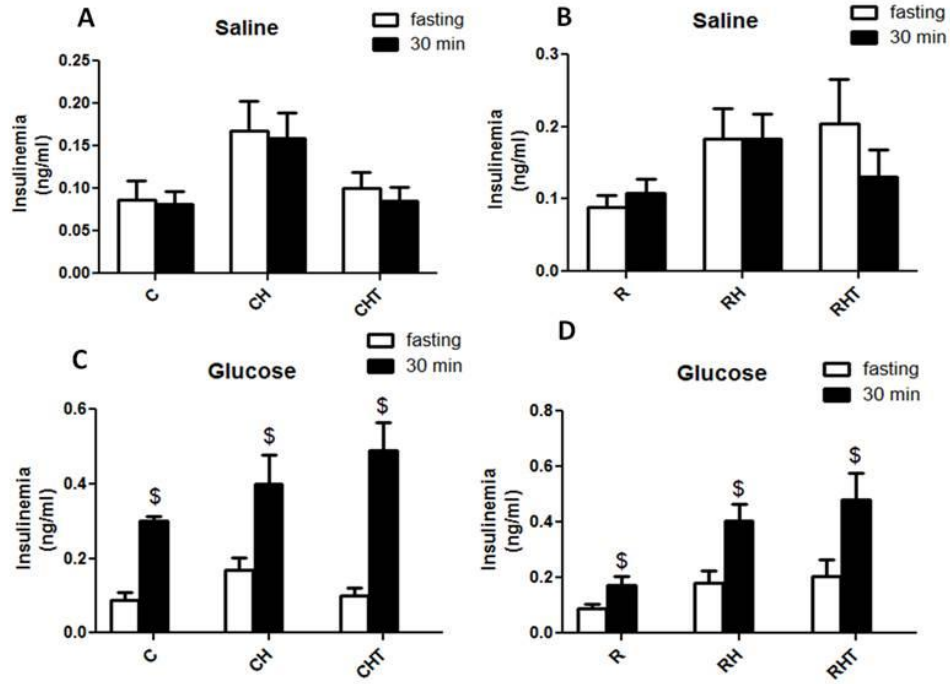


Figure 8

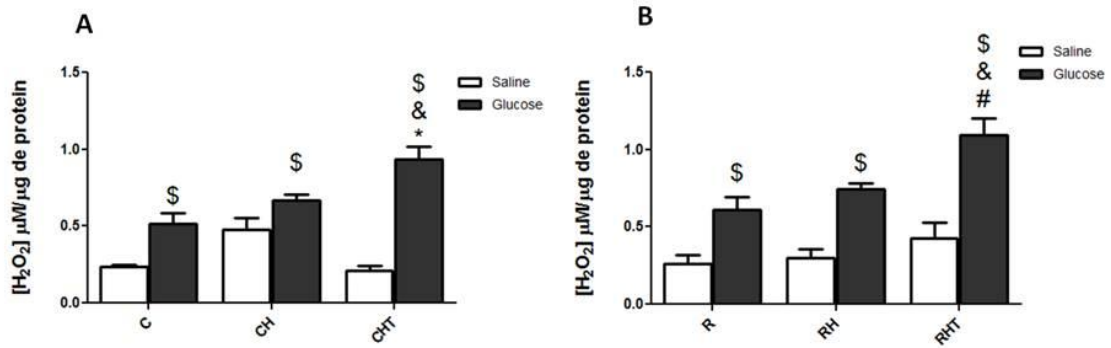


Figure 9

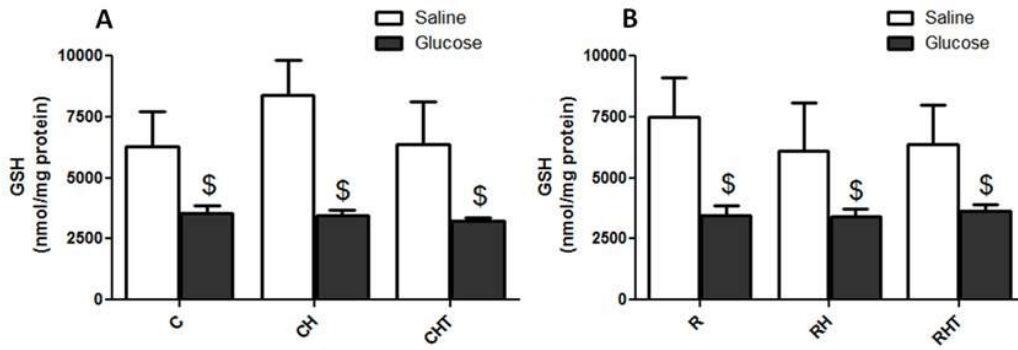


Figure 10

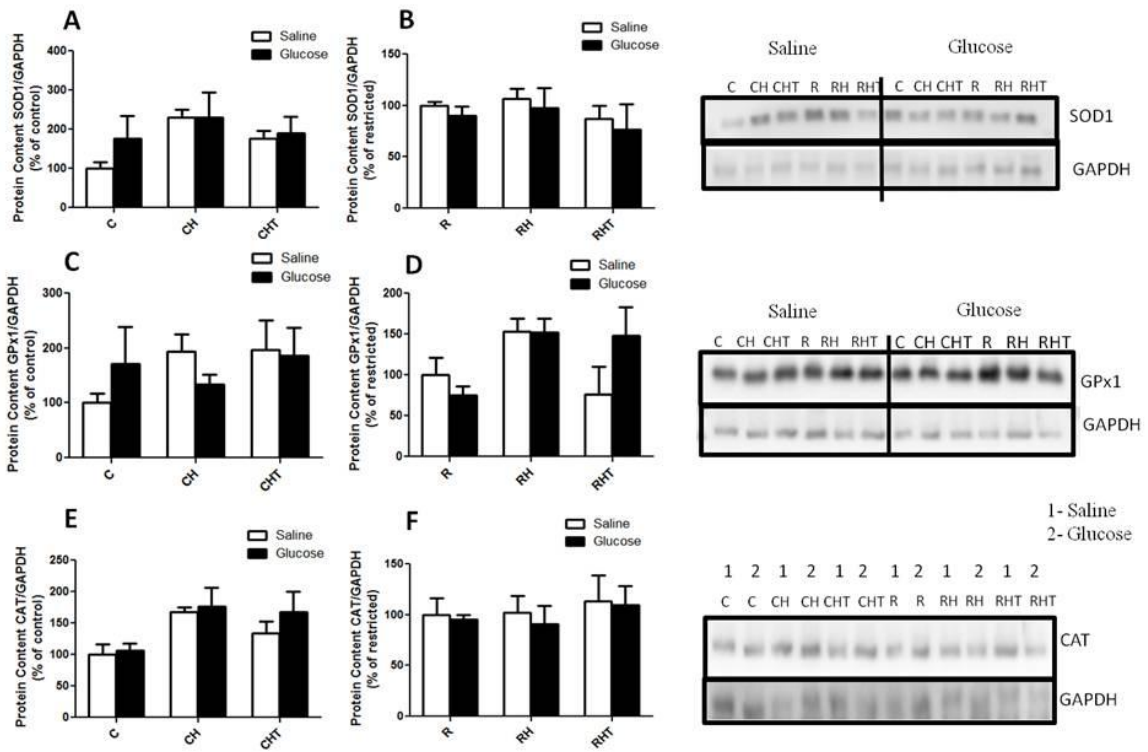


Figure 11

