

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - CAMPUS DE CASCAVEL
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM BIOCÊNCIAS E
SAÚDE – NÍVEL MESTRADO

GABRIELA ALVES BRONCZEK

**ÁCIDO TAUROURSODESÓXICÓLICO (TUDCA) MELHORA A INSULINEMIA
DE CAMUNDONGOS COM DIABETES DO TIPO 1 ATRAVÉS DO AUMENTO
DA SÍNTESE E REDUÇÃO DA DEGRADAÇÃO DE INSULINA**

CASCAVEL-PR
(Maio/2018)

GABRIELA ALVES BRONCZEK

**ÁCIDO TAUROURSODESOXICÓLICO (TUDCA) MELHORA A INSULINEMIA
DE CAMUNDONGOS COM DIABETES DO TIPO 1 ATRAVÉS DO AUMENTO
DA SÍNTESE E REDUÇÃO DA DEGRADAÇÃO DE INSULINA**

Dissertação apresentada ao Programa De Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Biociências e Saúde – Nível Mestrado, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título em Mestre em Biociências e Saúde.

Área de Concentração: Biologia, processo saúde-doença e políticas de saúde

ORIENTADOR: Dr. Antonio Carlos Boschero

CO-ORIENTADOR: Dra. Sandra Lucinei Balbo

CASCADEL-PR

(Maio/2018)

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Sistema de Bibliotecas – UNIOESTE)

B887a Bronczek, Gabriela Alves.
Ácido tauroursodesoxicólico (tudca) melhora a insulinemia de camundongos com diabetes do tipo 1 através do aumento da síntese e redução da degradação de insulina / Gabriela Alves Bronczek. --- Cascavel (PR), 2018.
87 f.: il.

Orientador: Dr Antonio Carlos Boschero.
Co-orientador: Dr^a Sandra Lucinei Balbo
Dissertação (Mestrado em Biociências e Saúde) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, 2018.
Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde.

1. Diabetes mellitus do tipo 1 . 2. Ácido tauroursodesoxicólico. 3. Insulina. I. Boschero, Antonio Carlos. II. Balbo, Sandra Lucinei. III. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. IV. Título.

CDD 618.92011



unioeste

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Campus de Cascavel CNPJ 78680337/0002-65
Rua Universitária, 2069 - Jardim Universitário - Cx. P. 000711 - CEP 85819-110
Fone:(45) 3220-3000 - Fax:(45) 3324-4566 - Cascavel - Paraná



GABRIELA ALVES BRONCZEK

Ácido tauroursodesoxicólico (TUCDA) melhora a insulinemia de camundongos com Diabetes do tipo 1 através do aumento da síntese e redução da degradação de insulina

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestra em Biociências e Saúde, área de concentração Biologia, Processo Saúde-doença e Políticas de Saúde, linha de pesquisa Fatores Que Influenciam A Morfofisiologia Orgânica, APROVADO(A) pela seguinte banca examinadora:

Antonio Carlos Boschero

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)

Claudia Silveira Viera

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)

Fernando Rodrigues de Moraes Abdulkader

Universidade de São Paulo (USP)

Cascavel, 28 de março de 2018

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Edina e Iranei, e à minha irmã, Beatriz, cujo apoio e confiança foram a maior motivação para a conclusão desta etapa.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço aos meus pais Edina e Iranei, que com muito amor sempre me apoiaram e confiaram em todas as minhas decisões. A eles e à minha irmã Beatriz, que sempre esteve ao meu lado, muito obrigada. Eles são as pessoas mais importantes da minha vida.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Boschero, meu orientador, que confiou em mim e me aceitou como sua aluna sem nem mesmo me conhecer. Sou muito grata pela oportunidade e por todo o apoio e confiança.

À Profa. Dra. Sandra Lucinei Balbo, por todo o apoio ao longo do desenvolvimento deste trabalho e, principalmente, por ter me apresentado ao meu orientador. Muito obrigada pela confiança e pela oportunidade.

Ao Dr José Maria Costa Júnior, agradeço todo o suporte e apoio para a realização deste trabalho, tanto na fase experimental quanto na escrita.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos membros das bancas de qualificação e defesa: Profa. Dra. Sabrina Grassioli, Profa. Dra. Cláudia Silveira Vieira, Profa. Dra. Maria Lúcia Bonfleur e Prof. Dr Fernando Rodrigues de Moraes Abdulkader, muito obrigada por aceitarem o convite e disporem do seu tempo para avaliar e contribuir com o meu trabalho.

Ao Jean F. Vettorazzi, à Gabriela Moreira Soares, à Mirian A. Kurauti, à Cristiane dos Santos, à Maressa F. Bonfim e ao José Maria, pela colaboração na realização dos experimentos e na escrita. Sinceramente, sem eles este trabalho não seria realizado. Além disso, agradeço pelo apoio e

principalmente pela amizade. Obrigada por terem me acolhido e feito me sentir em casa durante os meses em que passei em Campinas.

Às amigas do Laboratório de Fisiologia Endócrina e Metabolismo da Unioeste, Milara, Luana, Carine, Jake e Carol, muito obrigada por todos os momentos compartilhados e por não se esquecerem de mim enquanto estive longe.

A todos do Laboratório de Pâncreas Endócrino e Metabolismo da Unicamp, pois o período que estive no laboratório foi de grande aprendizado pessoal e profissional, além de ter possibilitado conhecer pessoas incríveis. Muito obrigada a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos amigos Ana Paula Mallmann, Ana Caroline Retameiro, Marina Martins, Camila Vogt, Jordana Yokoyama, Wimona-Lee Fortes de Oliveira e Leonardo Vieira Barreto, que, mesmo longe e tendo escolhido caminhos tão distintos, esses não foram capazes de afetar a nossa amizade. É com imenso carinho e amor que agradeço seu apoio e amizade durante todos esses anos.

A todos os professores que fizeram parte da minha formação, não apenas na universidade, mas todos aqueles que em alguma etapa da minha vida foram meus mentores.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação e da realização deste trabalho.

Obrigada!

RESUMO GERAL

BRONCZEK, G.A. **Ácido tauroursodesoxicólico (TUDCA) melhora a insulinemia de camundongos com Diabetes do tipo 1 através do aumento da síntese e redução da degradação de insulina.** 87 Páginas. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Campus Cascavel, Unioeste, 2018.

Pacientes com Diabetes Mellitus do tipo 1 (DM1) necessitam de administração diária de insulina exógena, o que pode causar eventos de hipoglicemia e outros efeitos colaterais. Diante disso, é de extrema importância encontrar moléculas endógenas que possam ser utilizadas no controle glicêmico no DM1 e que não apresentem efeitos colaterais. Nesse sentido, o ácido biliar conjugado com taurina, ácido tauroursodesoxicólico (TUDCA), tem se mostrado eficaz no tratamento do Diabetes Mellitus do tipo 2; contudo, sua eficiência no tratamento do DM1 tem sido menos explorada. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do TUDCA no controle glicêmico de camundongos com DM1. Para tanto, foram utilizados camundongos C57BL/6 divididos inicialmente em dois grupos: 1) Grupo controle (CTL n=6), que recebeu injeção intraperitoneal (i.p.) de tampão citrato de sódio (0,5 M, pH 4,5) e 2) Grupo estreptozotocina (STZ n=22), o qual recebeu uma dose i.p. de 40mg/kg de STZ (dissolvida em tampão citrato de sódio 0,5 M, pH 4,5) durante cinco dias para indução do DM1. Uma vez instalado o DM1 no grupo STZ, esse foi subdividido em dois grupos: 1) STZ (n=10), que recebeu injeção i.p. de PBS e 2) STZ+TUDCA (n=12), que recebeu uma dose i.p. de 300 mg/kg de TUDCA (dissolvido em PBS). Essas administrações foram executadas diariamente durante 24 dias. Após 15 dias de tratamento, os animais do grupo STZ+TUDCA apresentaram redução de 43% na glicemia, comparado ao grupo STZ. Essa redução da glicemia, provavelmente, deveu-se a um aumento da insulinemia, observada ao final do tratamento. Esse aumento da insulinemia pode ser explicado, pelo menos em parte, pela redução da atividade hepática da IDE (*insulin degrading enzyme*), responsável pela degradação da insulina, bem como pelo aumento da massa de células beta e da quantidade dessas células por ilhota. Juntos, esses efeitos contribuíram para a melhora na flexibilidade metabólica nos camundongos STZ+TUDCA. Concluímos, então, que o TUDCA apresenta potencial terapêutico para o controle da glicemia no DM1.

Palavras-chave: diabetes mellitus do tipo 1, insulina, TUDCA.

GENERAL ABSTRACT

BRONCZEK, G.A. **Tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) improves insulinemia in Type-1 Diabetic mice by increasing insulin synthesis and reducing its degradation.** 87 Páginas. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Campus Cascavel, Unioeste, 2018.

Appropriate control of glycaemia in type 1 diabetic patients (T1D) needs daily insulin administration, which can lead to hypoglycemic events and others side effects. Therefore, it is important to find endogenous molecules, without side effects, for T1D treatment. In this sense, the biliary acid conjugated with taurine, tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) presents positive effects in type 2 diabetes treatment. However, its beneficial effects on T1D have been less explored. Thus, we have assessed the effects of TUDCA on glycemic control in streptozotocin-induced diabetic mice. For this, C57BL/6 mice received intraperitoneal (i.p.) administration of streptozotocin (40mg/kg, streptozotocin was dissolved in 0,5 M citrate buffer, pH 4,5) for 5 days, STZ group (n=22). Whereas control (CON) group (n=6) received the same volume of citrate buffer. Once confirmed diabetes in the STZ group, diabetic mice were randomly selected and allocated in the 2 following groups: 1) STZ group (n=10) that received i.p. PBS, and 2) STZ+TUDCA group (n=12) that received i.p. 300 mg/kg TUDCA (dissolved in PBS). These treatments were maintained for 24 days. After 15 days of treatment, STZ+TUDCA mice showed a 43% reduction in blood glucose, compared with STZ. This reduction was probably due to an increase in insulinemia. This increase in insulinemia may be explained, at least in part, by a reduction in hepatic activity of IDE (*insulin degrading enzyme*) the enzyme responsible for insulin degradation, as well as by an increase in beta cell mass and higher beta cell number per islet. All together, these effects contributed to the improvement of metabolic flexibility. In conclusion, TUDCA shows therapeutic potential for the control of glycemia in T1D.

Keywords: Type 1 Diabetes, insulin, TUDCA

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| LISTA DE FIGURAS | 7 |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | 8 |
| INTRODUÇÃO GERAL | 10 |
| OBJETIVO GERAL | 14 |
| Objetivos Específicos..... | 14 |
| REVISÃO GERAL DE LITERATURA | 15 |
| 1. Insulina | 15 |
| 2. Diabetes Mellitus | 18 |
| 3. Ácidos Biliares | 23 |
| 4. Ácido Tauroursodesoxicólico (TUDCA) | 29 |
| 5. Modelo Experimental: Estreptozotocina | 32 |
| REFERÊNCIAS | 34 |
| ARTIGO CIENTÍFICO | 53 |
| ANEXO A | 70 |
| Certificado do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas..... | 70 |
| ANEXO B | 71 |
| Normas da Revista Científica..... | 71 |

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. **Síntese dos ácidos biliares.** Duas vias de síntese de ácidos biliares estão ilustradas. A via clássica é iniciada pela enzima CYP7A1, dando origem ao CDCA. Quando há presença da enzima CYP8B1, resulta na formação do CA. A via alternativa é iniciada pela enzima CYP27A1, dando origem ao CDCA. No intestino grosso, por ação da microbiota, o CA e o CDCA são convertidos em DCA e LCA, respectivamente. No fígado de camundongos, a maior parte do CDCA é convertido em BMCA. No intestino, a CYP3A1 e epimerase também converte o CDCA em ácidos biliares secundários como THCA, TMDCA, THDCA e TUDCA. Uma grande quantidade de LCA é excretado nas fezes. Adaptado de: LI; CHIANG, 2014.....**24**

Figura 2. **Transporte dos ácidos biliares e a circulação entero-hepática.** Na circulação entero-hepática os ácidos biliares são secretados dos hepatócitos para o espaço canalicular e seguem para a vesícula biliar, onde são armazenados. A ingestão alimentar estimula a vesícula biliar a liberar a bile no intestino delgado, onde ~95% dos ácidos biliares pode ser reabsorvido no íleo e secretados novamente na circulação portal. Aproximadamente 5% do total de ácidos biliares são perdidos nas fezes. Os ácidos biliares são captados pelos hepatócitos na membrana basolateral e re-secretados na bile, e a captação e secreção desses compostos é mediada por transportadores. O cotransportador BSEP é o transportador responsável pelo efluxo dos ácidos biliares nos hepatócitos. No intestino delgado, os ácidos biliares são absorvidos pelos enterócitos através do cotransportador apical ASBT e são secretados na circulação portal pelo transportador basolateral heterodímero OST α/β . Por fim, o cotransportador NTCP é o principal transportador para captação de ácidos biliares pelos hepatócitos. Adaptado de: LI; LI, 2017.....**26**

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--|---|
| AB: Ácido biliar | DIO2: Iodotironina desiodase 2 |
| ACC: Acetil-CoA carboxilase | DM1: Diabetes Mellitus tipo 1 |
| ADP: Adenosina difosfato | DM2: Diabetes Mellitus do tipo 2 |
| AKT/PKB: Proteína quinase B | DNA: Ácido desoxirribonucleico |
| AS160: Substrato de Akt de 160 kDa | EGFR: Epidermal growth factor receptor |
| ASBT: Apical sodium-dependent bile acid transporter | ERK 1/2: Extracellular signal-regulated kinase 1/2 |
| ATP: Adenosina trifosfato | FAS: Ácido graxo sintase |
| BAAT: Bile acid: amino acid transferase | FGF15/19: Fibroblast growth factor 15/19 |
| BAC: Bile acid Co:A synthase | FoxO1: Forkhead box protein O1 |
| BMCA: Ácido muricólico | FXR: Farnesoid X receptor |
| BSEP: Bile salt export pump | G6Pase: Glicose-6-fosfatase |
| Ca²⁺: Cálcio | GCA: Ácido glicocólico |
| CA: Ácido cólico | GDCA: Ácido glicodeoxicólico |
| cAMP: Monofosfato cíclico de adenosina | GK: Glicoquinase |
| CDCA: Ácido quenodesoxicólico | GLP-1: Peptídeo semelhante a glucagon - 1 |
| ChREBP: Proteína de ligação ao elemento responsivo aos carboidratos | GLUT2: Transportador de glicose do tipo 2 |
| CR: Coeficiente respiratório | GLUT4: Transportador de glicose do tipo 4 |
| CYP7A1: Cytochrome P450 family 7 subfamily A member 1 | GS: Glicogênio sintase |
| CYP8B1: Cytochrome P450 family 8 subfamily B member 1 | GTP: Trifosfato de guanossina |
| CYP27A1: Cytochrome P450 family 27 subfamily a member 1 | IDE: Insulin degrading enzyme |
| DCA: Ácido deoxicólico | IL-1β: Interleucina 1 β |
| | INF-γ: Interferon γ |

IR: Receptor de insulina

IRS: Substratos do receptor de insulina

K⁺: Potássio

LCA: Ácido litocólico

MAPK: Mitogen activated kinase

mRNA: RNA (ácido ribonucleico) mensageiro

NTCP: Na⁺-traurocholate cotransport peptide

OST α/β : Organic salute transporter α/β

PEPCK: Fosfatidilinositol carboxiquinase

PGC-1: Co-ativador de transcrição gênica

PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinase

PK: Piruvato quinase

PKA: Proteína quinase A

PPAR α/γ : Receptor ativado por proliferador de peroxissoma α/γ

RE: Retículo endoplasmático

S1PR2: Sphingosin 1 phosphate receptor 2

SHP: Small heterodimer partner

SREBP1c: Proteína de ligação ao elemento regulador do estero1 1c

STZ: Estreptozotocina

T3: Triiodotironina

T4: Tiroxina

TCA: Ácido taurocólico

TCD4⁺: Linfócitos T auxiliares CD4⁺

TCD8⁺: Linfócitos T citotóxicos CD8⁺

TDCA: Ácido taurodeoxicólico

TGR5: Takeda G receptor

THCA: Ácido triidroxicolestonóico

THDCA: Ácido triidroxideoxicólico

TNF- α : Fator de necrose tumoral α

TUDCA: Ácido tauroursodesoxicólico

UDCA: Ácido ursodesoxicólico

UPR: Unfolded protein response

INTRODUÇÃO GERAL

Um dos principais hormônios secretados pelo pâncreas é a insulina, a qual é produzida pelas células beta (β) das ilhotas pancreáticas e secretada de acordo com a demanda imposta pelo catabolismo dos macronutrientes, principalmente a glicose (BANTING; BEST, 1990; CABRERA et al., 2006; WIERUP et al., 2014). A insulina age em vários tecidos periféricos, incluindo o músculo, o fígado e o tecido adiposo. Entre seus efeitos metabólicos imediatos, encontram-se o aumento da captação da glicose, o aumento da síntese de proteínas, de ácidos graxos e de glicogênio, assim como o bloqueio da produção hepática de glicose, da lipólise e proteólise (ZECCHIN et al., 2004).

Outra parte importante da resposta da célula à insulina é o seu *clearance*, que consiste em remover e inativar o hormônio (DUCKWORTH, et al., 1998). O principal responsável por esse processo é o fígado, que degrada cerca de 50% do hormônio que é secretado (CASTILLO, et al., 1994; DUCKWORTH, et al., 1998). O *clearance* ocorre por meio de três etapas: primeiramente, ocorre a ligação da insulina ao receptor (IR); em seguida, o complexo insulina-IR é internalizado; e, finalmente, o hormônio é degradado pela enzima IDE (IDE do inglês “*insulin degrading enzyme*”) (DUCKWORTH, et al., 1998; BRANDIMARTI, et al., 2013; KURAUTI, et al., 2016).

Sendo assim, é importante o balanço entre a secreção e o *clearance* de insulina, a fim de manter a concentração plasmática adequada desse hormônio (ERDMANN, et al., 2009), uma vez que a insulina estimula a captação de glicose, a qual é considerada a principal fonte de energia para o organismo. Dessa forma, a deficiência desse hormônio pode resultar em hiperglicemia, dislipidemia ou Diabetes Mellitus (NEWSHOLME et al., 2014).

Entre os tipos de Diabetes Mellitus encontra-se o do tipo 1 (DM1, doravante). O DM1 é uma doença autoimune que provoca a progressiva

destruição das células beta pancreáticas, resultando na deficiência da produção e da secreção de insulina (MAGANTI et al., 2014). Essa doença acomete principalmente crianças e jovens adultos e sua incidência cresce cerca de 3% ao ano (FID, 2015). Os sintomas clínicos clássicos do DM1 são: hiperglicemia; polidipsia; poliúria; cansaço extremo; fome constante; perda de peso repentina e visão embaçada (CHIANG et al., 2014).

Pacientes com DM1 também apresentam lipólise elevada, além de altas concentrações de ácidos graxos livres e triglicerídeos, bem como elevada concentração de corpos cetônicos e redução do coeficiente respiratório (CR) (KELLEY; MANDARINO, 2000). A redução do CR se deve ao fato de que, com a deficiência na produção e na secreção de insulina, o indivíduo reduz a sua capacidade de alternar entre oxidar lipídeos durante o jejum e aumentar a captação, a oxidação e o armazenamento de carboidratos após uma refeição (RANDLE, 1986).

Adicionalmente, quando não realizado o tratamento e o acompanhamento adequados da doença, o indivíduo acometido pelo DM1 pode apresentar complicações como neuropatia, convulsões, doenças cardiovasculares, cegueira, insuficiência renal, alto risco de desenvolver infecções e até mesmo o coma em situações mais severas (DOS SANTOS GOMIDES et al., 2013; FID, 2015).

Diante disso, a administração de insulina exógena é o principal tratamento para a manutenção do controle glicêmico no DM1. Contudo, esse tratamento apresenta efeitos secundários como a hipoglicemia (DEWITT; HIRSCH, 2003; BERGENSTAL et al., 2010), além de dificuldade de adesão, uma vez que a maioria dos pacientes são crianças e adolescentes (HILLIARD et al., 2013). Nesse contexto, a procura por moléculas endógenas com efeito benéfico sobre o controle glicêmico e que não apresentem efeitos colaterais e dificuldade de adesão é de extrema importância. Dessa forma, os ácidos biliares (AB, de ora em diante) demonstram ser potenciais candidatos para o tratamento do DM1, haja vista que atuam como sinalizadores endócrinos, regulando o metabolismo lipídico, energético e glicêmico (CHIANG, 2013).

Os ABS são compostos sintetizados no fígado, a partir do colesterol. Por muitos anos, acreditou-se que esses compostos atuavam somente na digestão. No entanto, comprovou-se que também agem como sinalizadores endócrinos mediante à ativação de alguns receptores nucleares, como o FXR (farnesoid X receptor) e receptores de membrana, como o TGR5 (Takeda G receptor) e o S1PR2 (Sphingosin 1 phosphate receptor 2) (CHIANG, 2013).

Dentre os ABs, destaca-se o ácido tauroursodesoxicólico (TUDCA, deste ponto em diante) que é sintetizado nos hepatócitos a partir da conjugação do AB ursodesoxicólico (UDCA, doravante) com a taurina. O UDCA e seus conjugados são encontrados em alta concentração na bile de ursos (HAGEY et al., 1993), porém, em humanos, representam uma pequena porcentagem do conteúdo total de ABS (BENTAYEB et al., 2008).

Atualmente, tanto o UDCA quanto o TUDCA são comercializados em diversos países para o tratamento de doenças hepáticas, principalmente para a cirrose biliar primária e para a dissolução de cálculos biliares, devido à sua capacidade de solubilizar o colesterol e reduzir a sua saturação na bile (SALEN et al., 1991; RUBIN et al., 1994; CROSIGNANI et al., 1996). O TUDCA também apresenta mecanismos antiapoptóticos em diferentes tipos celulares (XIE et al., 2002; SOLÁ et al., 2003; SCHOEMAKER et al., 2004), além de potencializar a secreção de insulina estimulada por glicose em ilhotas pancreáticas (VETTORAZZI et al., 2016).

Ademais, também já foi observado que a ativação do receptor S1PR2 pelo TUDCA no fígado estimula a ativação da via da insulina (STUDER et al., 2012), assim como modula a atividade da IDE melhorando o *clearance* de insulina em modelo animal resistente ao hormônio (VETTORAZZI et al., 2017). Esse AB também apresenta função de chaperona química, o qual melhora o enovelamento de proteínas e, assim, reduz o estresse no retículo endoplasmático (RE) (OZCAN et al., 2009).

Nesse sentido, estudos demonstram que o TUDCA tem efeito protetor tanto nos hepatócitos quanto em ilhotas pancreáticas, restaurando a

homeostase glicêmica por meio da redução do estresse no RE, desenvolvendo papel importante na patogênese da obesidade, resistência à insulina e a diabetes (MAKISHIMA et al., 2002; XIE et al., 2002; OZCAN et al., 2006; LEE et al., 2010).

Adicionalmente, Engin e colaboradores (2013) demonstraram que a administração de TUDCA no estágio pré-diabético em modelo animal experimental resultou na redução da incidência de DM1, bem como reduziu a insulite e a destruição das ilhotas mediada por resposta imune, além de restaurar a expressão de mediadores da UPR (unfolded protein response), que é a resposta desencadeada pelo RE frente ao estresse, no sentido de restaurar a homeostase. Aliado a isso, evidências obtidas a partir de estudos piloto do nosso grupo, com camundongos com DM1 severo induzido por estreptozotocina, demonstram redução na glicemia e aumento da sobrevivência quando tratados com TUDCA. No entanto, os mecanismos envolvidos na normalização da glicemia em animais com DM1 e tratados com esse AB ainda não foram explorados.

Diante disso, hipotetizamos que o tratamento com o TUDCA melhora a glicemia no DM1 devido à melhora da homeostase da insulina através da síntese, degradação e ação da insulina.

OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do ácido tauroursodesoxicólico (TUDCA) sobre a homeostase da insulina em camundongos com Diabetes Mellitus do tipo 1 induzido por estreptozotocina.

Objetivos Específicos

- Avaliar a glicemia e o peso corporal;
- Analisar a tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina;
- Mensurar o coeficiente respiratório;
- Avaliar a concentração plasmática de insulina;
- Quantificar a expressão proteica e atividade enzimática da IDE;
- Avaliar a área total e massa da ilhota pancreática, bem como das células β .

REVISÃO GERAL DE LITERATURA

1. Insulina

O pâncreas é uma glândula mista composta pelas regiões exócrina e endócrina. Os ácinos, responsáveis pelas secreções digestivas, compõem a região exócrina, enquanto a região endócrina é constituída pelas ilhotas pancreáticas, as quais secretam hormônios como a insulina, por exemplo (PAN; WRIGHT, 2011; SHIH et al., 2013). O pâncreas humano tem entre um e dois milhões de ilhotas, que se organizam em torno de pequenos capilares nos quais suas células secretam seus hormônios (PAN; WRIGHT, 2011).

As ilhotas apresentam três principais grupos celulares: as células alfa (α), células beta (β) e células delta (δ), que se distinguem entre si devido à síntese e à secreção do glucagon, insulina e somatostatina, respectivamente (CABRERA et al., 2006; WIERUP et al., 2014). Em humanos, a maior parte das células constituintes da ilhota (~50%) corresponde às células beta, dispostas centralmente e responsáveis pela produção e pela secreção de insulina, peptídeo-c e o peptídeo amilina (NEWSHOLME et al., 2011; RORSMAN; BRAUN, 2013). As células α abrangem ~40% da região endócrina da ilhota (NOLAN et al., 2011), enquanto as células restantes são as células δ e células PP que produzem o polipeptídeo pancreático (RUTTER, 2001). Já em roedores, as células beta correspondem a ~75% do conteúdo total da ilhota, as células α ~20% e o restante compreende às células δ e PP (PAN; WRIGHT, 2011).

Além do mais, as ilhotas apresentam outros tipos celulares menos conhecidos e que podem aparecer de forma transiente durante o desenvolvimento dependendo da espécie. Um exemplo disso são as células enterocromafins, produtoras de serotonina, que são encontradas de forma dispersa no pâncreas de algumas espécies, como os suínos (CAPELLA et al., 1978). Outro exemplo são as células G, produtoras de gastrina, que estão

presentes nas ilhotas de roedores durante o desenvolvimento neonatal (LARSSON et al., 1976). Outrossim, existem células secretoras de grelina que, em humanos, correspondem a aproximadamente 10% do total de células da ilhota no período neonatal, reduzindo para cerca de 1% quando o indivíduo atinge a fase adulta. Assim como em humanos, nos roedores, as células secretoras de grelina também estão presentes nas ilhotas durante o desenvolvimento fetal e neonatal. Contudo, quando o animal atinge a fase adulta elas são extremamente raras (WIERUP et al., 2014).

Um dos hormônios secretados pelo pâncreas é a insulina, um hormônio proteico formado por duas cadeias de aminoácidos conectadas por meio de ligações dissulfeto (BANTING; BEST, 1990). Sua síntese tem início com a tradução do mRNA da insulina por meio dos ribossomos ligados ao RE, gerando o pré-pró-hormônio da insulina. Esse pré-pró-hormônio é clivado no RE, formando a pró-insulina. A pró-insulina é em grande parte clivada novamente no complexo de Golgi dando origem à insulina e fragmentos de peptídeos (SILVERTHORN, 2010).

O principal estímulo para a secreção de insulina é o aumento da concentração plasmática de glicose. A glicose absorvida no intestino delgado chega às células beta que possuem um grande número de transportadores de glicose (GLUT2) (RUTTER et al., 2015). Uma vez dentro das células, a glicose é fosforilada a glicose-6-fosfato e, subsequentemente, oxidada formando trifosfato de adenosina (ATP). O aumento da razão ATP/ADP inibe os canais de K^+ sensíveis ao ATP e, o fechamento desses canais, gera a despolarização da membrana celular. Dessa forma, abrem-se os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, produzindo um influxo de Ca^{2+} que estimula a fusão das vesículas que contêm insulina, com a membrana celular (JAHN; FASSHAUER, 2012; RUTTER et al., 2015).

Quando a insulina chega às células-alvo, ela se liga e ativa um receptor proteico de membrana. O receptor de insulina é uma combinação de quatro subunidades que se mantêm unidas por meio de ligações dissulfeto: duas subunidades alfa externas à membrana celular e duas subunidades beta que penetram através da membrana, projetando-se no citoplasma celular

(MOSTHAF et al., 1990; PESSIN; SALTIEL, 2000). A insulina se liga às subunidades alfa do lado externo da célula, promovendo a autofosforilação das subunidades beta, o que, por sua vez, causa a fosforilação de diversas outras proteínas adaptadoras intracelulares, inclusive de um grupo chamado de substratos do receptor de insulina (IRS) (WHITE et al., 1988; PATTI; KAHN, 1998).

Quando fosforilados, os IRS indiretamente promovem a ativação de duas outras proteínas: a fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e, na sequência, a proteína quinase B (PKB) ou AKT. Quando ativada ou fosforilada, a AKT fosforila e inibe a proteína substrato da AKT de 160 kDa (AS160) que, quando inibida, promove o acúmulo de guanosina trifosfato (GTP) nas vesículas onde armazenam-se os transportadores de glicose do tipo 4 (GLUT4), resultando na sua translocação até a membrana plasmática, o que permite o aumento da captação de glicose e reestabelecimento da euglicemia (GUO, 2014).

A insulina age em vários tecidos periféricos, incluindo músculo, fígado e tecido adiposo. Seus efeitos metabólicos imediatos são o aumento da captação da glicose, principalmente no tecido muscular e adiposo, o aumento da síntese de proteínas, de ácidos graxos e de glicogênio, assim como o bloqueio da lipólise e da proteólise (ZECCHIN et al., 2004), além da redução da produção hepática de glicose por meio do bloqueio da gliconeogênese e da glicogenólise. Desse modo, no fígado, a insulina inibe a transcrição do gene que codifica a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), uma enzima chave no controle da gliconeogênese, bem como reduz a transcrição do gene que codifica a glicose-6-fosfatase (G6Pase) e aumenta a transcrição de enzimas glicolíticas, como a glicoquinase (GK) e piruvato quinase (PK), e enzimas lipogênicas, como o ácido graxo sintase (FAS) e a acetil-CoA carboxilase (ACC) (SALTIEL; KAHN, 2001). A via de sinalização celular induzida por insulina também ativa a via da MAP quinase (Ras-mitogen-activated protein kinase - MAPK), a qual exerce impacto sobre os mecanismos de controle do crescimento e diferenciação celular (AVRUCH, 1998; FANTIN et al., 2000).

Outra parte importante e integral da resposta da célula à insulina é o *clearance*, que consiste em remover e inativar o hormônio (DUCKWORTH

et al., 1998). Esse processo ocorre por meio de três etapas: 1) ligação da insulina ao receptor (IR) localizado na membrana plasmática das células; 2) internalização do complexo insulina-IR por meio de vesículas intracitoplasmáticas ou por endossomos; e 3) degradação do hormônio pela IDE (IDE do inglês “*insulin degrading enzyme*”) (DUCKWORTH et al., 1998; BRANDIMARTI et al., 2013; KURAUTI et al., 2016).

Quando a insulina é secretada na corrente sanguínea, cerca de 50% do conteúdo secretado já é degradado pelo fígado na primeira passagem pelo sistema porta. No entanto, a degradação de insulina também ocorre em outros tecidos, mas em menor quantidade, como o músculo esquelético, tecido adiposo e principalmente os rins (CASTILLO et al., 1994; DUCKWORTH et al., 1998).

Sendo assim, a regulação da concentração de insulina plasmática é extremamente importante para a manutenção da homeostasia, uma vez que esse hormônio exerce papel central no metabolismo dos macronutrientes, principalmente no da glicose, caracterizando-se como o único hormônio hipoglicemiante em mamíferos. Dessa forma, a deficiência de insulina pode resultar em hiperglicemia, dislipidemia ou diabetes mellitus (NEWSHOLME et al., 2014).

2. Diabetes Mellitus

O Diabetes Mellitus é uma doença crônica que resulta da disfunção na produção ou na resposta à insulina, ocasionando aumento da concentração plasmática de glicose (DE FERRANTI et al., 2014). As duas principais formas nas quais a doença se apresenta são o Diabetes Mellitus do tipo 1 (DM1) e do tipo 2 (DM2). O DM1 é uma doença autoimune que provoca a progressiva destruição das células beta pancreáticas, as quais são responsáveis pela produção e pela secreção de insulina. Dessa forma, por se tratar de um hormônio essencial para a manutenção da homeostase glicêmica, o paciente com DM1 apresenta a necessidade da administração diária de

insulina (MAGANTI et al., 2014). O DM1 acomete pessoas de todas as idades, mas preferencialmente crianças e jovens adultos (FID, 2015).

Por outro lado, o DM2 geralmente está associado à obesidade ou ao sobrepeso (WHO, 2016). Esse tipo de diabetes é caracterizado pela deficiência na ação periférica da insulina, levando à resistência ao hormônio. Dessa forma, a lipotoxicidade, devido à obesidade, aliada à glicotoxicidade, proveniente da resistência à insulina, podem levar à redução da função e da massa das células beta (CNOP et al., 2005; KAHN et al., 2006).

O DM1 não é tão comum quanto o DM2, mas ainda cresce cerca de 3% ao ano, particularmente em crianças. Com relação à população mundial, existem aproximadamente 542.000 crianças com DM1. O Brasil, nesse contexto, ocupa o terceiro lugar no ranking dos 10 países com o maior número de crianças acometidas pela doença, totalizando 30.900 crianças de 0-14 anos, ficando atrás apenas da Índia (70.200) e dos Estados Unidos (84.100) (FID, 2015).

De modo geral, o DM1 é uma doença autoimune desencadeada pela predisposição genética associada a fatores ambientais, resultando na destruição das células beta e, conseqüentemente, na deficiência de insulina (KATSAROU et al., 2017). O indivíduo que apresenta predisposição genética, quando exposto a um fator ambiental de estresse, desencadeia uma resposta imune exacerbada causando insulite. No início, as ilhotas sofrem infiltração de macrófagos e células dendríticas, que, por sua vez, ativam células TCD4⁺ (PIROT et al., 2008).

As células TCD4⁺ estimulam os macrófagos e as células dendríticas a secretar citocinas e óxido nítrico. As citocinas por sua vez, estimulam a secreção de quimiocinas pelas células endoteliais, o que aumenta o recrutamento de células imunes e, conseqüentemente ativa as células TCD8⁺. Além disso, a própria célula beta secreta quimiocinas em resposta a infecção viral ou às citocinas, potencializando o recrutamento de células imunes. Uma vez ativadas, as células TCD8⁺ induzem a apoptose da célula beta via receptor Fas e sistema granzina/perforina. Aliado a isso, as citocinas

como interleucina 1 β (IL-1 β), fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interferon γ (INF- γ) se ligam a receptores na superfície da célula beta, desencadeando vias apoptóticas (PIROT et al., 2008).

Diante da perda das células beta e da deficiência de insulina, o indivíduo com DM1 apresenta alguns sintomas clínicos como: hiperglicemia; polidipsia; poliúria; falta de energia, cansaço extremo; fome constante; perda de peso repentina e visão embaçada. Além disso, a forma como o DM1 se apresenta em crianças e em adultos diferencia-se. Por exemplo, crianças geralmente demonstram sintomas agudos de poliúria, polidipsia e cetonemia. Por outro lado, em adultos, o DM1 apresenta um começo gradual, com uma apresentação clínica similar ao DM2 (CHIANG et al., 2014).

O indivíduo diagnosticado com DM1 necessita realizar adaptações na sua rotina, como, por exemplo, uso diário de injeções de insulina, reeducação alimentar, controle da glicemia plasmática, manutenção do peso corporal, uso de medicação e prática regular de atividades físicas (CARONA et al., 2013).

Essa alteração nos hábitos de vida não envolve apenas o paciente com DM1, mas também os familiares e/ou cuidadores desse indivíduo (BARRETO et al., 2012). Sendo assim, o auxílio e a presença de uma equipe interdisciplinar facilitam, de certa forma, o entendimento da família com relação à doença e também, o esclarecimento de dúvidas e a prática das adaptações necessárias, além de estimular a maior adesão ao tratamento (MARCON et al., 2009).

Diante disso, todo paciente com DM1 precisa de cuidados específicos para a sua idade, visto que cuidar de uma criança ou bebê com DM1 difere dos cuidados com adolescentes, assim como as necessidades de jovens adultos podem variar com relação a adultos de meia idade ou idosos. De modo geral, destacam-se três pontos, independentemente da idade: i) plano de cuidado individualizado juntamente com educação e apoio; ii) avaliação de complicações agudas e crônicas; iii) acesso a médicos especializados. Portanto, como os pacientes mudam ao longo do tempo, a abordagem

terapêutica deve mudar e ser avaliada em cada visita para ser modificada quando necessário (HANNA, 2012; CHIANG et al., 2014).

Em casos de adolescentes com DM1, a manutenção da doença apresenta desafios complexos devido às mudanças que ocorrem no âmbito fisiológico, social e emocional, os quais ocorrem entre a infância e a vida adulta, incluindo a puberdade, o desejo de ser “normal”, formação da identidade e, por vezes a tentativa de testar os limites impostos pelos profissionais de saúde, pais e cuidadores (HILLIARD et al., 2013; HYNES et al., 2016). Além disso, os custos do tratamento e do equipamento de monitoramento, combinados com as necessidades diárias da criança ou adolescente com diabetes, podem representar um fardo financeiro e emocional para toda a família, assim como para o estado (FID, 2015).

Um componente importante no tratamento de todos os indivíduos com DM1 é a terapia nutricional como a contagem de carboidratos. Cada paciente deve ter um plano alimentar individualizado baseado nas preferências, na rotina e nas atividades físicas. A terapia nutricional tem como objetivo garantir que o paciente e a família entendam o impacto que a alimentação tem na manutenção da glicemia. Ademais, o exercício físico também é extremamente importante em casos de DM1 e apresenta diversos benefícios psicológicos e na saúde, incluindo aptidão física, manutenção do peso corporal e melhora na sensibilidade à insulina. Também, promove oportunidades para interação social e melhora da autoestima (CHIANG et al. 2014).

Adicionalmente, parte essencial do tratamento e da manutenção do DM1 é a administração diária de insulina. Atualmente, a insulina para tratamento é bastante variada, tanto com relação aos tipos (rápida, curta, intermediária e a longo prazo) quanto à forma de administração (injeção subcutânea, infusão contínua subcutânea, nasal) (BENKHADRA et al., 2017). No entanto, em diversos países, o acesso a medicamentos e a informações são limitados, o que pode provocar complicações severas à saúde e morte precoce do paciente (FID, 2015).

Quando não realizados o tratamento e o acompanhamento adequados da doença, o indivíduo acometido pelo DM1 pode apresentar retinopatia, nefropatia (NATHAN et al., 2005; LIND et al., 2009), alto risco de desenvolver infecções, cegueira (FID, 2015), neuropatia, convulsões e até mesmo o coma em situações mais severas (DOS SANTOS GOMIDES et al., 2013).

Pacientes com DM1 também demonstram lipólise elevada, altas concentrações de ácidos graxos livres e triglicerídeos, bem como elevada concentração de corpos cetônicos, o que, em casos mais graves, pode levar à cetoacidose diabética (KELLEY; MANDARINO, 2000). Esses indivíduos também apresentam redução do coeficiente respiratório (CR); tal redução se deve ao fato de que, com a deficiência na produção e na secreção de insulina, o indivíduo tem a incapacidade de ajustar a captação de macro nutrientes de acordo com a necessidade metabólica (RANDLE, 1986).

Outrossim, indivíduos acometidos pelo DM1 também apresentam maior risco de morte prematura quando comparados à população em geral (SECREST et al., 2010; LIVINGSTONE et al., 2012). Segundo Lind e colaboradores (2014), em um estudo comparativo entre indivíduos controle e indivíduos com DM1, dos pacientes com morte relacionada ao DM1, 14,5% foram por cetoacidose ou hipoglicemia, 9,2% complicações renais, 9% complicações vasculares, 0,1% complicações oculares e 67,2% com complicações múltiplas ou inespecíficas.

O DM1 pode ter efeitos maléficos tanto físicos quanto mentais. Segundo Martinez e colaboradores (2016), existe uma relação negativa entre sintomas de depressão e a frequência de verificação da glicemia, pois os adolescentes que apresentam mais sintomas de depressão são os que verificam a glicemia com menor frequência. Além disso, a ansiedade também pode afetar a maneira com que estes pacientes lidam com o controle glicêmico. Por exemplo, em estudo de DiBattista e colaboradores (2009), foi observado que adolescentes diabéticos do sexo masculino sofrem de ansiedade por conta do uso de insulina e aderência à dieta, enquanto que, no sexo feminino, a ansiedade resulta da relação com o meio social e à adesão ao uso de insulina.

Com base nas informações discutidas até o momento, assevera-se que o DM1 vem crescendo mundialmente, e, por se tratar de uma doença que acomete majoritariamente crianças e adolescentes, é de difícil tratamento e manutenção, pois os pacientes dependem quase que totalmente dos familiares e/ou cuidadores. Além disso, a administração de insulina exógena é o principal tratamento, contudo, apresenta efeitos secundários como hipoglicemia e dificuldade de adesão (DEWITT; HIRSCH, 2003; BERGENSTAL et al., 2010). Desse modo, a procura por moléculas endógenas com efeito benéfico sobre o controle glicêmico e que não apresentem efeitos secundários indesejados para pacientes com DM1, é de extrema importância. Nesse sentido, os ABs demonstram ser potenciais candidatos como agentes terapêuticos.

3. Ácidos Biliares (ABs)

Os ABs são compostos sintetizados no fígado pelos hepatócitos, a partir do colesterol. Os ABs produzidos nos hepatócitos são considerados primários, como o ácido cólico (CA) e o ácido quenodesoxicólico (CDCA) em humanos, e o ácido β muricólico (BMCA) e o CA em camundongos (HOFMANN; HAGEY, 2008; CHIANG, 2009; 2013). Os ABs formados a partir da modificação dos primários por conta de ação bacteriana no trato intestinal são considerados secundários. Os mais comuns tanto em humanos quanto em camundongos, são o ácido litocólico (LCA) proveniente do CDCA ou do BMCA e o ácido deoxicólico (DCA) proveniente do CA (HOFMANN; HAGEY, 2008).

O fígado humano sintetiza cerca de 200 a 600 mg de ABs por dia. A conversão do colesterol em ABs envolve cerca de 17 enzimas localizadas no citosol, RE, mitocôndria e peroxissomos. Existem duas vias de biossíntese dos ABs (CHIANG, 1998), uma delas é a via clássica, a qual é responsável pela síntese de mais de 90% do total de ABs em humanos e é iniciada pela enzima CYP7A1, culminando na produção dos ABs primários, CA e CDCA. Adicionalmente, para a síntese de CA, é necessária à ação da enzima CYP8B1; sem ela o produto final é o CDCA. Outra via responsável pela

produção de ABs primários é a via alternativa, a qual é iniciada pela enzima CYP27A1 (DUANE; JAVITT, 1999) e é responsável pela produção de menos de 10% do conteúdo total de ABs em humanos. Por outro lado, em roedores, ambas as vias contribuem de forma semelhante para a síntese desses compostos (LI; CHIANG, 2014) (Fig. 1).

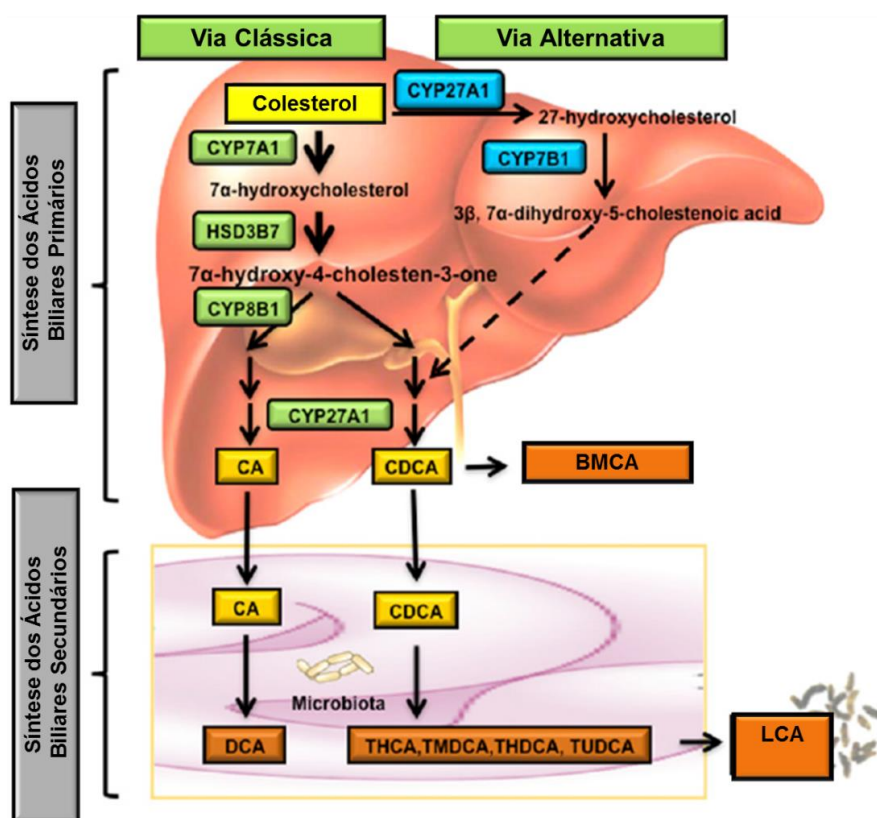


Figura 1. **Síntese dos ácidos biliares.** Duas vias de síntese de ácidos biliares estão ilustradas. A via clássica é iniciada pela enzima CYP7A1, dando origem ao CDCA. Quando há presença da enzima CYP8B1, resulta na formação do CA. A via alternativa é iniciada pela enzima CYP27A1, dando origem ao CDCA. No intestino grosso, por ação da microbiota, o CA e o CDCA são convertidos em DCA e LCA, respectivamente. No fígado de camundongos, a maior parte do CDCA é convertido em BMCA. No intestino, a CYP3A1 e epimerase também converte o CDCA em ácidos biliares secundários como THCA, THDCA e TUDCA. Uma grande quantidade de LCA é excretado nas fezes. Adaptado de: LI; CHIANG, 2014.

Depois de sintetizados, os ABs são conjugados. Em humanos, a maioria deles é conjugado com glicina ou taurina (proporção de 3:1), enquanto que, em roedores, a maior parte desses compostos (>95%) são conjugados com taurina. Essa conjugação ocorre por ação das enzimas BAC (Bile acid:CoA synthase) e BAAT (Bile acid:amino acid transferase). A conjugação proporciona o aumento da solubilidade dos ABs no pH fisiológico e reduz a sua toxicidade. Além disso, esse processo de conjugação resulta em uma molécula

com carga negativa e impermeável à membrana celular dos colangiócitos, enterócitos e junções paracelulares, minimizando a sua absorção passiva (HOFMANN; HAGEY, 2008; CHIANG, 2013).

Após a síntese e conjugação, os ABs são secretados no espaço canalicular entre os hepatócitos, fluem distalmente pelos ductos até chegar à vesícula biliar. Em humanos, durante o jejum, metade de todos os ABs secretados se encontram na vesícula biliar, e o restante entra no intestino delgado (HOFMANN, 2009). No intestino, por ação da microbiota intestinal, esses compostos são desconjugados e sofrem alterações conformacionais dando origem a ABs secundários, como o LCA e o DCA (Fig. 1) (LI; CHIANG, 2014). Além disso, nos enterócitos, os ABs são absorvidos tanto ativa quanto passivamente por meio do ASBT (apical sodium-dependent bile acid transporter), que é um transportador apical do enterócito, e seguem para o sangue portal por intermédio de um transportador basolateral, o OST α/β (organic solute transporter α/β) (NAKAHARA et al., 2005) (Fig. 2).

Em seguida, os ABs retornam ao fígado e são captados pelos hepatócitos pelo NTCP (Na⁺-taurocholate cotransport peptide), um cotransportador basolateral dependente de sódio homólogo ao ASBT. Uma vez dentro dos hepatócitos, os ABs são secretados novamente na bile pelo cotransportador BSEP (bile salt export pump) (Fig. 2). Com o tempo, a maioria desses ácidos circulantes é armazenada na vesícula biliar. No desjejum, os ácidos graxos da dieta estimulam a colecistocinina que, conseqüentemente, incentivam a contração da vesícula biliar, que se esvazia gradualmente, secretando os ABs no lúmen do intestino delgado. Esses compostos são reabsorvidos e retornam ao fígado para mais uma vez serem secretados na bile. Esse movimento dos ABs entre o fígado e o intestino delgado é chamado de circulação entero-hepática, e a massa circulante dessas moléculas é chamada de *pool* de ABs (HOFMANN, 2009). Em animais que não possuem vesícula biliar ou indivíduos que retiraram a vesícula, a circulação entero-hepática também acontece; no entanto, o *pool* de ABs fica contido no intestino delgado durante o jejum (HOFMANN; HAGEY, 2008).

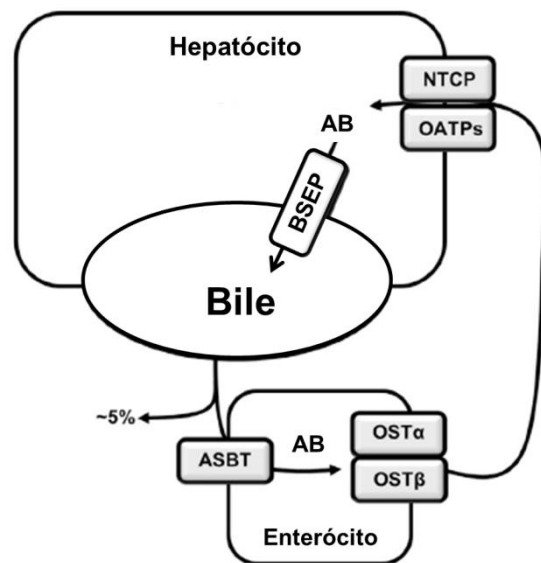


Figura 2. **Transporte dos ácidos biliares e a circulação entero-hepática.** Na circulação entero-hepática, os ácidos biliares são secretados dos hepatócitos para o espaço canalicular e seguem para a vesícula biliar, onde são armazenados. A ingestão alimentar estimula a vesícula biliar a liberar a bile no intestino delgado, onde ~95% dos ácidos biliares pode ser reabsorvido no íleo e secretados novamente na circulação portal. Aproximadamente 5% do total de ácidos biliares são perdidos nas fezes. Os ácidos biliares são captados pelos hepatócitos na membrana basolateral e ressecretados na bile, e a captação e a secreção desses compostos é mediada por transportadores. O cotransportador BSEP é o transportador responsável pelo efluxo dos ácidos biliares nos hepatócitos. No intestino delgado, os ácidos biliares são absorvidos pelos enterócitos através do cotransportador apical ASBT e são secretados na circulação portal pelo transportador basolateral heterodímero OST α/β . Por fim, o cotransportador NTCP é o principal transportador para captação de ácidos biliares pelos hepatócitos. Adaptado de: LI; LI, 2017.

Apesar de serem moléculas anfipáticas, os ABs podem ser classificados como hidrofílicos e hidrofóbicos (RODA et al., 1983). No intestino delgado, esses compostos agem como detergentes químicos, pois solubilizam ácidos graxos, monoglicerídeos e vitaminas lipossolúveis (HOFMANN; MYSELS, 1987). Adicionalmente, os ABs conjugados têm efeitos antimicrobianos no lúmen, dado que estimulam o enterócito ileal a secretar agentes antimicrobianos (HOFMANN; ECKMANN, 2006), Também, estimulam os enterócitos a secretar um hormônio peptídico, o FGF19 (fibroblast growth factor 19), em humanos, e o FGF15, (fibroblast growth factor 15) em roedores (HOFMANN; HAGEY, 2008).

Além de atuar na digestão, os ABs funcionam como sinalizadores endócrinos que regulam o metabolismo glicêmico, lipídico e energético, mediante à ativação de receptores nucleares, como o FXR (farnesoid X

receptor), e receptores de membrana, como o TGR5 (Takeda G receptor) e o S1PR2 (Sphingosin 1 phosphate receptor 2) (CHIANG, 2013). O AB hidrofóbico CDCA é o ligante mais eficaz na ativação do FXR, seguido do LCA, DCA e CA, enquanto os hidrofílicos, como UDCA e BMCA, não ativam esse receptor (XIE et al., 2001; SONODA et al., 2002; UPPAL et al., 2005). O FXR induz a ativação do SHP (small heterodimer partner) e, conseqüentemente, inibe a transcrição dos genes das enzimas CYP7A1 e CYP8B1 (GOODWIN et al., 2000; LU et al., 2000). Esse receptor também ativa o BSEP nos hepatócitos (CHIANG, 2013), assim como induz a transcrição do gene OST α/β nos enterócitos e inibe o NTCP nos hepatócitos (FRANKENBERG et al., 2006). Dessa forma, o FXR tem papel importante na circulação entero-hepática através da regulação da síntese, secreção biliar, reabsorção e secreção no intestino, além da captação dos ABs pelos hepatócitos (JANSEN; STURM, 2003; ZOLLNER et al., 2006).

Para além disso, no fígado, a ativação do FXR via ABS é capaz de contribuir com a redução da concentração de glicose plasmática pós-prandial por meio da redução da gliconeogênese hepática associada à indução da síntese hepática de glicogênio (SHAPIRO et al., 2018). Dessa forma, a ativação do FXR no fígado estimula o armazenamento de glicogênio e inibição da expressão de genes glicolíticos e lipolíticos, como a proteína de ligação ao elemento responsivo aos carboidratos (ChREBP) e proteína de ligação ao elemento regulado por esterol 1c (SREBP1c) (WATANABE et al., 2004; DURAN-SANDOVAL et al., 2005). A ativação desse receptor também resulta na inibição de enzimas envolvidas na gliconeogênese hepática, como a PEPCK e a G6Pase (POTTJOF et al. 2011, SHAPIRO et al., 2018). O FXR é encontrado nos enterócitos ileais e a sua ativação resulta na inibição da secreção do peptídeo semelhante a glucagon 1 (GLP-1), e nas células beta pancreáticas, a ativação desse receptor estimula a secreção de insulina (SHAPIRO et al., 2018).

Um receptor transmembrana ativado pelos ABs é o TGR5, expresso em diversos tecidos incluindo a vesícula biliar, o baço, o fígado, o intestino, o rim, o músculo esquelético, o pâncreas, os adipócitos e os

macrófagos. Todavia, não é expresso nos hepatócitos, mas foi detectado nas células de Kupffer, nas células do endotélio sinudoidal do fígado e nas células epiteliais da vesícula biliar (GRUY-KAPRAL et al., 1999; KAPRAL et al., 2004). Esse receptor tem maior afinidade por ABs hidrofílicos, e a sua ativação estimula o aumento da concentração de cAMP, que ativa proteína quinase A (PKA) e a expressão de genes alvo. Tanto no tecido adiposo marrom quanto no músculo esquelético, a sinalização do TGR5 estimula a conversão do ATP em cAMP, o que ativa a iodotironina desiodase 2 (DIO2), a qual converte a tiroxina T4 em T3, um hormônio biologicamente ativo, conhecido por estimular o consumo de oxigênio pela mitocôndria e o metabolismo energético (WATANABE et al., 2006).

No fígado e no intestino, essa sinalização do TGR5/cAMP tem função anti-inflamatória (WANG et al., 2011), protege a integridade da barreira intestinal e previne a colite (CIPRIANI et al., 2011). A via de sinalização do TGR5 ativada pelos ABs também pode ter papel importante na proteção contra doenças inflamatórias, incluindo esteatose hepática, doença intestinal inflamatória, aterosclerose e diabetes. Além disso, tem-se demonstrado que os ABs e o TGR5 estimulam a secreção do GLP-1 pelas células tipo L (HOFMANN; HAGEY, 2008), bem como o reabastecimento da vesícula biliar (STAELS; KUIPERS, 2007). Esse receptor também é encontrado no pâncreas e a sua ativação estimula a secreção de insulina pelas células beta pancreáticas, enquanto que, nas células alfa, a ativação do TGR5 via ABs proporciona alteração do fenótipo secretor da célula, de glucagon para GLP-1. Dessa forma, resulta em um efeito parácrino na célula beta vizinha para estimular a secreção de insulina, além de melhorar a viabilidade e proliferação celular. Adicionalmente, o TGR5 é expresso em células do sistema imune e a sua ativação nesse tipo celular resulta na inibição de vias inflamatórias e, conseqüentemente, na redução na produção de citocinas pró-inflamatórias (SHAPIRO et al., 2018).

Outro receptor transmembrana ativado pelos ácidos biliares é o S1PR2, que é expresso nos hepatócitos. ABs conjugados, como TCA, TDCA, TUDCA, GCA e GDCA, são capazes de ativar esse receptor e, dessa forma,

ativar a cascata de sinalização da ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase) e Akt (DENT et al., 2005). A ativação do S1PR2 pelos ABs ativa o receptor de insulina e, conseqüentemente, a via da Akt. Sugere-se que a via S1PR2/ERK1/2/AKT pode fosforilar e estabilizar o SHP (MIAO et al., 2009), que, por sua vez, inibe a transcrição do gene da enzima CYP7A1 (SONG et al., 2009).

Ademais, a ativação da via da Akt estimula a glicogênio sintase (GS), uma enzima chave na glicogênese. A Akt também fosforila e inativa o fator de transcrição FoxO1, o que resulta na inibição da PEPCK e G6Pase as quais participam da gliconeogênese. A ativação do S1PR2 também pode ativar a via FXR/SHP que inibe a oxidação de ácidos graxos via receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR) α/γ /PGC-1 e a síntese de ácidos graxos pela SREBP-1c. Dessa forma, o S1PR2 pode reduzir as concentrações de glicose e triglicérides séricas, e melhorar a sensibilidade à insulina, estimulando a glicogênese e inibindo a gliconeogênese e lipogênese (CHIANG, 2013).

Nesse sentido, a ativação da via da insulina induzida por ABs conjugados, principalmente com a taurina, pode ser importante para a manutenção da taxa de proliferação das células beta pancreáticas e também para a redução da secreção de glucagon pelas células alfa, uma vez que pacientes diabéticos apresentam hiperglucagonemia, o que torna interessante o uso dessas moléculas na terapêutica do DM1.

4. Ácido Tauroursodesoxicólico (TUDCA)

O TUDCA é sintetizado nos hepatócitos a partir da conjugação do AB UDCA com a taurina. O UDCA e seus conjugados compreendem cerca de 47% da bile do urso-negro americano e cerca de 76% no urso-negro asiático (HAGEY et al., 1993). Já em humanos, esse composto representa apenas 0,13% do *pool* de ABS (BENTAYEB et al., 2008).

A bile de ursos tem sido amplamente utilizada pela medicina chinesa ao longo dos anos como tratamento de doenças que envolvem febre e inflamação, desintoxicação do fígado, prevenção de convulsões e crises epiléticas, dissolução de cálculos renais e biliares, além de redução de tumores (FENG et al., 2009).

No entanto, tanto o UDCA quanto o TUDCA passaram a ser amplamente utilizados em meados dos anos 1950, no Japão, quando começaram a ser fabricados a partir do CA (KANAZAWA et al., 1954). Atualmente, esses dois compostos são comercializados em vários países para o tratamento de doenças hepáticas, principalmente a cirrose biliar primária, e para a dissolução de cálculos biliares, devido à sua capacidade de solubilizar o colesterol e reduzir a sua saturação na bile (WARD et al., 1984; SALEN et al., 1991; CROSIGNANI et al., 1996).

O TUDCA também apresenta mecanismos antiapoptóticos em diferentes tipos celulares. Esse AB inibe a apoptose induzida pelo RE em linhagem de células hepáticas humanas, através da redução do efluxo de cálcio pelo RE, bloqueio da ativação da caspase 12 e estabilização da membrana mitocondrial (XIE et al., 2002; SCHOEMAKER et al., 2004). Outra forma de inibição da morte celular nos hepatócitos pela ação do TUDCA é por meio da ativação de vias de sobrevivência, como a p38/ERK/MAPK e pela cascata de sinalização da PI3K (PONGRACZ et al., 1995; SOLÁ et al., 2003; SCHOEMAKER et al., 2004).

Já foi observado, também, que no pâncreas o TUDCA potencializa a secreção de insulina estimulada por glicose por meio da via cAMP/PKA, em ilhotas pancreáticas isoladas (VETTORAZZI et al., 2016). No fígado, o TUDCA ativa o receptor transmembrana S1PR2 acionando a via da insulina, mediante ativação da via PI3K/Akt (STUDER et al., 2012), bem como modula a expressão da IDE resultando no aumento do *clearance* de insulina, em modelo animal hiperinsulinêmico e resistente à insulina (VETTORAZZI et al., 2017).

O TUDCA também atua como uma chaperona química, melhorando o enovelamento de proteínas e assim, reduzindo o estresse de RE em células musculares, cardíacas, pancreáticas, hepáticas entre outras (OZCAN et al., 2009; LEE et al., 2010). Chaperonas químicas são pequenas moléculas que estabilizam proteínas dobradas erroneamente e facilitam que se dobrem de forma adequada (PAPP; CSERMELY, 2006).

Nesse sentido, esse AB melhora o dobramento proteico e protege a célula contra o estresse no RE (KARS et al., 2010). Estudos demonstram que o TUDCA tem efeito protetor tanto nos hepatócitos quanto nas ilhotas pancreáticas, restaurando a homeostase glicêmica por intermédio da redução do estresse no RE, desenvolvendo papel importante na patogênese da obesidade, resistência à insulina e diabetes (XIE et al., 2002; OZCAN et al., 2006).

Engin e colaboradores (2013) demonstraram que a administração de TUDCA no estágio pré-diabético em modelo animal resultou na redução da incidência de DM1. Esse resultado foi acompanhado da redução de infiltração linfocítica no pâncreas, melhora na sobrevivência e morfologia das células beta, redução de apoptose dessas células, preservação da secreção de insulina, bem como a restauração da expressão de mediadores de UPR (unfolded protein response). A UPR, por sua vez, aumenta a disponibilidade de chaperonas, além de aumentar a degradação de proteínas enoveladas de forma incorreta, no sentido de restaurar a homeostase do RE. Entretanto, a possibilidade do TUDCA exercer papel benéfico após confirmado o estado de DM1 ainda não foi explorado.

Além do exposto, evidências obtidas a partir de estudos piloto do nosso grupo, com camundongos com DM1 severo induzido por estreptozotocina, demonstram redução na glicemia e aumento da sobrevivência quando tratados com TUDCA. No entanto, os mecanismos envolvidos na normalização da glicemia em animais com DM1 e tratados com esse AB ainda não foram elucidados.

5. Modelo Experimental: Estreptozotocina

A fim de estudar compostos com potencial terapêutico para o DM1, são utilizados modelos animais experimentais com indução do diabetes por meio da administração de drogas ou compostos químicos que destroem as células beta pancreáticas. Nesse contexto, as substâncias mais utilizadas são aloxana e estreptozotocina (STZ) (SZKUDELSKI, 2001).

A STZ foi isolada a partir do *Streptomyces achromogenes* em 1960; não obstante, sua propriedade diabetogênica só foi descrita em 1963 (RAKIETEN et al., 1963; SZKUDELSKI, 2001). A STZ tem a capacidade de destruir as células beta das ilhotas pancreáticas, dessa forma, os animais expostos a essa droga apresentam deficiência de insulina, hiperglicemia, polidipsia e poliúria, sendo todas essas condições características do DM1 em humanos (KOLB, 1987). Além disso, a STZ também é utilizada na clínica como um agente quimioterápico no tratamento de carcinoma pancreático (AKBARZADEH et al., 2007; LENZEN, 2008).

Devido à sua similaridade estrutural com a glicose, a STZ entra nas células beta por meio do transportador de glicose GLUT2 (DUFRANE et al., 2006). A ação intracelular da STZ resulta em alterações no DNA incluindo a sua fragmentação (YAMAMOTO et al., 1981; MORGAN et al., 1994). Contudo, o principal mecanismo pelo qual a STZ induz a morte das células beta é pela alquilação do DNA (DELANEY et al., 1995; ELSNER et al., 2000).

Outra característica da STZ é a formação de espécies reativas de oxigênio, o que também contribui com a fragmentação do DNA e evoca diversas alterações deletérias nas células (TAKASU et al., 1991; BEDOYA et al., 1996). A STZ também forma ânions superóxido na mitocôndria, aumenta a atividade da xantina oxidase, inibe o ciclo de Krebs (TURK et al., 1993) e diminui o consumo de oxigênio pela mitocôndria (NUKATSUKA et al., 1990). Esses efeitos limitam a produção mitocondrial de ATP e causam depleção do nucleotídeo das células beta (SOFUE et al., 1991).

A ação da STZ nas células beta é acompanhada de alterações características na concentração de insulina e glicose no sangue. Duas horas

após a aplicação, a hiperglicemia é observada, assim como a queda da insulina plasmática. Após seis horas, ocorre hipoglicemia acompanhada do aumento da concentração de insulina. Finalmente, a concentração de insulina plasmática diminui e o estado hiperglicêmico é estabelecido (WEST et al., 1996). Essas alterações na concentração de insulina e glicose refletem anormalidades na função da célula beta, pois a STZ prejudica a oxidação de glicose (BEDOYA et al., 1996), além de reduzir a biossíntese e secreção de insulina (NUKATSUKA et al., 1990).

A princípio, em modelos animais experimentais, a STZ era administrada em dose única de alta concentração, que, em 48h, causava completa necrose das células beta e diabetes (KOLB, 1987), devido à sua propriedade de alquilação (DUFRANE et al., 2006). No entanto, após a administração de múltiplas doses baixas de STZ, é possível observar um atraso no surgimento do estado de hiperglicemia (LIKE; ROSSINI, 1976), pois a administração de múltiplas doses baixas danifica parcialmente as ilhotas pancreáticas, ativando reações imunes e inflamatórias, relacionadas com a liberação de autoantígeno ácido glutâmico descarboxilase (PAIK et al., 1980), o que gradualmente leva à perda da atividade da célula beta, que, por fim, resulta na deficiência de insulina e hiperglicemia. Essa resposta é a que mais se assemelha à patogênese e às alterações morfológicas do DM1 em humanos (LIKE; ROSSINI, 1976; KOLB, 1987; KOLB-BACHOFEN et al. 1988, WEIDE; LACY, 1991).

Sendo assim, o protocolo de administração de múltiplas doses baixas de STZ tem se tornado o mais utilizado em modelo animal, devido ao fato de que a patologia causada por esse modelo se assemelha ao DM1 em humanos com inflamação crônica nas ilhotas pancreáticas e deficiência de insulina (FURMAN, 2015). Portanto, esse modelo foi elegido neste estudo para indução do DM1 em camundongos.

REFERÊNCIAS

AKBARZADEH, A., NOROUZIAN, D., MEHRABI, M. R., JAMSHIDI, S. H., FARHANGI, A., VERDI, A. A., RAD, B. L. Induction of diabetes by streptozotocin in rats. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 22, n. 2, p. 60-64, 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23105684>>.

AVRUCH, J. Insulin signal transduction through protein kinase cascades. **Insulin Action**, p. 31-48, 1998. Disponível em: <https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4615-5647-3_4>.

BANTING, F. G., BEST, C. H. Pancreatic extracts. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 115, n. 2, p. 254-72, 1990. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2405086>>.

BARRETO, M. D. S., SILVA, A. M. D., NORTEAN, E. D. C. M., MARCON, S. S. Conviver com diabetes mellitus sob a ótica de adolescentes e jovens e suas mães. **Revista de Pesquisa Cuidado é Fundamental Online**, v. 4, n. 4, p. 3080-3093, 2012. Disponível em: <<http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IscScript=iah/iah.xis&src=google&base=BDENF&lang=p&nextAction=Ink&exprSearch=23722&indexSearch=ID>>.

BEDOYA, F. J.; SOLANO, F.; LUCAS, M. N-monomethyl-arginine and nicotinamide prevent streptozotocin-induced double strand DNA break formation in pancreatic rat islets. **Experientia**, v. 52, n. 4, p. 344-347, 1996. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/BF01919538>>.

BENKHADRA, K., ALAHDAB, F., TAMHANE, S. U., MCCOY, R. G., PROKOP, L. J., MURAD, M. H. Continuous subcutaneous insulin infusion versus multiple daily injections in individuals with type 1 diabetes: a systematic review and meta-analysis. **Endocrine**, v. 55, p. 77-84, 2017. Disponível: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s12020-016-1039-x>>.

BENTAYEB, K., BATLLE, R., SANCHEZ, C., NERIN, C., DOMENO, C. Determination of bile acids in human serum by on-line restricted access material-ultra high-performance liquid chromatography-mass

spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 869, n. 1-2, p. 1-8, 2008. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570023208003255>>.

BERGENSTAL, R. M., TAMBORLANE, W. V., AHMANN, A., BUSE, J. B., DAILEY, G., DAVIS, S. N., WILLI, S. M. Effectiveness of sensor-augmented insulin-pump therapy in type 1 diabetes. **New England Journal of Medicine**, v. 363, n. 4, p. 311-320, 2010. Disponível em:< <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/Nejmoa1002853>>.

BRANDIMARTI, P., COSTA-JÚNIOR, J. M., FERREIRA, S. M., PROTZEK, A. O., SANTOS, G. J., CARNEIRO, E. M., REZENDE, L. F. Cafeteria diet inhibits insulin clearance by reduced insulin-degrading enzyme expression and mRNA splicing. **Journal of Endocrinology**, v. 219, n. 2, p. 173-182, 2013. Disponível em: < <http://joe.endocrinology-journals.org/content/219/2/173.short>>.

CABRERA, O., BERMAN, D. M., KENYON, N. S., RICORDI, C., BERGGREN, P. O., CAICEDO, A. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 7, p. 2334-2339, 2006. Disponível em: < <http://www.pnas.org/content/103/7/2334.short>>.

CAPELLA, C., HAGE, E., SOLCIA, E., USELLINI, L. Ultrastructural similarity of endocrine-like cells of the human lung and some related cells of the gut. **Cell and tissue research**, v. 186, n. 1, p. 25-37, 1978. Disponível em: < <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00219652>>.

CARONA, C., PEREIRA, M., MOREIRA, H., SILVA, N., CANAVARRO, M. C. The disability paradox revisited: Quality of life and family caregiving in pediatric cerebral palsy. **Journal of Child and Family Studies**, v. 22, n. 7, p. 971-986, 2013. Disponível em: < <https://link.springer.com/article/10.1007/s10826-012-9659-0> >.

CASTILLO, M. J., SCHEEN, A. J., LETIEXHE, M. R., LEFÈBVRE, P. J. How to measure insulin clearance. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 10, n. 2, p. 119-150, 1994. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/dmr.5610100205/full>>.

CHIANG, J. L., KIRKMAN, M. S., LAFFEL, L. M., PETERS, A. L. Type 1 diabetes through the life span: a position statement of the American Diabetes Association. **Diabetes care**, v. 37, n. 7, p. 2034-2054, 2014. Disponível em: <<http://care.diabetesjournals.org/user/logout?current=node/438>>.

CHIANG, J. Y. Regulation of bile acid synthesis. **Frontiers in Bioscience**, v. 3, p. d176-93, 1998. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9450986>>.

CHIANG, Y. L. Bile acids: regulation of synthesis. **Journal of Lipid Research**, v. 50, n. 10, p. 1955-1966, 2009. Disponível em: <<http://www.jlr.org/content/50/10/1955.short>>.

CHIANG, Y. L. Bile acid metabolism and signaling. **Comprehensive Physiology**, v. 3, n. 3, p. 1991-212, 2013. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cphy.c120023/full>>.

CIPRIANI, S., MENCARELLI, A., CHINI, M. G., DISTRUTTI, E., RENGA, B., BIFULCO, G., FIORUCCI, S. The bile acid receptor GPBAR-1 (TGR5) modulates integrity of intestinal barrier and immune response to experimental colitis. **PloS one**, v. 6, n. 10, p. e25637, 2011. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0025637>>.

CNOP, M., WELSH, N., JONAS, J. C., JÖRNS, A., LENZEN, S., EIZIRIK, D. L. Mechanisms of pancreatic β -cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. **Diabetes**, v. 54 Suppl 2, p. S97-S107, 2005. Disponível em: <http://diabetes.diabetesjournals.org/content/54/suppl_2/S97.short>.

CROSIGNANI, A., BATTEZZATI, P. M., SETCHELL, K. D., INVERNIZZI, P., COVINI, G., ZUIN, M., PODDA, M. Tauroursodeoxycholic acid for treatment of biliary cirrhosis. A dose-response study. **Digestive Diseases and Science**, v. 41, n. 4, p. 809-15, 1996. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8674405>>.

DE FERRANTI, S. D., DE BOER, I. H., FONSECA, V., FOX, C. S., GOLDEN, S. H., LAVIE, C. J., ZINMAN, B. Type 1 diabetes mellitus and cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association and

American Diabetes Association. **Circulation**, v. 130, n. 13, p. 1110-1130, 2014. Disponível em: < <http://circ.ahajournals.org/content/130/13/1110.short>>.

DELANEY, C. A., DUNGER, A., DI MATTEO, M., CUNNINGHAM, J. M., GREEN, M. H., GREEN, I. C. Comparison of inhibition of glucose-stimulated insulin secretion in rat islets of Langerhans by streptozotocin and methyl and ethyl nitrosoureas and methanesulphonates: lack of correlation with nitric oxide-releasing or O6-alkylating ability. **Biochemical Pharmacology**, v. 50, n. 12, v. 2015-2020, 1995. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0006295295021027>>.

DENT, P., FANG, Y., GUPTA, S., STUDER, E., MITCHELL, C., SPIEGEL, S., HYLEMON, P. B. Conjugated bile acids promote ERK1/2 and AKT activation via a pertussis toxin-sensitive mechanism in murine and human hepatocytes. **Hepatology**, v. 42, n. 6, p. 1291-1299, 2005. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.20942/full>>.

DEWITT, D. E., HIRSCH, I. B. Outpatient insulin therapy in type 1 and type 2 diabetes mellitus: scientific review. **The Journal of the American Medical Association**, v. 289, n. 17, p. 2254-2264, 2003. Disponível em: < <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/196498>>.

DI BATTISTA, A. M., HART, T. A., GRECO, L., GLOIZER, J. Type 1 diabetes among adolescents. **The Diabetes Educator**, v. 35, n.3, p. 465-475, 2009. Disponível em: < <http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/0145721709333492>>.

DOS SANTOS GOMIDES, D., VILLAS-BOAS, L. C. G., COELHO, A. C. M., PACE, A. E. Autocuidado das pessoas com diabetes mellitus que possuem complicações em membros inferiores. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 26, n. 3, p. 289-93, 2013. Disponível em: < <http://www2.unifesp.br/acta/pdf/v26/n3/v26n3a14.pdf> >.

DUANE, W. C., JAVITT, N. B. 27-hydroxycholesterol: production rates in normal human subjects. **Journal of Lipid Research**, v. 40, n. 7, p. 1194-1199, 1999. Disponível em: < <http://www.jlr.org/content/40/7/1194.short>>.

DUCKWORTH, W. C., BENNET, R. G., HAMEL, F. G. Insulin degradation: progress and -potential. **Endocrine Reviews**, v. 19, n. 5, p. 608-24, 1998. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9793760>>.

DUFRANE, D., VAN STEENBERGHE, M., GUIOT, Y., GOEBBELS, R. M., SALIEZ, A., GIANELLO, P. Streptozotocin-induced diabetes in large animals (pigs/primates): role of GLUT2 transporter and β -cell plasticity. **Transplantation**, v. 81, n. 1, p. 36-45, 2006. Disponível em: <https://journals.lww.com/transplantjournal/Abstract/2006/01150/Streptozotocin_Induced_Diabetes_in_Large_Animals.8.aspx>.

DURAN-SANDOVAL, D., CARIOU, B., PERCEVAULT, F., HENNUYER, N., GREFFHORST, A., VAN DIJK, T. H., STAELS, B. The farnesoid X receptor modulates hepatic carbohydrate metabolism during the fasting-refeeding transition. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 33, p. 29971-29979, 2005. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/280/33/29971.short>>.

ELSNER, M., GULDBAKKE, B., TIEDGE, M., MUNDAY, R., LENZEN, S. Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. **Diabetologia**, v. 43, n. 12, p. 1528-1533, 2000. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s001250051564>>.

ENGIN, F., YERMALOVICH, A., NGUYEN, T., HUMMASTI, S., FU, W., EIZIRIK, D. L., HOTAMISLIGIL, G. S. Restoration of the unfolded protein response in pancreatic β cells protects mice against type 1 diabetes. **Science Translational Medicine**, v. 5, n. 211, p. 211ra156-211ra156, 2013. Disponível em: <<http://stm.sciencemag.org/content/5/211/211ra156.short>>.

ERDMANN, J., MAYR, M., OPPEL, U., SYPCHENKO, O., WAGENPFEIL, S., SCHUSDZIARRA, V. Weight-dependent differential contribution of insulin secretion and clearance to hyperinsulinemia of obesity. **Regulatory peptides**, v. 152, n. 1-3, p. 1-7, 2009. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167011508001742>>.

FANTIN, V. R., WANG, Q., LIENHARD, G. E., KELLER, S. R. Mice lacking insulin receptor substrate 4 exhibit mild defects in growth, reproduction, and glucose homeostasis. **American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism**, v. 278, n. 1, p. E127-E133, 2000. Disponível em: <<http://www.physiology.org/doi/abs/10.1152/ajpendo.2000.278.1.e127>>.

FENG, Y., SIU, K., WANG, N., NG, K. M., TSAO, S. W., NAGAMATSU, T., TONG, Y. Bear bile: dilemma of traditional medicinal use and animal protection. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 5, n. 1, p. 2, 2009. Disponível em: < <https://ethnobiomed.biomedcentral.com/articles/10.1186/1746-4269-5-2>>.

FID, ATLAS. International Diabetes Federation, 2013. **ISBN 2930229853**, p. 7, 2015. Disponível em: < <https://www.idf.org/e-library/epidemiology-research/diabetes-atlas.html>>.

FRANKENBERG, T., RAO, A., CHEN, F., HAYWOOD, J., SHNEIDER, B. L., DAWSON, P. A. Regulation of the mouse organic solute transporter α - β , Osta- α -Ost β , by bile acids. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 290, n. 5, p.G912-G922, 2006. Disponível em: < <https://www.physiology.org/doi/abs/10.1152/ajpgi.00479.2005>>.

FURMAN, B. L. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. **Current Protocols in Pharmacology**, v. 70, p. 5.47, 2015. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471141755.ph0547s70/full>>.

GOODWIN, B., JONES, S. A., PRICE, R. R., WATSON, M. A., MCKEE, D. D., MOORE, L. B., MALONEY, P. R. A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LXR-1 represses bile acid biosynthesis. **Molecular Cell**, v. 6, n. 3, p. 517-526, 2000. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1097276500000514>>.

GRUY-KAPRAL, C., LITTLE, K. H., FORDTRAN, J. S., MEZIERE, T. L., HAGEY, L. R., HOFMANN, A. F. Conjugated bile acid replacement therapy for short-bowel syndrome. **Gastroenterology**, v. 116, n. 1, p. 15-21, 1999. Disponível em: < [http://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085\(99\)70223-4/abstract](http://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085(99)70223-4/abstract)>.

GUO, S. Insulin signaling, resistance, and metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms. **Journal of Endocrinology**, v. 220, n. 2, p. T1-T23, 2014. Disponível em: < <http://joe.endocrinology-journals.org/content/220/2/T1.short>>.

HAGEY, L. R., CROMBIE, D. L., ESPINOSA, E., CAREY, M. C., IGIMI, H., HOFMANN, A. F. Ursodeoxycholic acid in the Ursidae: biliary bile acids of

bears, pandas, and related carnivores. **Journal of Lipid Research**, v. 34, n. 11, p. 1911-1917, 1993. Disponível em: < <http://www.jlr.org/content/34/11/1911.short>>.

HANNA, K. M. A framework for the youth with type 1 diabetes during the emerging adulthood transition. **Nursing Outlook**, v. 60, n. 6, p. 401-410, 2012. Disponível em: < [http://www.nursingplus.com/article/S0029-6554\(11\)00353-8/abstract](http://www.nursingplus.com/article/S0029-6554(11)00353-8/abstract)>.

HILLIARD, M. E., WU, Y. P., RAUSCH, J., DOLAN, L. M., HOOD, K. K. Predictors of deteriorations in diabetes management and control in adolescents with type 1 diabetes. **Journal of Adolescent Health**, v. 52, n. 1, p. 28-34, 2013. Disponível em: < [http://www.jahonline.org/article/S1054-139X\(12\)00210-8/abstract](http://www.jahonline.org/article/S1054-139X(12)00210-8/abstract)>.

HOFMANN, A. F. The enterohepatic circulation of bile acids in mammals: form and functions. **Frontiers in Bioscience**, v. 14, p. 2584-2598, 2009. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19273221>>.

HOFMANN, A. F.; ECKMANN, L. How bile acids confer gut mucosal protection against bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 12, p. 4333-4334, 2006. Disponível em: < <http://www.pnas.org/content/103/12/4333.short>>.

HOFMANN, A. F.; HAGEY, L. R. Bile acids: chemistry, pathochemistry, biology, pathobiology, and therapeutics. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 16, p. 2461-2483, 2008. Disponível em: < <https://link.springer.com/article/10.1007/s00018-008-7568-6>>.

HOFMANN, A. F., MYSELS, K.I J. Bile salts as biological surfactants. **Colloids and Surfaces**, v. 30, n. 1, p. 145-173, 1987. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/016666228780207X>>.

HYNES, L., BYRNE, M., DINNEEN, S. F., MCGUIRE, B. E., O'DONNELL, M., MC SHARRY, J. Barriers and facilitators associated with attendance at hospital diabetes clinics among young adults (15–30 years) with type 1 diabetes mellitus: a systematic review. **Pediatric Diabetes**, v. 17, n. 7, p. 509-518, 2016. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/pedi.12198/full>>.

JAHN, R., FASSHAUER, D. Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles. **Nature**, v. 490, n. 7419, p. 201, 2012. Disponível em: < <https://www.nature.com/articles/nature11320>>.

JANSEN, P. L.M., STURM, E. Genetic cholestasis, causes and consequences for hepatobiliary transport. **Liver International**, v. 23, n. 5, p. 315-322, 2003. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1034/j.1478-3231.2003.00856.x/full>>.

KAHN, S. E., HULL, R. L., UTZSCHNEIDER, K. M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 840, 2006. Disponível em: < <https://www.nature.com/articles/nature05482>>.

KANAZAWA, T., SHIMAZAKI, A., SATO, T., HOSHINO, T. Syntheses of ursodesoxycholic acid and its conjugated bile acid. **Proceedings of the Japan Academy**, v. 30, n. 5, p. 391-392, 1954. Disponível em: < https://www.jstage.jst.go.jp/article/pjab1945/30/5/30_5_391/_article/-char/ja/>.

KAPRAL, C., WEWALKA, F., PRAXMARER, V., LENZ, K., HOFMANN, A. F. Conjugated bile acid replacement therapy in short bowel syndrome patients with a residual colon. **Zeitschrift für Gastroenterologie**, v. 42, n. 7, p. 583-589, 2004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15248106>>.

KARS, M., YANG, L., GREGOR, M. F., MOHAMMED, B. S., PIETKA, T. A., FINCK, B. N., KLEIN, S. Tauroursodeoxycholic acid may improve liver and muscle but not adipose tissue insulin sensitivity in obese men and women. **Diabetes**, v. 59, n. 8, p. 1899-1905, 2010. Disponível em: < <http://diabetes.diabetesjournals.org/content/59/8/1899.short>>.

KATSAROU, A., GUDBJÖRNSDOTTIR, S., RAWSHANI, A., DABELEA, D., BONIFACIO, E., ANDERSON, B. J., LERNMARK, Å. Type 1 diabetes mellitus. **Nature reviews Disease primers**, v. 3, p. 17016, 2017. Disponível em: < <https://www.nature.com/articles/nrdp201716> >.

KELLEY, D. E., MANDARINO, L. J. Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance: a reexamination. **Diabetes**, v. 49, n. 5, p. 677-683, 2000. Disponível em: < <http://diabetes.diabetesjournals.org/content/49/5/677.short>>.

KOLB, H. Mouse models of insulin dependent diabetes: Low-dose streptozocin-induced diabetes and nonobese diabetic (NOD) mice. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 3, n. 3, p. 751-778, 1987. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/dmr.5610030308/full>>.

KOLB-BACHOFEN, V., EPSTEIN, S., KIESEL, U., KOLB, H. Low-dose streptozocin-induced diabetes in mice: electron microscopy reveals single-cell insulinitis before diabetes onset. **Diabetes**, v. 37, n. 1, p. 21-27, 1988. Disponível em: < <http://diabetes.diabetesjournals.org/content/37/1/21.short>>.

KURAUTI, M. A., COSTA-JÚNIOR, J. M., FERREIRA, S. M., DOS SANTOS, G. J., PROTZEK, A. O., NARDELLI, T. R., BOSCHERO, A. C. Acute exercise restores insulin clearance in diet-induced obese mice. **Journal of Endocrinology**, v. 229, n. 3, p. 221-232, 2016. Disponível em: < <http://joe.endocrinology-journals.org/content/229/3/221.short>>.

LARSSON, L. I., REHFELD, J. F., SUNDLER, F., HÅKANSON, R. Pancreatic gastrin in foetal and neonatal rats. **Nature**, v. 262, n. 5569, p. 609, 1976. Disponível em: < <https://www.nature.com/articles/262609a0>>.

LEE, Y. Y., HONG, S. H., LEE, Y. J., CHUNG, S. S., JUNG, H. S., PARK, S. G., PARK, K. S. Tauroursodeoxycholate (TUDCA), chemical chaperone, enhances function of islets by reducing ER stress. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 397, n. 4, p. 735-739, 2010. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X10011253>>.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan-and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, v. 51, n. 2, p. 216-226, 2008. Disponível em: < <https://link.springer.com/article/10.1007/s00125-007-0886-7>>.

LI, T., CHIANG, J. Y. Bile acid signaling in metabolic disease and drug therapy. **Pharmacological reviews**, v. 66, n. 4, p. 948-983, 2014. Disponível em: < <http://pharmrev.aspetjournals.org/content/66/4/948.short> >.

LI, J., LI, T. Bile acid receptors link nutrient sensing to metabolic regulation. *Liver research*, v. 1, n. 1, p. 17-25, 2017. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S254256841700006X> >.

LIKE, A. A.; ROSSINI, A. A. Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus. **Science**, v. 193, n. 4251, p. 415-417, 1976. Disponível em: < <http://science.sciencemag.org/content/193/4251/415.short>>.

LIND, M., ODÉN, A., FAHLÉN, M., ELIASSON, B. The true value of HbA1c as a predictor of diabetic complications: simulations of HbA1c variables. **PLoS One**, v. 4, n. 2, p. e4412, 2009. Disponível em: < <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0004412>>.

LIND, M., SVENSSON, A. M., KOSIBOROD, M., GUDBJÖRNSDOTTIR, S., PIVODIC, A., WEDEL, H., ROSENGREN, A. Glycemic control and excess mortality in type 1 diabetes. **New England Journal of Medicine**, v. 371, n. 21, p. 1972-1982, 2014. Disponível em: < <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmoa1408214>>.

LIVINGSTONE, S. J., LOOKER, H. C., HOTHERSALL, E. J., WILD, S. H., LINDSAY, R. S., CHALMERS, J., PEARSON, D. W. Risk of cardiovascular disease and total mortality in adults with type 1 diabetes: Scottish registry linkage study. **PLoS Medicine**, v. 9, n. 10, p. e1001321, 2012. Disponível em: < <http://journals.plos.org/plosmedicine/article?id=10.1371/journal.pmed.1001321>>

LU, T. T., MAKISHIMA, M., REPA, J. J., SCHOONJANS, K., KERR, T. A., AUWERX, J., MANGELSDORF, D. J. Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. **Molecular Cell**, v.6, n. 3, p. 507-515, 2000. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1097276500000502>>.

MAGANTI, A., EVANS-MOLINA, C., MIRMIRA, R. From immunobiology to β -cell biology: the changing perspective on type 1 diabetes. **Islets**, v. 6, n. 2, p. 211ra156-6, 2014. Disponível em: < <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/isl.28778>>.

MAKISHIMA, M., LU, T. T., XIE, W., WHITFIELD, G. K., DOMOTO, H., EVANS, R. M., MANGELSDORF, D. J. Vitamin D receptor as an intestinal bile acid sensor. **Science**, v. 296, n. 5571, p. 1313-1316, 2002. Disponível em: < <http://science.sciencemag.org/content/296/5571/1313>>.

MARCON, S. S., FAQUINELLO, P., FONSECA, E. L., HADDAD, M. L., DA SILVA BARRETO, M. Diabetic children health care in the family's view: a qualitative approach. **Online Brazilian Journal of Nursing**, v. 8, n. 2, 2009. Disponível em: < <http://www.objnursing.uff.br/index.php/nursing/article/view/j.1676-4285.2009.2262>>.

MARTINEZ, K., FRAZER, S. F., DEMPSTER, M., HAMILL, A., FLEMING, H., MCCORRY, N. K. Psychological factors associated with diabetes self-management among adolescents with Type 1 diabetes: A systematic review. **Journal of Health Psychology**, p. 1359105316669580, 2016. Disponível em: < <http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/1359105316669580>>.

MIAO, J., XIAO, Z., KANAMALURU, D., MIN, G., YAU, P. M., VEENSTRA, T. D., KEMPER, J. K. Bile acid signaling pathways increase stability of Small Heterodimer Partner (SHP) by inhibiting ubiquitin–proteasomal degradation. **Genes & Development**, v. 23, n. 8, p. 986-996, 2009. Disponível em: < <http://genesdev.cshlp.org/content/23/8/986.short>>.

MORGAN, N. G., CABLE, H. C., NEWCOMBE, N. R., WILLIAMS, G. T. Treatment of cultured pancreatic B-cells with streptozotocin induces cell death by apoptosis. **Bioscience Reports**, v. 14, n. 5, p. 243-250, 1994. Disponível em: < <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01209729>>.

MOSTHAF, L., GRAKO, K., DULL, T. J., COUSSENS, L., ULLRICH, A., MCCLAIN, D. A. Functionally distinct insulin receptors generated by tissue-specific alternative splicing. **The EMBO journal**, v. 9, n. 8, p. 2409-2413, 1990. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/j.1460-2075.1990.tb07416.x/full> >.

NAKAHARA, M., FURUYA, N., TAKAGAKI, K., SUGAYA, T., HIROTA, K., FUKAMIZU, A., SATO, R. Ileal bile acid-binding protein, functionally associated with the farnesoid X receptor or the ileal bile acid transporter, regulates bile acid activity in the small intestine. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 51, p. 42283-42289, 2005. Disponível em: < <http://www.jbc.org/content/280/51/42283.short>>.

NATHAN, D. M., CLEARY, R. A., BACKLUND, J. Y., GENUTH, S. M., LACHIN, J. M., ORCHARD, T. J., RASKIN, P., ZINMAN, B.. Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 25, p. 2643-53, 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16371630>>.

NEWSHOLME, P., ABDULKADER, F., REBELATO, E., ROMANATTO, T., PINHEIRO, C. H., VITZEL, K. F., GORJAO, R. Amino acids and diabetes: implications for endocrine, metabolic and immune function. **Frontiers in Bioscience**, v. 16, p. 315-339, 2011. Disponível em: <<https://pdfs.semanticscholar.org/a416/2a56e042bcecd2e31855ac3ee2611137592e.pdf>>.

NEWSHOLME, P., CRUZAT, V., ARFUSO, F., KEANE, K. Nutrient regulation of insulin secretion and action. **Journal of Endocrinology**, v. 221, n. 3, p. R105-R120, 2014. Disponível em: <<http://joe.endocrinology-journals.org/content/221/3/R105.short>>.

NOLAN, C. J., DAMM, P., PRENTKI, M. Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management. **The Lancet**, v. 378, n. 9786, p. 169-181, 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673611606144>>.

NUKATSUKA, M., YOSHIMURA, Y., NISHIDA, M., KAWADA, J. Importance of the concentration of ATP in rat pancreatic β cells in the mechanism of streptozotocin-induced cytotoxicity. **Journal of Endocrinology**, v. 127, n. 1, p. 161-165, 1990. Disponível em: <<http://joe.endocrinology-journals.org/content/127/1/161.short>>.

OZCAN, L., ERGIN, A. S., LU, A., CHUNG, J., SARKAR, S., NIE, D., OZCAN, U. Endoplasmic reticulum stress plays a central role in development of leptin resistance. **Cell metabolism**, v. 9, n. 1, p. 35-51, 2009. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1550413108003896>>.

ÖZCAN, U., YILMAZ, E., ÖZCAN, L., FURUHASHI, M., VAILLANCOURT, E., SMITH, R. O., HOTAMISLIGIL, G. S. Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. **Science**, v. 313, n. 5790, p. 1137-1140, 2006. Disponível em: <<http://science.sciencemag.org/content/313/5790/1137.short>>.

PAIK, S., FLEISCHER, N., SHIN, S. Insulin-dependent diabetes mellitus induced by subdiabetogenic doses of streptozotocin: obligatory role of cell-mediated autoimmune processes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 77, n. 10, p. 6129-6133, 1980. Disponível em: < <http://www.pnas.org/content/77/10/6129.short>>.

PAN, F. C., WRIGHT, C. Pancreas organogenesis: from bud to plexus to gland. **Developmental Dynamics**, v. 240, n. 3, p. 530-565, 2011. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/dvdy.22584/full>>.

PAPP, E., CSERMELY, P. Chemical chaperones: mechanisms of action and potential use. **Molecular Chaperones in Health and Disease**, p. 405-416, 2006. Disponível em: < https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F3-540-29717-0_16>.

PATTI, M. E., KAHN, C. R. The insulin receptor-a critical link in glucose homeostasis and insulin action. **Journal of basic and clinical physiology and pharmacology**, v. 9, n. 2-4, p. 89-110, 1998. Disponível em: < <https://www.degruyter.com/view/j/jbcpp.1998.9.2-4/jbcpp.1998.9.2-4.89/jbcpp.1998.9.2-4.89.xml>>.

PESSIN, J. E., SALTIEL, A. R. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. **The Journal of clinical investigation**, v. 106, n. 2, p. 165-169, 2000. Disponível em: < <https://www.jci.org/articles/view/10582>>.

PIROT, P., CARDOZO, A. K., EIZIRIK, D. L. Mediators and mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 diabetes. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, n. 2, p. 156-165, 2008. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0004-27302008000200003&script=sci_arttext&tIng=es >.

PONGRACZ, J., CLARK, P., NEOPTOLEMOS, J. P., LORD, J. M. Expression of protein kinase C isoenzymes in colorectal cancer tissue and their differential activation by different bile acids. **International Journal of Cancer**, v. 61, n. 1, p. 35-39, 1995. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.2910610107/full>>.

POTTHOFF, M. J., BONEY-MONTOYA, J., CHOI, M., HE, T., SUNNY, N. E., SATAPATI, S., BURGESS, S. C. FGF15/19 regulates hepatic glucose metabolism by inhibiting the CREB-PGC-1 α pathway. **Cell Metabolism**, v. 13,

n. 6, p. 729-738, 2011. Disponível em: <
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1550413111001768>>.

RAKIETEN, N. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). **Cancer Chemotherapy Reports**, v. 29, p. 91-98, 1963. Disponível em: <
<https://ci.nii.ac.jp/naid/10008411720/>>.

RANDLE, P. J. Fuel selection in animals. 1986. Disponível em: <
<https://pdfs.semanticscholar.org/578c/5d2fb02a6cb4a6f38c57239e89c6af4d752b.pdf>>.

RODA, A., HOFMANN, A. F., MYSELS, K. J. The influence of bile salt structure on self-association in aqueous solutions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 258, n. 10, p. 6362-6370, 1983. Disponível em: <
<http://www.jbc.org/content/258/10/6362.short>>.

RORSMAN, P., BRAUN, M. Regulation of insulin secretion in human pancreatic islets. **Annual Review of Physiology**, v. 75, p. 155-179, 2013. Disponível em: <
<http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-physiol-030212-183754>>.

RUBIN, R. A., KOWASKI, T. E., KHANDELWAL, M., MALET, P. F. Ursodiol for hepatobiliary disorders. *Annals of Internal Medicine*, v. 121, n. 3, p. 207-18, 1994. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8017748>>.

RUTTER, G. A. Nutrient–secretion coupling in the pancreatic islet β -cell: recent advances. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 22, n. 6, p. 247-284, 2001. Disponível em: <
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0098299701000139>>.

RUTTER, G. A., PULLEN, T. J., HODSON, D. J., MARTINEZ-SANCHEZ, A., MCLUSKEY, K., MOTTRAM, J., VAN DIJCK, P. Pancreatic β -cell identity, glucose sensing and the control of insulin secretion. **Biochemical Journal**, v. 466, n. 2, p. 203-218, 2015. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25697093>>.

SALEN, G. TINT, G. S., SHEFER, S. Treatment of cholesterol gallstones with litholytic bile acids. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 20, n. 1, p. 171-182, 1991. Disponível em: < <http://europepmc.org/abstract/med/2022420>>.

SALTIEL, A. R, KAHN, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 799, 2001. Disponível em: < <https://www.nature.com/articles/414799a>>.

SCHOEMAKER, M. H., CONDE DE LA ROSA, L., BUIST-HOMAN, M., VRENKEN, T. E., HAVINGA, R., POELSTRA, K., MOSHAGE, H. Tauroursodeoxycholic acid protects rat hepatocytes from bile acid-induced apoptosis via activation of survival pathways. **Hepatology**, v. 39, n. 6, p. 1563-1573, 2004. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.20246/full>>.

SECRET, A. M., BECKER, D. J., KELSEY, S. F., LaPORTE, R. E., ORCHARD, T. J. All-cause mortality trends in large population-based cohort with long-standing childhood-onset type 1 diabetes: the Allegheny County type 1 diabetes registry. **Diabetes Care**, v. 33, n. 12, p. 2573-9, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21115767>>.

SHAPIRO, H., KOLODZIEJCZYK, A. A., HALSTUCH, D., ELINAV, E. Bile acids in glucose metabolism in health and disease. **Journal of Experimental Medicine**, v. 215, n. 2, p. 383-396, 2018. Disponível em: < <http://jem.rupress.org/content/early/2018/01/12/jem.20171965>>.

SHIH, H. P., WANG, A., SANDER, M. Pancreas organogenesis: from lineage determination to morphogenesis. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 29, p. 81-105, 2013. Disponível em: < <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-cellbio-101512-122405>>.

SILVERTHORN, Dee Unglaub. **Fisiologia humana: uma abordagem integrada**. Artmed editora, 2010.

SOFUE, M., YOSHIMURA, Y., NISHIDA, M., KAWADA, J. Uptake of nicotinamide by rat pancreatic β cells with regard to streptozotocin action. **Journal of Endocrinology**, v. 131, n. 1, p. 135-138, 1991. Disponível em: < <http://joe.endocrinology-journals.org/content/131/1/135.short>>.

SOLÁ, S., CASTRO, R. E., LAIRES, P. A., STEER, C. J., RODRIGUES, C. M. Tauroursodeoxycholic acid prevents amyloid- β peptide-induced neuronal death via a phosphatidylinositol 3-Kinase-dependent signaling pathway. **Molecular Medicine**, v. 9, n. 9-12, p. 226, 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1430980/>>.

SONG, M. B., YU, X. J., ZHU, G. X., CHEN, J. F., ZHAO, G., HUANG, L. Transfection of HGF gene enhances endothelial progenitor cell (EPC) function and improves EPC transplant efficiency for balloon-induced arterial injury in hypercholesterolemic rats. **Vascular Pharmacology**, v. 51, n. 2-3, p. 205-213, 2009. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1537189109000846>>.

SONODA, J., XIE, W., ROSENFELD, J. M., BARWICK, J. L., GUZELIAN, P. S., EVANS, R. M. Regulation of a xenobiotic sulfonation cascade by nuclear pregnane X receptor (PXR). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 21, p. 13801-13806, 2002. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/99/21/13801.short>>.

STAELS, B., KUIPERS, F. Bile acid sequestrants and the treatment of type 2 diabetes mellitus. **Drugs**, v. 67, n. 10, p. 1383-1392, 2007. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.2165/00003495-200767100-00001>>.

STUDER, E., ZHOU, X., ZHAO, R., WANG, Y., TAKABE, K., NAGAHASHI, M., XU, W. Conjugated bile acids activate the sphingosine-1-phosphate receptor 2 in primary rodent hepatocytes. **Hepatology**, v. 55, n. 1, p. 267-276, 2012. Disponível em: <<https://aasldpubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/hep.24681>>.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiological Research**, v. 50, n. 6, p. 537-546, 2001. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11829314>>.

TAKASU, N., KOMIYA, I., ASAWA, T., NAGASAWA, Y., YAMADA, T. Streptozocin- and alloxan-induced H₂O₂ generation and DNA fragmentation in pancreatic islets: H₂O₂ as mediator for DNA fragmentation. **Diabetes**, v. 40, n. 9, p. 1141-1145, 1991. Disponível em: <<http://diabetes.diabetesjournals.org/content/40/9/1141.short>>.

TURK, J., CORBETT, J. A., RAMANADHAM, S., BOHRER, A., MCDANIEL, M. L. Biochemical evidence for nitric oxide formation from streptozotocin in isolated pancreatic islets. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 197, n. 3, p. 1458-1464, 1993. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X83726410>>.

UPPAL, H., TOMA, D., SAINI, S. P., REN, S., JONES, T. J., XIE, W. Combined loss of orphan receptors PXR and CAR heightens sensitivity to toxic bile acids in mice. **Hepatology**, v. 41, n. 1, p. 168-176, 2005. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.20512/full>>.

VETTORAZZI, J. F., RIBEIRO, R. A., BORCK, P. C., BRANCO, R. C. S., SORIANO, S., MERINO, B., BOSCHERO, A., C., NADAL, A., QUESADA, I., CARNEIRO, E. M. The bile acid TUDCA increases glucose-induced insulin secretion via the cAMP/PKA pathway in pancreatic beta cells. **Metabolism-Clinical and Experimental**, v. 65, n. 3, p. 54-63, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26892516> >.

VETTORAZZI, J. F., KURAUTI, M. A., SOARES, G. M., BORCK, P. C., FERREIRA, S. M., BRANCO, R. C. S., MICHELONE, L. S. L., BOSCHERO A. C., JUNIOR, J. M. C., CARNEIRO, E. M. Bile acid TUDCA improves insulin clearance by increasing the expression of insulin-degrading enzyme in the liver of obese mice. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 14876, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26892516> >.

WANG, Y. D., CHEN, W. D., Yu, D., FORMAN, B. M., HUANG, W. The G-Protein-coupled bile acid receptor, Gpbar1 (TGR5), negatively regulates hepatic inflammatory response through antagonizing nuclear factor kappa light-chain enhancer of activated B cells (NF- κ B) in mice. **Hepatology**, v. 54, n. 4, p. 1421-1432, 2011. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.24525/full>>.

WARD, A., BROGDEN, R. N., HEEL, R. C., SPEIGHT, T. M., AVERY, G. S. Ursodeoxycholic acid: a review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy. **Drugs**, v. 27, n. 2, p. 95-131, 1984. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6365507>>.

WATANABE, M., HOUTEN, S. M., MATAKI, C., CHRISTOFFOLETE, M. A., KIM, B. W., SATO, H., SCHOONJANS, K. Bile acids induce energy expenditure

by promoting intracellular thyroid hormone activation. **Nature**, v. 439, n. 7075, p. 484, 2006. Disponível em: < <https://www.nature.com/articles/nature04330>>.

WATANABE, M., HOUTEN, S. M., WANG, L., MOSCHETTA, A., MANGELSDORF, D. J., HEYMAN, R. A., AUWERX, J. Bile acids lower triglyceride levels via a pathway involving FXR, SHP, and SREBP-1c. **The Journal of clinical investigation**, v. 113, n. 10, p. 1408-1418, 2004. Disponível em: < <https://www.jci.org/articles/view/21025>>.

WEIDE, L. G., LACY, P. E. Low-dose streptozocin-induced autoimmune diabetes in islet transplantation model. **Diabetes**, v. 40, n. 9, p. 1157-1162, 1991. Disponível em: < <http://diabetes.diabetesjournals.org/content/40/9/1157.short>>.

WEST, E., SIMON, O. R., MORRISON, E. Y. Streptozotocin alters pancreatic beta-cell responsiveness to glucose within six hours of injection into rats. **The West Indian Medical Journal**, v. 45, n. 2, p. 60-62, 1996. Disponível em: < <http://europepmc.org/abstract/med/8772396>>.

WHITE, M. F., SHOELSON, S. E., KEUTMANN, H., KAHN, C. R. A cascade of tyrosine autophosphorylation in the beta-subunit activates the phosphotransferase of the insulin receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 6, p. 299-2980, 1988. Disponível em: < <http://www.jbc.org/content/263/6/2969.short>>.

WIERUP, N., SUNDLER, F., HELLER, R. S. The islet ghrelin cell. **Journal of molecular endocrinology**, v. 52, n. 1, p. R35-R49, 2014. Disponível em: < <http://jme.endocrinology-journals.org/content/52/1/R35.short>>.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **Global report on diabetes**. World Health Organization, 2016. Disponível em: < http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204871/1/9789241565257_eng.pdf>.

XIE, Q., KHAOUSTOV, V. I., CHUNG, C. C., SOHN, J., KRISHNAN, B., LEWIS, D. E., YOFFE, B. Effect of tauroursodeoxycholic acid on endoplasmic reticulum stress-induced caspase-12 activation. **Hepatology**, v. 36, n. 3, p. 592-601, 2002. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1053/jhep.2002.35441/full>>.

XIE, W., RADOMINSKA-PANDYA, A., SHI, Y., SIMON, C. M., NELSON, M. C., ONG, E. S., EVANS, R. M. An essential role for nuclear receptors SXR/PXR in detoxification of cholestatic bile acids. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 6, p. 3375-3380, 2001. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/98/6/3375.short>>.

YAMAMOTO, H., UCHIGATA, Y., OKAMOTO, H. Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly (ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets. **Nature**, v. 294, n. 5838, p. 284, 1981. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/294284a0>>.

ZECCHIN, H. G., CARVALHEIRA, J. B. C., SAAD, M. J. A. Mecanismos moleculares de resistência à insulina na síndrome metabólica. *Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo*, v. 14, n. 4, p. 574-589, 2004.

ZOLLNER, G., MARSCHALL, H. U., WAGNER, M., TRAUNER, M. Role of nuclear receptors in the adaptive response to bile acids and cholestasis: pathogenetic and therapeutic considerations. **Molecular Pharmaceutics**, v.3, n. 3, p. 231-251, 2006. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/mp060010s>>.

ARTIGO CIENTÍFICO

**THE BILE ACID TUDCA IMPROVES THE BETA CELL MASS
AND INSULIN DEGRADATION IN TYPE-1 DIABETIC MICE**

The bile acid TUDCA improves the beta cell mass and insulin degradation in Type-1 Diabetic Mice

1 **Gabriela Alves Bronczek¹, Jean Franciesco Vettorazzi², Gabriela Moreira Soares², Mirian**
2 **Ayumi Kurauti², Cristiane dos Santos², Maressa Fernandes Bonfim², Everardo Magalhães**
3 **Carneiro², Sandra Lucinei Balbo¹, Antonio Carlos Boschero², José Maria Costa Júnior^{2*}**

4 ¹Laboratório de Fisiologia Endócrina e Metabolismo (LAFEM), Centro de Ciências Biológicas e
5 da Saúde, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, Brazil

6 ²Laboratório de Pâncreas Endócrino e Metabolismo (LAPEM), Departamento de Biologia
7 Estrutural e Funcional, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brazil

8 * Correspondence:

9 Dr José Maria Costa Júnior
10 josefisiouer@gmail.com

11 Number of words: 4.015/Number of figures: 3/Number of tables: 1

12 **Keywords: Type 1 diabetes, insulin, glycemic control, bile acid, TUDCA**

13 Abstract

14 Appropriate control of glycemia in type 1 diabetic (T1D) patients needs daily insulin
15 administration, which can lead to hypoglycemic events and others side effects. Therefore, it is
16 important to find endogenous molecules, without side effects, for T1D treatment. In this sense,
17 the biliary acid conjugated with taurine tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) presents positive
18 effects in type 2 diabetes treatment. However, its beneficial effects on TD1 have been less
19 explored. Thus, we have assessed the effects of TUDCA on glycemic control in streptozotocin-
20 induced diabetic mice. For this, C57BL/6 mice received intraperitoneal (i.p.) administration of
21 streptozotocin (40mg/kg, streptozotocin was dissolved in 0,5 M citrate buffer, pH 4,5) for 5 days,
22 STZ group (n=22). Whereas control (CON) group (n=6) received the same volume of citrate
23 buffer. Once confirmed diabetes in the STZ group, diabetic mice were randomly selected and
24 allocated in the 2 following groups: 1) STZ group (n=10) that received i.p. PBS, and 2)
25 STZ+TUDCA group (n=12) that received i.p. 300 mg/kg TUDCA (dissolved in PBS). These
26 treatments were maintained for 24 days. After 15 days of treatment, STZ+TUDCA mice showed a
27 43% reduction in blood glucose, compared with STZ. This reduction was probably due to an
28 increase in insulinemia. This increase in insulinemia may be explained, at least in part, by a
29 reduction in hepatic IDE (insulin degrading enzyme) activity, as well as, by an increase in beta
30 cell mass and higher beta cell number per islet. All together, these effects contributed to the
31 improvement of metabolic flexibility. In conclusion, TUDCA shows therapeutic potential for the
32 control of glycemia in TD1.

33

34 1 Introduction

35 Type 1 diabetes (T1D) is an autoimmune disease with progressive destruction of pancreatic beta
36 cells (Maganti et al., 2014; Atkinson et al., 2016), triggered by genetic predisposition combined

37 with environmental factors, resulting in deficiency in insulin production (Cnop et al., 2005;
38 Daneman, 2006). Inadequate management of the disease results in hyperglycemia, which can lead
39 to various complications, such as neuropathy, retinopathy, nephropathy (Nathan et. al., 2005;
40 Lind et. al., 2009), and cardiovascular disease (Lind et al., 2014). Since insulin plays a pivotal
41 role in glycemic control, exogenous administration of insulin is required for T1D patients (Chiang
42 et. al., 2014; Henriksson et al., 2016).

43

44 Despite the availability of exogenous insulin, a proper control of blood glucose in T1D patients is
45 difficult to manage (O'Hara et al., 2017). Insulin therapy is usually associated with some side
46 effects, such as hypoglycemia and weight gain (Dewitt; Hirsch, 2003; Bergenstal et. al., 2010),
47 aggravated by the lack of adherence of the patients to the adequate treatment, since it is more
48 frequent in children and adolescents (Hilliard et al., 2013; Hynes et al., 2014, O'Hara et al.,
49 2017). Thus, endogenous molecules that could be used for glycemic control, without side effects
50 or adherence concerns, could be a potential treatment for T1D.

51

52 The taurine conjugated bile acid tauroursodeoxycholic (TUDCA) has emerged as a possible
53 candidate due to its beneficial effects on glucose homeostasis (da-Silva et al., 2011). In the liver,
54 TUDCA stimulates sphingosine-1-phosphate receptor 2 (S1PR2) that activates insulin signaling
55 by activation of the PI3K/Akt pathway (Studer et al., 2012; Chiang, 2013). The S1PR2 activation
56 by TUDCA also increases insulin degrading enzyme expression in the liver, improving the insulin
57 clearance in an insulin resistance mice model (Vettorazzi et al., 2017). In addition, TUDCA acts
58 as a chemical chaperone, reducing endoplasmic reticulum stress in hepatocytes (Ozcan et al.,
59 2006) and in pancreatic islets (Lee et al., 2010). TUDCA treatment, in prediabetic stage, reduces
60 T1D incidence, insulinitis and immune-mediated destruction in the islet area, leading to beta cell
61 survival and preserving islet architecture (Engin et al., 2013). Therefore, the effects of TUDCA in
62 pancreatic islet and beta cell mass, after T1D installation, remain unclear. In this way, we tested
63 the possible effect of TUDCA to revert the hyperglycemia in streptozotocin-induced T1D mice,
64 focusing on pancreatic islet and liver regulation.

65 **2 Materials and Methods**

66 **2.1 Reagents**

67 TUDCA was purchased from Calbiochem (São Paulo, Brazil, cat. 580549) and Insulin Kit was
68 acquired from Millipore (Darmstadt, Germany, cat. #EZRMI-12K). Streptozotocin was purchased
69 from Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA, S0130-1G). Western Blot reagents were purchased
70 from Bio-Rad (Madrid, Spain), IDE antibody was acquired from Abcam (Cambridge, UK) and
71 Tubulin was acquired from Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA). Insulin antibody was acquired
72 from Dako North America (Carpinteria, CA, USA, ref. A0564). The remaining reagents were
73 purchased from Sigma Aldrich.

74 **2.2 Animals**

75 All experiments involving animals were approved by the Animal Care Committee at UNICAMP
76 (License Number: 4747-1). Male 8 weeks old C57Bl/6 mice were obtained from the breeding
77 colony at UNICAMP and maintained at $22\pm 1^\circ\text{C}$, on a 12h light-dark cycle. As in Furman (2015)
78 protocol, to induce type 1 diabetes in the experimental group, intraperitoneal (i.p.) injection of
79 streptozotocin (STZ) (40mg/kg, STZ was dissolved in 0.5 M citrate buffer, pH 4.5) was
80 administered for 5 days. The same volume of citrate buffer was injected in the control group.
81 Twelve days after the STZ injection, animals with fasting blood glucose levels above ≥ 200 mg/dL
82 were considered diabetic.

83 **2.3 Experimental Protocol**

84 Once confirmed diabetes in the STZ mice (fast glycemia >200 mg/dl), the control group was
85 excluded from the subsequent experiments. Diabetic mice were randomly selected and allocated
86 in the 2 following groups: 1) STZ group received, i.p., PBS and 2) STZ+TUDCA group received,
87 i.p. 300 mg/kg TUDCA (dissolved in PBS). The injections were administered for 24 days. Fasting
88 glucose and body weight of both groups were measured in the 7th and 15th day of the treatment.
89 Mice were killed in the 24th day of treatment in a CO₂ chamber and decapitated for blood
90 collection and removal of the pancreas and liver for posterior analyses.

91 **2.4 Intraperitoneal Glucose and Insulin Tolerance Tests**

92 At the 20th day of TUDCA treatment, the mice were subjected to 12-h fasting to perform the
93 ipGTT. The fasting blood glucose level was measured (time 0) by a glucometer. After, the mice
94 received an i.p. glucose load of 1 g/kg body weight and the glycemia was measured at 15, 30, 60,
95 90 and 120 min. Two days later, for the ipITT, the mice were subjected to a 2-h fasting and the
96 glycemia was measured before (time 0) and 4, 8, 12, 16, 20, 30 and 60 min after the i.p.
97 administration of 1 U/kg insulin load. The KITT (glucose disappearance rate) was calculated as
98 previously described (Akinmokin et al., 1992).

99 **2.5 Physiological Measurements**

100 For indirect calorimetry, the mice were allowed a 24-h acclimation to the apparatus, two days
101 after the ipITT. The mice remained at rest during a 12h light/dark cycle. O₂ and CO₂ were
102 measured by an Oxylet system (Pan Lab/Harvard Apparatus). The respiratory quotient (RQ) was
103 calculated from these data.

104 **2.6 Plasma Insulin measurement**

105 Mouse insulin Kit (Darmstadt, Germani, cat. #EZRMI-13K) was used to measure plasma
106 insulin. The plasma samples were obtained by centrifugation of blood samples at 1100 g, 15 min,
107 4°C. The assays were performed as indicated on the kit protocol. The blood samples for insulin
108 measurements were collected on fed and fasted state at the end of the treatment.

109 **2.7 IDE activity**

110 Liver IDE activity measurement was performed using the SensoLyte 520 IDE Activity Assay Kit
111 (AnaSpec, Fremont, CA, USA, cat. AS-72231) following the manufacturer's instructions. The

112 total IDE activity was calculated as previously described (Kurauti et al., 2016) and normalized per
113 μg of total protein, which was determined using Bradford reagent. The kinetic concentration of 5-
114 FAM was also normalized per μg of total protein.

115 **2.8 Western blot analysis**

116 Liver samples were collected and homogenized. After centrifuging at 12000 rpm for 30 min, 4°C,
117 the protein was determined using Bradford reagent. For SDS (sodium dodecyl sulfate)
118 polyacrylamide gel electrophoresis, all samples were treated with a Laemmli buffer containing
119 dithiothreitol. After heating to 100°C for 5 min, proteins were separated by electrophoresis in a
120 10% polyacrylamide gel. The transfer to nitrocellulose membranes was performed in a Trans Blot
121 transfer for 2-h in 100 V, with Tris/Glycine buffer. After, the membranes were blocked with 5%
122 BSA during 1-h, and then, they were incubated with polyclonal antibody against IDE (Abcam,
123 cat. Ab32216). Tubulin (Sigma Aldrich, cat. 6074) was used as control. Visualization of specific
124 protein bands was performed by incubation the membranes with appropriate secondary
125 antibodies. Protein bands were visualized using the Amersham Imager 600 (GE Healthcare Life
126 Sciences, Buckinghamshire, UK) which detects the chemiluminescence. The band intensities
127 were quantified with the Image J software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

128 **2.9 Pancreas morphometry and Immunohistochemistry**

129 Pancreas samples of four animals from each group were fixed in 10% formalin, embedded in
130 Paraplast (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA), sectioned into slices of 5 μm and adhered to
131 individual silanized glasses. The first and the 50th sections were immunoperoxidase-stained for
132 insulin to quantify the distribution of pancreatic beta cells. After the removal of the paraplast, the
133 sections were rehydrated and washed with 0.5 M Tris-buffered saline (TBS, pH 7.4) and treated
134 with 0.1 M sodium citrate buffer (pH 6.0) at 100°C for antigen retrieval. The sections were
135 washed again with TBS and blocked against endogenous peroxidase activity with 3% H_2O_2 .
136 Sections were washed with TBS and then incubated for 1-h with TBS with 3% BSA followed by
137 primary antibody incubation overnight at 4°C. The antibody used was polyclonal guinea pig anti-
138 insulin (Dako North America, Carpinteria, CA, USA, ref. A0564) diluted at 1:90 in TBS with 3%
139 BSA. Subsequently, sections were incubated in the presence of secondary antibody for 1-h. The
140 antibody used was anti-guinea pig IgG, diluted at 1:200. The positive insulin cells were detected
141 with diaminobenzidine (DAB) solution (0.1 % DAB and 0.02% H_2O_2 in TBS). Finally, the
142 sections were rapidly stained with Harris' hematoxylin and mounted for microscopic observation.
143 All islets present in the sections were covered systematically by capturing images with a digital
144 camera coupled to a microscope (Olympus DP71; Olympus BX60, Japan). Pancreatic islets and
145 beta cells were measured using Image J software (National Institutes of Health, Bethesda, MD,
146 USA). The islet area and beta cell area were calculated by the total islet and beta cell areas (%
147 pancreas area) multiplied by pancreas weight (mg) (Lubaczeuski et al., 2015).

148 **2.10 Statistical analysis**

149 The data are presented as means \pm standard errors mean (SEM) for 4-21 mice. To evaluate data
150 normality, we applied Shapiro-Wilk test. When in normality, we used parametric Student's t test,

151 otherwise, non-parametric Mann-Whitney test was adopted. The difference between groups were
152 consider statistically significant if $P \leq 0,05$.

153 **3 Results**

154 **3.1 Streptozotocin induced Type 1 Diabetes**

155 First, we characterized the T1D mice by fasting glucose measurement, and, as expected, STZ
156 mice presented hyperglycemia compared to CON group (Fig 1A). However, no differences in
157 body weight between both groups were noticed (Fig 1D). Since the experimental model for T1D
158 was working, the subsequent experiments were done on STZ mice.

159 **3.2 TUDCA improved fasting glycaemia in STZ mice**

160 In the first week of treatment, body weight (Fig 1E) and fasting glycemia (Fig 1B) in
161 STZ+TUDCA were similar to STZ group. However, at the end of the second week of treatment,
162 fasting glycemia in STZ+TUDCA mice was reduced by approximately 43% (Fig 1C), compared
163 to STZ mice. Body weight remained similar in both groups (Fig 1F). In addition, there was no
164 difference between both groups in gastrocnemius muscle and perigonadal fat pad weight (Table
165 1).

166 **3.3 TUDCA improved glucose tolerance but did not alter insulin sensitivity in STZ mice**

167 To investigate the effects of TUDCA on glucose homeostasis we performed intraperitoneal
168 glucose and insulin tolerance tests (ipGTT and ipITT). After glucose load, both groups had a
169 maximal glucose peak at 15-30 min (Fig 2A). However, the STZ+TUDCA mice presented
170 improved glucose tolerance (Fig 2A), as judged by the lower AUC of blood glucose, during
171 ipGTT (Fig 2B). As expected, there was no difference between both groups about insulin
172 sensitivity, as judged by the glucose disappearance rate (KITT) (Fig 2C). Finally, we observed
173 that plasma insulin levels in fed, but not in fasted, state was significantly higher in STZ+ TUDCA
174 group (Figs 2D-2E).

175 **3.4 TUDCA reduced IDE activity, but not IDE expression, in the liver of STZ mice**

176 Plasma insulin concentrations were controlled by insulin secretion and clearance. In this case,
177 elevated plasma insulin concentration in STZ+TUDCA mice in fed state could be due to reduced
178 insulin clearance. Therefore, we investigated the IDE expression and activity in the liver of these
179 mice. TUDCA treatment did not alter IDE expression (Fig 2F); however, IDE activity in
180 STZ+TUDCA mice was reduced compared to STZ mice (Fig 2H), explaining, at least in part, the
181 elevated plasma insulin concentration in this group.

182 **3.4 TUDCA treatment increased beta-cell number per islet and mass in STZ mice**

183 We also investigated the effect of TUDCA treatment on beta cell and islets morphology. We
184 observed that pancreas weight (Fig. 3B), total islet area (Fig. 3E) and islet/section rate (Fig. 3G)
185 remained similar in both groups. However, islet mass (Fig. 3C) was reduced by 10% in
186 STZ+TUDCA group. On the other hand, beta-cell mass (Fig. 3D) and the beta-cell number per

187 islet (Fig. 3F) increased 144% and 28%, respectively, in STZ+TUDCA, compared with STZ
188 mice. Representative figures of histological pancreatic sections, stained for insulin, are shown in
189 (Fig. 3A).

190 **3.5 TUDCA improved metabolic flexibility in STZ mice**

191 TUDCA treatment increased insulinemia and reduced glycemia in STZ mice. Thus, we also
192 investigated whether these results may alter the metabolic flexibility of these mice by calculating
193 the respiratory quotient (RQ). The RQ may be calculated by measuring the amount of carbon
194 dioxide (CO₂) produced in comparison to the amount of oxygen (O₂) used, and it is possible to
195 predict which substrate is being oxidized and used as a fuel. As expected, during the light period
196 both groups presented RQ ~0.7 indicating a predominant use of fatty acid, since they were at rest
197 and fasting (Fig 2I). On the other hand, during the dark period, when they were more active and
198 fed, RQ of STZ group remained ~0.7 indicating that they maintained a high rate of fatty acid
199 oxidation, whereas STZ+TUDCA mice presented RQ ~1.0 suggesting that they predominantly
200 used carbohydrate oxidation (Fig 2I). Therefore, increased plasma insulin concentration in the
201 STZ+TUDCA group may increase glucose uptake and oxidation, contributing to reduced
202 glycemia.

203 **4 Discussion**

204 T1D is a highly prevalent disease, characterized by hyperglycemia due to pancreatic beta cell loss
205 induced by an autoimmune attack (Chiang, 2014) that if not well controlled might lead to
206 retinopathy, nerve damage, kidney and cardiovascular disease, and death (Atkinson et al., 2016,
207 Katsarou et al., 2017). The daily exogenous insulin administration is the main therapeutic strategy
208 for T1D and has been applied over the past decades. However, insulin therapy may induce
209 important side effects such as hypoglycemia, weight gain and cancer (Dewitt, Hirsch, 2003;
210 Bergenstal et al., 2010; Wu et al., 2015). Thus, the search for endogenous molecules that could
211 improve the glucose control in T1D may contribute to the reduction of insulin dosage, and
212 eventually the deleterious secondary effects, mentioned above. In this context, the bile-acid
213 TUDCA emerges as an important candidate, due to its known benefits for type 2 diabetic patients,
214 improving their insulin sensitivity in peripheral tissues (Ozcan et al., 2006; Kars et al., 2010). In
215 addition, TUDCA increases insulin secretion in isolated pancreatic islet from healthy mice
216 (Vettorazzi et al, 2016), and also prevents T1D development in NOD mice treated with this
217 compound during the pre-diabetic stage (Engin et al., 2013). It is known that the plasma
218 concentration of specific antibodies and or antigens could predict the T1D occurrence (Katsarou
219 et al., 2017); however, this is a very imprecise and expensive analysis, not used in the current
220 clinical practice. Taking this into account, we treated T1D mice with TUDCA after the induction
221 of the disease by a multiple low-dose of streptozotocin. This streptozotocin approach causes
222 partial pancreatic islet damage, activating an inflammatory process that further induces beta cell
223 activity and loss, ultimately resulting in insulin deficiency and hyperglycemia, closely matching
224 the T1D pathogenesis in humans (Lenzen, 2008; Furman, 2015).

225
226 Twelve days after the last streptozotocin administration, the fasting blood glucose was almost
227 100% higher in STZ compared with CON group, in agreement with previous streptozotocin-

228 induced T1D protocols (Furman, 2015). After that, we divided the T1D mice in two groups, one
229 of them received TUDCA (300 mg/kg) daily through i.p. injections during 24 days. At the 7th day
230 the glycemia was not different between the T1D groups. However, after 15 days of treatment, the
231 fasting glycemia of STZ+TUDCA was significantly reduced, compared with STZ mice, without
232 any changes in the body weight. The efficiency of TUDCA to reduce the glycemia was confirmed
233 by an ipGTT (Fig 2A), and it is possible that this improvement in glucose tolerance was due to
234 the higher plasma insulin levels observed in these mice.

235

236 The insulinemia depends on a balance between insulin secretion and degradation, and it is stated
237 that insulin degradation is higher in streptozotocin-induced T1D rats (Philippe et al., 1981). In
238 healthy subjects the liver is the main site for insulin degradation that occurs through the
239 involvement of insulin degrading enzyme (IDE) (Duckworth et al., 1998), and IDE malfunction
240 has been identified in obesity and type 2 diabetic models (Karamohamed et al., 2003; Erdmann et
241 al., 2009). However the possible role of hepatic IDE modulation in T1D or in T1D mice treated
242 with TUDCA has not been investigated yet.

243

244 Here, we measured the IDE protein content in the liver, and did not find differences between the
245 T1D groups. However we observed a decrease in the liver IDE activity in STZ+TUDCA
246 compared to STZ mice, suggesting that the lower IDE activity in the TUDCA treated mice might
247 contribute to reduced insulin degradation and justifying the higher insulinemia in STZ+TUDCA
248 mice. These results disagree with previous data from our group where we showed that TUDCA
249 increased the insulin clearance by increasing IDE expression. However, this study was performed
250 in hyperinsulinemic mice fed on high fat diet, suggesting that the TUDCA-induced IDE
251 modulation is dependent on the insulinemic state (Vettorazzi et al., 2017).

252

253 The effects of TUDCA on liver do not exclude the possibility of the involvement of pancreatic
254 islet in this context. Thus, we evaluated the histology of pancreata from T1D mice and observed
255 that STZ+TUDCA mice increased their beta cell mass and beta-cell/islet rate, suggesting that
256 even after the loss of beta cell, TUDCA may be able to partially recover beta cell mass, which
257 together with the reduction in IDE activity results in increased insulinemia and consequently
258 improvement of glucose homeostasis in T1D mice. The reduction in endoplasmic reticulum
259 (E.R.) stress and inflammation could be the molecular mechanism by which TUDCA improves
260 pancreatic islet homeostasis and beta cell mass. In fact, previous studies showed the chaperone
261 function of TUDCA in pancreatic islet and beta cell (Lee et al., 2010; Cadavez et al., 2014).
262 Paradoxically, STZ+TUDCA mice showed reduced islet mass, compared to STZ mice. We
263 speculate that this feature might be a result of reduced immune cell infiltration into the islets,
264 since it was demonstrated that TUDCA prevents insulinitis in NOD mice in the pre diabetic state,
265 reducing the onset of T1D in these mice (Engin et al., 2013).

266

267 The T1D patients display metabolic inflexibility due to their incapacity to adjust the macro-
268 nutrients uptake in accord to their metabolic needs (Kelley, Mandarino, 2002). Healthy mice
269 preferentially oxidize glucose during the dark cycle (fed state) and fat acids in the light cycle
270 (fasted state) (Randle, 1986). Here, we demonstrated that TUDCA treatment was able to improve
271 the energetic metabolism in T1D mice, probable due to their insulinemia recovery.

272
273 Taken together, we concluded that TUDCA treatment increase insulinemia in STZ-induced
274 diabetic mice acting through two distinguished mechanism, increasing pancreatic beta cell mass,
275 and also by decreasing IDE activity in the liver. Both alterations contribute to the improvement of
276 glycemic control and metabolic flexibility in these mice. These finds suggest TUDCA treatment
277 as a potential strategy to counteract glucose homeostasis disturbance in type-1 diabetic patients.

278 **5 Conflict of Interest**

279 The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial
280 relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

281 **6 Author Contributions**

282 GAB, JMJ and JFV contributed to research design and GAB, JMJ, JFV, GMS, MAK, CS and
283 MFB conducted the experiments and acquired data. ACB and EM provided all reagents. GAB,
284 JMJ, JFV, GMS, MAK contributed to data analysis and interpretation. GAB and JMJ wrote the
285 manuscript. ACB and SB revised the manuscript. All authors reviewed and approved the final
286 version of the manuscript.

287 **7 Funding**

288 This study was supported by the Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo
289 (FAPESP) grant number 2015/12611-0, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
290 Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
291 and Fundação Araucária grant number 320/2015.

292 **8 Acknowledgments**

293 We thank Bil for technical assistance.

294 **9 List of abbreviations**

295 AKT – Protein kinase B; AUC – Area under the curve; BSA – Bovine Serum Albumin; CON –
296 Control; DAB – Diaminobenzidine; IDE – Insulin degrading enzyme; NOD – Non obese diabetic;
297 PI3K – Phosphoinositide 3-kinase; RQ – Respiratory quotient ; S1PR2 – Sphingosine-1-
298 phosphate receptor 2; SDS – Sodium dodecyl sulfate; STZ – Streptozotocin; T1D – Type 1
299 diabetes; TBS – Tris-buffered saline; TUDCA – Tauroursodeoxycholic acid.

300 **10 References**

301 AKINMOKUN, A., SELBY, P. L., RAMAIYA, K., ALBERTI, K. G. (1992). The short insulin
302 tolerance test for determination of insulin sensitivity: a comparison with the euglycaemic clamp.
303 Diabet Med. 9, 432–437.
304 ATKINSON, M. A., EISENBARTH, G. S., MICHELS, A. W. (2014). Type 1 diabetes. Lancet.
305 383, 69-82.

- 306 BERGENSTAL, R. M., TAMBORLANE, W. V., AHMANN, A., BUSE, J. B., DAILEY, G.,
307 DAVIS, S. N., WILLI, S. M. (2010). Effectiveness of sensor-augmented insulin-pump therapy in
308 type 1 diabetes. *New Eng J Med.* 363, 311-320.
- 309 CADAVEZ, L., MONTANE, J., ALCARRAZ-VIZÁN, G., VISA, M., VIDAL-FÀBREGA, L.,
310 SERVITJA, J. M. et al. (2014). Chaperones ameliorate beta cell dysfunction associated with
311 human islet amyloid polypeptide overexpression. *PLoS One.* 9, e101797.
- 312 CHIANG, Y. L. (2013). Bile acid metabolism and signaling. *Compr Physiol.* 3, 1991-212, 2013.
- 313 CHIANG, J. L., KIRKMAN, M. S., LAFFEL, L. M., PETERS, A. L. (2014). Type 1 diabetes
314 through the life span: a position statement of the American Diabetes Association. *Diabetes*
315 *Care.* 37, 2034-2054.
- 316 CNOP, M., WELSH, N., JONAS, J. C., JÖRNS, A., LENZEN, S., EIZIRIK, D. L. (2005).
317 Mechanisms of pancreatic β -cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few
318 similarities. *Diabetes.* 54, S97-S107.
- 319 DANEMAN, D. (2006). Type 1 diabetes. *Lancet.* 367, 847-858.
- 320 DA-SILVA, W. S., RIBICH, S., CASTILLO, M., PATTI, M. E., BIANCO, A. C. (2011). The
321 chemical chaperones tauroursodeoxycholic and 4-phenylbutyric acid accelerate thyroid hormone
322 activation and energy expenditure. *FEBS Lett.* 585, 539–544.
- 323 DEWITT, D. E., HIRSCH, I. B. (2003). Outpatient insulin therapy in type 1 and type 2 diabetes
324 mellitus: scientific review. *JAMA.* 289, 2254-2264.
- 325 DUCKWORTH, W. C., BENNET, R. G., HAMEL, F. G. (1998). Insulin degradation: progress
326 and -potential. *Endocr Rev.* 19, 608-24.
- 327 ENGIN, F., YERMALOVICH, A., NGUYEN, T., HUMMASTI, S., FU, W., EIZIRIK, D. L.,
328 HOTAMISLIGIL, G. S. (2013). Restoration of the unfolded protein response in pancreatic β cells
329 protects mice against type 1 diabetes. *Sci Transl Med.* 5, 211ra156-211ra156.
- 330 ERDMANN, J., MAYR, M., OPPEL, U., SYPCHENKO, O., WAGENPFEIL, S.,
331 SCHUSDZIARRA, V. (2009). Weight-dependent differential contribution of insulin secretion
332 and clearance to hyperinsulinemia of obesity. *Regul Pep.* 1512:1–7.
333 doi.org/10.1016/j.regpep.2008.10.008.
- 334 FURMAN, B. L. (2015). Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Curr Protocol*
335 *Pharmacol.* 70, 5-47.
- 336 HENRIKSSON, M., JINDAL, R., STERNHUFVUD, C., BERGENHEIM, K., SÖRSTADIUS,
337 E., WILLIS, M. (2016). A systematic review of cost-effectiveness models in type 1 diabetes
338 mellitus. *Pharmacoeconomics.* 34:569-585. doi: 10.1007/s40273-015-0374-8.
- 339 HILLIARD, M. E., WU, Y. P., RAUSCH, J., DOLAN, L. M., HOOD, K. K. (2013). Predictors of
340 deteriorations in diabetes management and control in adolescents with type 1 diabetes. *J Adolesc*
341 *Health.* 52, 28-34.
- 342 HYNES, L., BYRNE, M., DINNEEN, S. F., MCGUIRE, B. E., O'DONNELL, M., MC
343 SHARRY, J. (2016). Barriers and facilitators associated with attendance at hospital diabetes
344 clinics among young adults (15–30 years) with type 1 diabetes mellitus: a systematic
345 review. *Pediatr Diabetes.* 17, 509-518.
- 346 KARAMOHAMED, S., DEMISSIE, S., VOLCJAK, J., LIU, C., HEARD-COSTA, N., LIU, J.,
347 ATWOOD, L. D. (2003). Polymorphisms in the insulin-degrading enzyme gene are associated
348 with type 2 diabetes in men from the NHLBI Framingham Heart Study. *Diabetes.* 52, 1562–1567.

- 349 KARS, M., YANG, L., GREGOR, M. F., MOHAMMED, B. S., PIETKA, T. A., FINCK, B. N. et
350 al. (2010). Tauroursodeoxycholic acid may improve liver and muscle but not adipose tissue
351 insulin sensitivity in obese men and women. *Diabetes*. 59, 1899-1905.
- 352 KATSAROU, A., GUDBJÖRNSDOTTIR, S., RAWSHANI, A., DABELEA, D., BONIFACIO,
353 E., ANDERSON, B. J et al. (2017). Type 1 diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Primers*. 3, 17016.
- 354 KELLEY, D. E., MANDARINO, L. J.(2000). Fuel selection in human skeletal muscle in insulin
355 resistance: a reexamination. *Diabetes*. 49, 677-683.
- 356 KURAUTI, M. A., COSTA-JÚNIOR, J. M., FERREIRA, S. M., DOS SANTOS, G. J.,
357 PROTZEK, A. O., NARDELLI, T. R. et al. (2016). Acute exercise restores insulin clearance in
358 diet-induced obese mice. *J Endocrinol*. 229, 221-232.
- 359 LEE, Y. Y., HONG, S. H., LEE, Y. J., CHUNG, S. S., JUNG, H. S., PARK, S. G. et al. (2010).
360 Tauroursodeoxycholate (TUDCA), chemical chaperone, enhances function of islets by reducing
361 ER stress. *Biochem Biophys Res Commun*. 397, 735-739.
- 362 LENZEN, S. (2008). The mechanisms of alloxan-and streptozotocin-induced
363 diabetes. *Diabetologia*, 51, 216-226.
- 364 LIND, M., ODÉN, A., FAHLÉN, M., ELIASSON, B. (2009). The true value of HbA1c as a
365 predictor of diabetic complications: simulations of HbA1c variables. *PLoS One*. 4:e4412. doi:
366 10.1371/journal.pone.0004412.
- 367 LIND, M., SVENSSON, A. M., KOSIBOROD, M., GUDBJÖRNSDOTTIR, S., PIVODIC, A.,
368 WEDEL, H., ROSENGREN, A.(2014). Glycemic control and excess mortality in type 1
369 diabetes. *New Eng J Med*. 371, 1972-1982.
- 370 LUBACZEUSKI, C., BALBO, S. L., RIBEIRO, R. A., VETTORAZZI, J. F., SANTOS-SILVA,
371 J. C., CARNEIRO, E. M., et al. (2015). Vagotomy ameliorates islet morphofunction and body
372 metabolic homeostasis in MSG-obese rats. *Braz J Med Biol Res*. 48: 447–457.
- 373 MAGANTI, A., EVANS-MOLINA, C., MIRMIRA, R. (2014). From immunobiology to β -cell
374 biology: the changing perspective on type 1 diabetes. *Islets*. 6:211ra156-6. doi: 10.4161/isl.28778.
- 375 NATHAN, D. M., CLEARY, R. A., BACKLUND, J. Y., GENUTH, S. M., LACHIN, J. M.,
376 ORCHARD, T. J., RASKIN, P., ZINMAN, B. (2005). Intensive diabetes treatment and
377 cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. *New Eng J Med*. 353, 2643-53.
- 378 O'HARA, M. C., HYNES, L., O'DONNELL, M., NERY, N., BYRNE, M. HELLER, S. R. et al.
379 (2017). A systematic review of interventions to improve outcomes for young adults with Type 1
380 diabetes. *Diabet Med*. 34:753-769. doi: 10.1111/dme.13276.
- 381 OZCAN, U., YILMAZ, E., ÖZCAN, L., FURUHASHI, M., VAILLANCOURT, E., SMITH, R.
382 O. et al. (2006). Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a
383 mouse model of type 2 diabetes. *Science*. 313, 1137-1140.
- 384 PHILIPPE, J., HALBAN, P. A., GJINOVCIC, A., DUCKWORTH, W. C., ESTREICHER, J.,
385 RENOLD, A. E. (1981). Increased Clearance and Degradation of [3 H] Insulin in Streptozotocin
386 Diabetic Rats: ROLE OF THE INSULIN-RECEPTOR COMPARTMENT. *J Clin Invest*. 67, 673-
387 680.
- 388 RANDLE, P. J. (1986). Fuel selection in animals.
- 389 STUDER, E. S., ZHOW, X., ZHAO, R., WANG, Y., TAKABE, K., NAGAHASHI, M. et al.
390 (2012). Conjugated bile acids activate the sphingosine-1-phosphate receptor 2 in primary rodent
391 hepatocytes. *Hepatology*. 55:267–276. doi: 10.1002/hep.24681.

- 392 VETTORAZZI, J. F., KURAUTI, M. A., SOARES, G. M., BORCK, P. C., FERREIRA, S. M.,
393 BRANCO, R. C. S. et al. (2017). Bile acid TUDCA improves insulin clearance by increasing the
394 expression of insulin-degrading enzyme in the liver of obese mice. *Sci Rep.* 7, 14876.
- 395 VETTORAZZI, J. F., RIBEIRO, R. A., BORCK, P. C., BRANCO, R. C. S., SORIANO, S.,
396 MERINO, B. et al. (2016). The bile acid TUDCA increases glucose-induced insulin secretion via
397 the cAMP/PKA pathway in pancreatic beta cells. *Metabolism.* 65, 54-63.
- 398 WU, L., ZHU, J., PROKOP, L. J., MURAD, M. H. (2015). Pharmacologic therapy of diabetes
399 and overall cancer risk and mortality: a meta-analysis of 265 studies. *Sci Rep.* 5, 10147.

Figure Legends

Figure 1. TUDCA treatment improves fasting glycemia from T1D mice. Fasting glycemia of CON (gray bar) and STZ (grid bar) (**A**). Body weight of CON (gray bar) and STZ (grid bar) (**B**) at the end of the streptozotocin administration. Fasting glycemia of STZ (white bar) and STZ + 7 days of TUDCA treatment (black bar) (**C**). Fasting glycemia of STZ (white bar) and STZ + 15 days of TUDCA treatment (black bar) (**D**). Body weight of STZ (white bar) and STZ + 7 days of TUDCA treatment (black bar) (**E**). Body weight of STZ (white bar) and STZ + 15 days of TUDCA treatment (black bar) (**F**). Data are mean \pm SEM (n = 6-21). *P \leq 0.05 (Student's t test or Mann-Whitney test).

Figure 2. TUDCA treatment improves glucose tolerance, increases insulinemia in fed state, reduces IDE activity and improves metabolic flexibility from T1D mice. Blood glucose of STZ (white bar) and STZ+TUDCA (black bar) during ipGTT (**A**). Area under the curve (AUC) of total blood glucose concentration of STZ (white bar) and STZ+TUDCA (black bar) during ipGTT (**B**). Glucose disappearance rate during ipITT (KITT) of STZ (white bar) and STZ+TUDCA (black bar) (**C**). Plasma insulin of STZ (white bar) and STZ+TUDCA (black bar) in fasting (**D**) and fed (**E**) state. Protein expression of IDE in the liver and its representative immunoblotting images of STZ (white bar) and STZ+TUDCA (black bar) (**F**). Kinetic of IDE activity assay (**G**) and total IDE activity (**H**) in the liver of STZ (white bar) and STZ+TUDCA (black bar) mice. Fluorescent intensity at Ex/Em = 490/520 nm was recorded, every 5 min, during 60 min. 5-FAM concentration was calculated using a standard curve and normalized per μ g of total protein. Respiratory coefficient (RQ) (**I**) was determined by indirect calorimetry, during a 12-h light/dark cycle. RQ of STZ (white bar) and STZ+TUDCA (black bar) during the light period. And RQ of STZ (white bar with gray background) and STZ+TUDCA (black bar with gray background) during the dark period. Data are mean \pm SEM (n = 4-10). *P \leq 0.05 (Student's t test or Mann-Whitney test).

Figure 3. TUDCA treatment increases beta-cell mass and beta-cell number per islet from T1D mice. Representative images of pancreas sections stained for insulin (**A**); pancreas weight (g) (**B**); islets mass (mg) (**C**); beta-cell mass (mg) (**D**); total islet area (μm^2) (**E**); beta-cell/islet rate (**F**); islets/section rate (**G**) of STZ (white bar) and STZ+TUDCA (black bar) mice. Data are mean \pm SEM (n = 4-6). *P \leq 0.05 (Student's t test or Mann-Whitney test).

Table 1. Final characterization of STZ and STZ+TUDCA mice (Student's t-test was used for Body Weight, Mann-Whitney test was adopted for the other parameters, $P \leq 0.05$). Data are mean \pm SEM (n = 4-10).

| | STZ | STZ+TUDCA |
|---------------------------------|------------------|------------------|
| Body Weight (g) | 27.35 \pm 1.08 | 27.85 \pm 0.69 |
| Perigonadal fat pad weight (g) | 0.34 \pm 0.03 | 0.45 \pm 0.09 |
| Gastrocnemius muscle weight (g) | 0.51 \pm 0.03 | 0.53 \pm 0.02 |

Figure 1.

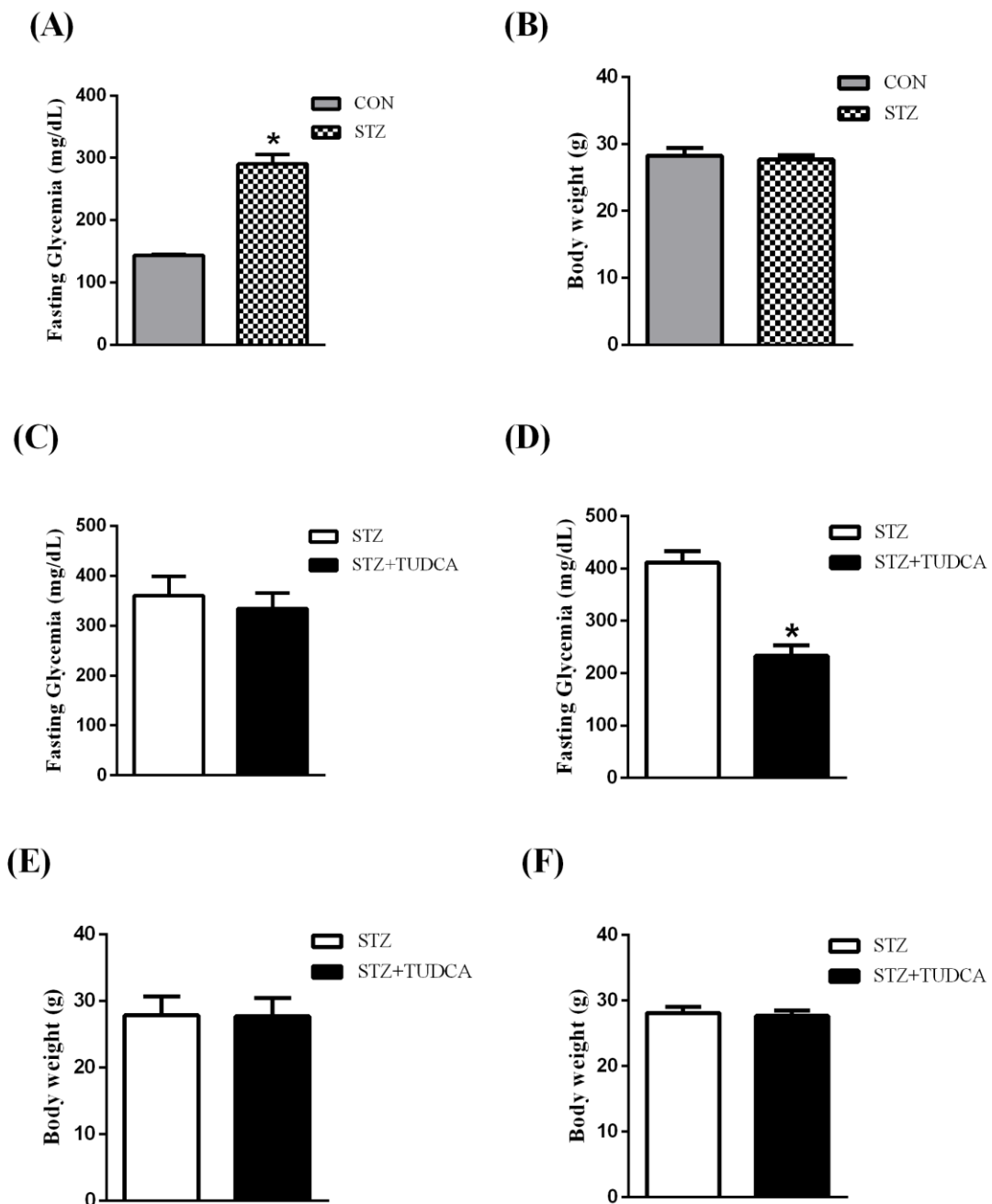


Figure 2.

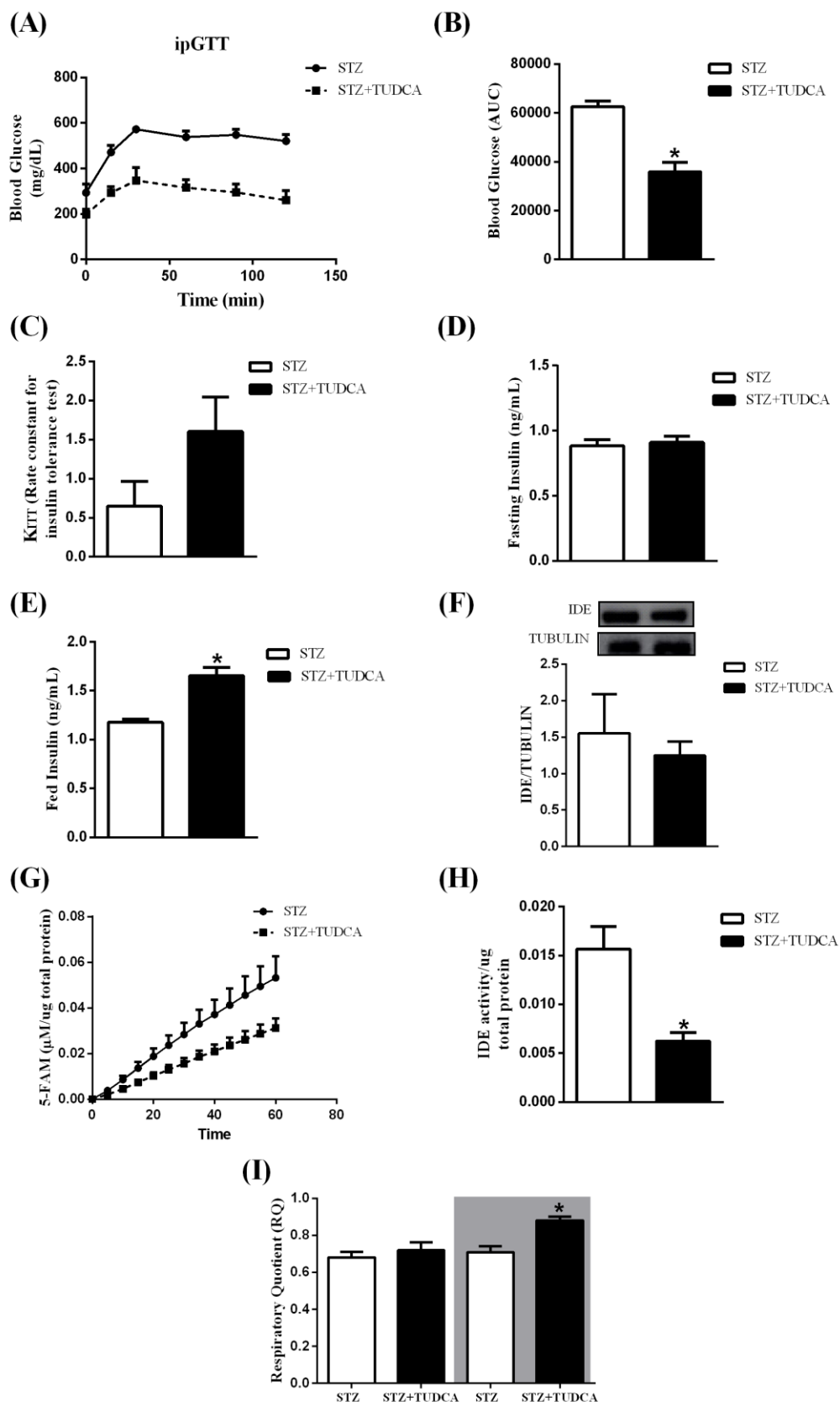
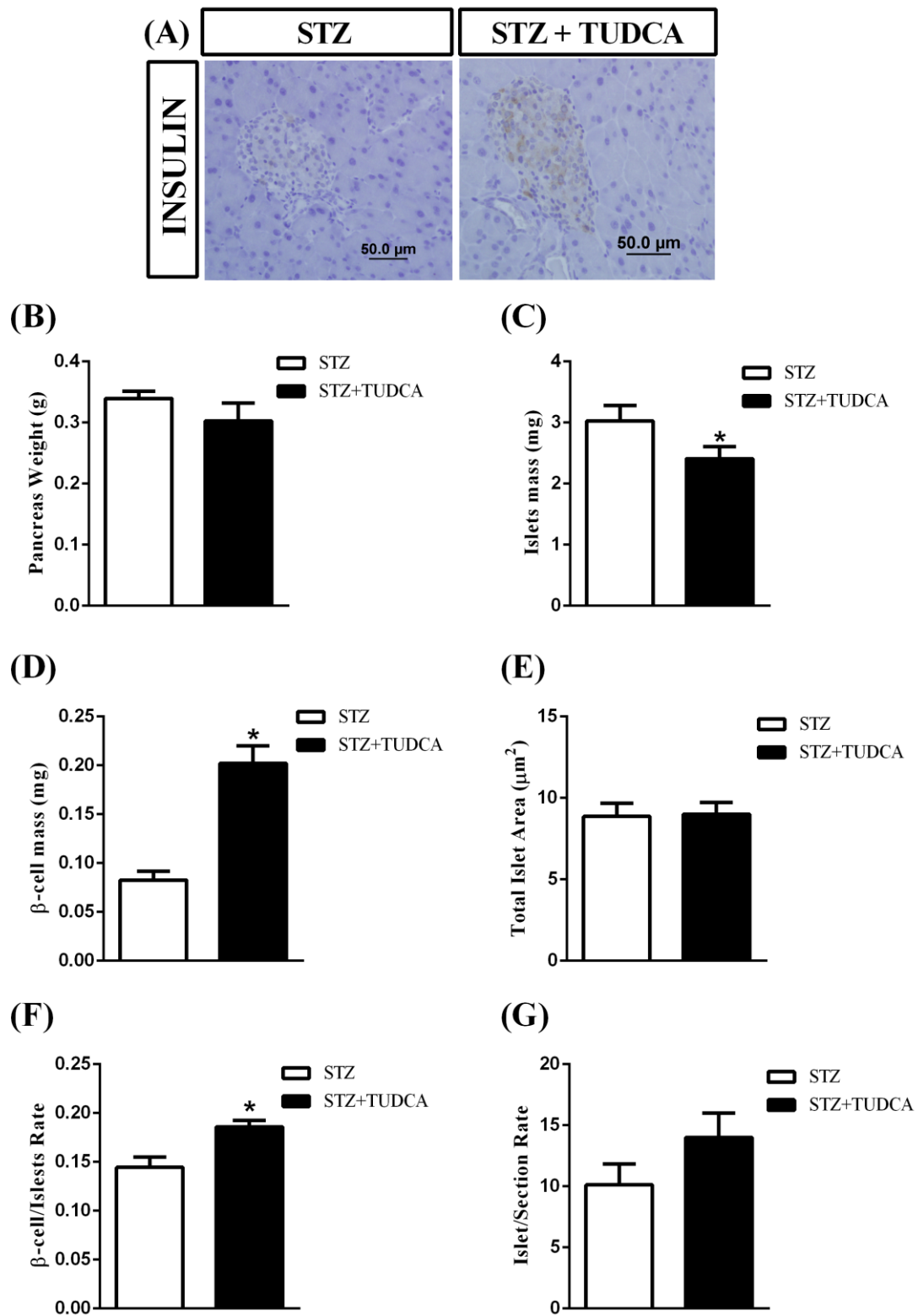


Figure 3.



ANEXO A

Certificado do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas



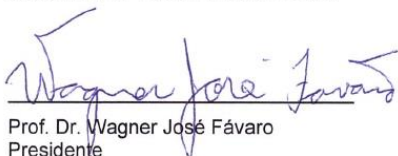
CERTIFICADO

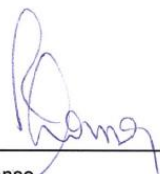
Certificamos que a proposta intitulada **Efeitos do ácido taursodesoxicólico (TUDCA) sob a homeostase glicêmica em camundongos com Diabetes Mellitus do tipo 1 induzido por estreptozotocina**, registrada com o nº **4747-1/2017**, sob a responsabilidade de **Dra. Emerielle Cristine Vanzela e Gabriela Moreira Soares**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em reunião de **07 de dezembro de 2017**.

| | |
|--|---|
| Finalidade: | <input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica |
| Vigência do projeto: | 15/02/2018-15/02/2020 |
| Vigência da autorização para manipulação animal: | 15/02/2018-15/02/2020 |
| Espécie / linhagem/ raça: | Camundongo isogênico / C57BL6/Junib |
| No. de animais: | 60 |
| Idade/Peso: | 02 meses / 26g |
| Sexo: | machos |
| Origem: | CEMIB/UNICAMP |
| Biotério onde serão mantidos os animais: | Biotério 1 - Área de Fisiologia e Biofísica, DBEF/IB/UNICAMP |

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 07 de dezembro de 2017.


Prof. Dr. Wagner José Fávaro
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

ANEXO B

**Normas da Revista Científica
Frontiers in Physiology**

Manuscript Requirements and Style Guide

Article Type

Frontiers requires authors to carefully select the appropriate article type for their manuscript, and to comply with the article-type descriptions defined in the journal's "Article Types", which can be seen from the "For Authors" menu on any Frontiers journal page. Please pay close attention to the word count limits.

Manuscript Length

Frontiers encourages its authors to closely follow the article word count lengths given in the Summary Table. The manuscript length includes only the main body of the text, footnotes and all citations within it, and excludes abstract, section titles, figure and table captions, funding statements, acknowledgments and references in the bibliography. Please indicate the number of words and the number of figures included in your manuscript on the first page.

Language Style

The default language style at Frontiers is American English. If you prefer your article to be formatted in British English, please specify this on your manuscript first page. For any questions regarding style Frontiers recommends authors to consult the Chicago Manual of Style.

Title

The title is written in title case, centred, and in 16 point bold Times New Roman font at the top of page. The title should be concise, omitting terms that are implicit and, where possible, be a statement of the main result or conclusion presented in the manuscript. Abbreviations should be avoided within the title.

Witty or creative titles are welcome, but only if relevant and within measure. Consider if a title meant to be thought-provoking might be misinterpreted as offensive or alarming. In extreme cases, the editorial office may veto a title and propose an alternative.

Authors and Affiliations

All names are listed together and separated by commas. Provide exact and correct author names as these will be indexed in official archives. Affiliations should be keyed to the author's name with superscript numbers and be listed as follows: Laboratory, Institute, Department, Organization, City, State abbreviation (USA, Canada, Australia), and Country (without detailed address information such as city zip codes or street names).

Example: Max Maximus, Department of Excellence, International University of Science, New York, NY, USA.

The Corresponding Author(s) should be marked with an asterisk. Provide the exact contact email address of the corresponding author(s) in a separate section.

Correspondence:

Dr. Max Maximus
maximus@gmail.com

If any authors wish to include a change of address, list the present address(es) below the correspondence details using a unique superscript symbol keyed to the author(s) in the author list.

Headings and Sub-headings

Except for special names (e.g. GABAergic), capitalize only the first letter of headings and subheadings. Headings and subheadings need to be defined in Times New Roman, 12, bold. You may insert up to 5 heading levels into your manuscript (not more than for example: 3.2.2.1.2 Heading title).

Abstract

As a primary goal, the abstract should render the general significance and conceptual advance of the work clearly accessible to a broad readership. In the abstract, minimize the use of abbreviations and do not cite references. The text of the abstract section

should be in 12 point normal Times New Roman. See Summary Table for abstract requirement and length according to article type.

For Clinical Trial article types, please include the Unique Identifier and the URL of the publicly accessible website on which the trial is registered.

Keywords

All article types: you may provide up to 8 keywords; at least 5 are mandatory.

Text

The body text is in 12 point normal Times New Roman. New paragraphs will be separated with a single empty line. The entire document should be single-spaced and should contain page and line numbers in order to facilitate the review process. Your manuscript should be written using either LaTeX or MS-Word.

Nomenclature

- The use of abbreviations should be kept to a minimum. Non-standard abbreviations should be avoided unless they appear at least four times, and defined upon first use in the main text. Consider also giving a list of non-standard abbreviations at the end, immediately before the Acknowledgments.
- Equations should be inserted in editable format from the equation editor.
- Gene symbols should be italicized; protein products are not italicized.
- Chemical compounds and biomolecules should be referred to using systematic nomenclature, preferably using the recommendations by IUPAC.
- We encourage the use of Standard International Units in all manuscripts.
- Life Science Identifiers (LSIDs) for ZOOBANK registered names or nomenclatural acts should be listed in the manuscript before the keywords. An LSID is represented as a uniform resource name (URN) with the following format:

urn:lsid::[:]

For more information on LSIDs please see Inclusion of Zoological Nomenclature section.

Sections

Your manuscript is organized by headings and subheadings. For Original Research Articles, Clinical Trial Articles, and Technology Reports the section headings should be those appropriate for your field and the research itself.

For Original Research Articles, it is recommended to organize your manuscript in the following sections or their equivalents for your field:

Introduction

Succinct, with no subheadings.

Material and Methods

This section may be divided by subheadings. This section should contain sufficient detail so that when read in conjunction with cited references, all procedures can be repeated. For experiments reporting results on animal or human subject research, an ethics approval statement should be included in this section (for further information, see section Materials and Data Policies)

Results

This section may be divided by subheadings. Footnotes should not be used and have to be transferred into the main text.

Discussion

This section may be divided by subheadings. Discussions should cover the key findings of the study: discuss any prior art related to the subject so to place the novelty of the discovery in the appropriate context; discuss the potential short-comings and limitations on their interpretations; discuss their integration into the current understanding of the problem and how this advances the current views; speculate on the future direction of the research and freely postulate theories that could be tested in the future.

Acknowledgements

This is a short text to acknowledge the contributions of specific colleagues, institutions, or agencies that aided the efforts of the authors.

Author Contributions Statement

The Author Contributions Statement can be up to several sentences long and should briefly describe the tasks of individual authors. Please list only 2 initials for each author, without full stops, but separated by commas (e.g. JC, JS). In the case of two authors with the same initials, please use their middle initial to differentiate between them (e.g. REW, RSW). The Author Contributions Statement should be included at the end of the manuscript before the References.

Conflict of interest Statement

A Conflict of Interest Statement needs to be included at the end of the manuscript before the references. Here, the authors need to declare whether or not the submitted work was carried out in the presence of any personal, professional or financial relationships that could potentially be construed as a conflict of interest. For more information on conflicts of interest, see our Editorial Policies.

References

All citations in the text, figures or tables must be in the reference list and vice-versa. The references should only include articles that are published or accepted. Data sets that have been deposited to an online repository should be included in the reference list, include the version and unique identifier when available. For accepted but unpublished works use "in press" instead of page numbers. Unpublished data, submitted manuscripts, or personal communications should be cited within the text only, for the article types that allow such inclusions. Personal communications should be documented by a letter of permission. Website urls should be included as footnotes. Any inclusion of verbatim text must be contained in quotation marks and clearly reference the original source.

The following formatting styles are meant as a guide, as long as the full citation is complete and clear, Frontiers referencing style will be applied during typesetting.

- **SCIENCE, ENGINEERING, and HUMANITIES: For articles submitted in the domains of SCIENCE, ENGINEERING and HUMANITIES please apply Author-Year system for in-text citations.**

Reference list: provide the names of the first six authors followed by et al. and doi when available.

In-text citations should be called according to the surname of the first author, followed by the year. For works by 2 authors include both surnames, followed by the year. For works by more than 2 authors include only the surname of the first author, followed by et al., followed by the year. For Humanities and Social Sciences articles please include page numbers in the in-text citations.

Article in a print journal:

Sondheimer, N., and Lindquist, S. (2000). Rnq1: an epigenetic modifier of protein function in yeast. *Mol. Cell.* 5, 163-172.

Article in an online journal:

Tahimic, C.G.T., Wang, Y., Bikle, D.D. (2013). Anabolic effects of IGF-1 signaling on the skeleton. *Front. Endocrinol.* 4:6. doi: 10.3389/fendo.2013.00006

Article or chapter in a book:

Sorenson, P. W., and Caprio, J. C. (1998). "Chemoreception," in *The Physiology of Fishes*, ed. D. H. Evans (Boca Raton, FL: CRC Press), 375-405.

Book:

Cowan, W. M., Jessell, T. M., and Zipursky, S. L. (1997). *Molecular and Cellular Approaches to Neural Development*. New York: Oxford University Press.

Abstract:

Hendricks, J., Applebaum, R., and Kunkel, S. (2010). A world apart? Bridging the gap between theory and applied social gerontology. *Gerontologist* 50, 284-293. Abstract retrieved from Abstracts in Social Gerontology database. (Accession No. 50360869)

Patent:

Marshall, S. P. (2000). Method and apparatus for eye tracking and monitoring pupil dilation to evaluate cognitive activity. U.S. Patent No 6,090,051. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Data:

Perdiguero P, Venturas M, Cervera MT, Gil L, Collada C. Data from: Massive sequencing of Ulms minor's transcriptome provides new molecular tools for a genus under the constant threat of Dutch elm disease. Dryad Digital Repository. (2015) <http://dx.doi.org/10.5061/dryad.ps837>

Theses and Dissertations:

Smith, J. (2008) Post-structuralist discourse relative to phenomenological pursuits in the deconstructivist arena. [dissertation/master's thesis]. [Chicago (IL)]: University of Chicago

For examples of citing other documents and general questions regarding reference style, please refer to the [Chicago Manual of Style](#).

Frontiers Science Endnote Style

Frontiers Science, Engineering and Humanities Bibstyle

- **HEALTH, PHYSICS AND MATHEMATICS: For articles submitted in the domain of HEALTH or the journal Frontiers in Physics and Frontiers in Applied Mathematics and Statistics please apply the Vancouver system for in-text citations.**

Reference list: provide the names of the first six authors followed by et al. and doi when available.

In-text citations should be numbered consecutively in order of appearance in the text – identified by Arabic numerals in the parenthesis for Health articles, and in square brackets for Physics and Mathematics articles.

Article in a print journal:

Sondheimer N, Lindquist S. Rnq1: an epigenetic modifier of protein function in yeast. *Mol Cell* (2000) 5:163-72.

Article in an online journal:

Tahimic CGT, Wang Y, Bikle DD. Anabolic effects of IGF-1 signaling on the skeleton. *Front Endocrinol* (2013) 4:6. doi: 10.3389/fendo.2013.00006

Article or chapter in a book:

Sorenson PW, Caprio JC. "Chemoreception,". In: Evans DH, editor. *The Physiology of Fishes*. Boca Raton, FL: CRC Press (1998). p. 375-405.

Book:

Cowan WM, Jessell TM, Zipursky SL. *Molecular and Cellular Approaches to Neural Development*. New York: Oxford University Press (1997). 345 p.

Abstract:

Christensen S, Oppacher F. An analysis of Koza's computational effort statistic for genetic programming. In: Foster JA, editor. *Genetic Programming. EuroGP 2002: Proceedings of the 5th European Conference on Genetic Programming; 2002 Apr 3–5; Kinsdale, Ireland*. Berlin: Springer (2002). p. 182–91.

Patent:

Pagedas AC, inventor; Ancel Surgical R&D Inc., assignee. Flexible Endoscopic Grasping and Cutting Device and Positioning Tool Assembly. United States patent US 20020103498 (2002).

Data:

Perdiguero P, Venturas M, Cervera MT, Gil L, Collada C. Data from: Massive sequencing of *Ulms minor*'s transcriptome provides new molecular tools for a genus under the constant threat of Dutch elm disease. Dryad Digital Repository. (2015) <http://dx.doi.org/10.5061/dryad.ps837>

Theses and Dissertations:

Smith, J. (2008) Post-structuralist discourse relative to phenomenological pursuits in the deconstructivist arena. [dissertation/master's thesis]. [Chicago (IL)]: University of Chicago

For examples of citing other documents and general questions regarding reference style, please refer to [Citing Medicine](#).

Frontiers Health Endnote Style

Frontiers Health and Physics Bibstyle

Disclaimer

Any necessary disclaimers which must be included in the published article should be clearly indicated in the manuscript.

Supplementary Material

Frontiers journals do not support pushing important results and information into supplementary sections. However, data that are not of primary importance to the text, or which cannot be included in the article because it is too large or the current format does not permit it (such as movies, raw data traces, power point presentations, etc.) can be uploaded during the submission procedure and will be displayed along with the published article. All supplementary files are deposited to FigShare for permanent storage, during the publication stage of the article, and receive a DOI.

The Supplementary Material can be uploaded as Data Sheet (word, excel, csv, cdx, fasta, pdf or zip files), Presentation (power point, pdf or zip files), Supplementary Image (cdx, eps, jpeg, pdf, png or tif), Supplementary Table (word, excel, csv or pdf), Audio (mp3, wav or wma) or Video (avi, divx, flv, mov, mp4, mpeg, mpg or wmv).

Supplementary material is not typeset so please ensure that all information is clearly presented, the appropriate caption is included in the file and not in the manuscript, and that the style conforms to the rest of the article. For Supplementary Material templates (LaTeX and Word) see Supplementary Material for Frontiers.

General Style Guidelines for Figures

The maximum number of figures and tables for all article types are shown in the Summary Table. Frontiers requires figures to be submitted individually, in the same order as they are referred to in the manuscript, the figures will then be automatically embedded at the end of the submitted manuscript. Kindly ensure that each table and figure is mentioned in the text and in numerical order.

For graphs, there must be a self-explanatory label (including units) along each axis. For figures with more than one panel, panels should be clearly indicated using labels (A), (B), (C), (D), etc. However, do not embed the part labels over any part of the image, these labels will be added during typesetting according to Frontiers journal style. Please note that figures which are not according to the guidelines will cause substantial delay during the production process.

Permission must be obtained for use of copyrighted material from other sources (including re-published/adapted/modified/partial figures and images from the internet). It is the responsibility of the authors to acquire the licenses, to follow any citation instructions requested by third-party rights holders, and cover any supplementary charges.

Frontiers takes concerns regarding image manipulation seriously. We request that no individual features within an image are modified (e.g. enhanced, obscured, moved, recycled, removed or added). Image processing methods (e.g. changes to the brightness, contrast or color balance) must be applied to every pixel in the image and the changes should not alter the information illustrated in the figure. Where cropped images of blots are shown in figures, a full scan of the entire original gel(s) must be submitted as part of the supplementary material. Where control images are re-used for illustrative purposes, this must be clearly declared in the figure legend. Image grouping and splicing must be clearly stated in the manuscript and the figure text.

For additional information, please see our Editorial Policies: 3.5 Image Manipulation.

General Style Guidelines for Tables

Tables should be inserted at the end of the manuscript. If you use a word processor, build your table in word. If you use a LaTeX processor, build your table in LaTeX. An empty line should be left before and after the table.

Please note that large tables covering several pages cannot be included in the final PDF for formatting reasons. These tables will be published as supplementary material on the online article abstract page at the time of acceptance. The author will be notified during the typesetting of the final article if this is the case. A link in the final PDF will direct to the online material.

For additional information, please see our Editorial Policies: 3.5 Image Manipulation.

Figure and Table Requirements

Legends

Figure and table legends are required to have the same font as the main text (12 point normal Times New Roman, single spaced). Legends should be preceded by the appropriate label, for example "Figure 1" or "Table 4". Figure legends should be placed at the end of the manuscript (for supplementary images you must include the caption with the figure, uploaded as a separate file). Table legends must be placed immediately before the table. Please use only a single paragraph for the legend. Figure panels are referred to by bold capital letters in brackets: (A), (B), (C), (D), etc.

Image Size

Figure images should be prepared with the PDF layout in mind, individual figures should not be longer than one page and with a width that corresponds to 1 column or 2 columns.

- **All articles are prepared using the 2 column layout:** 2 column articles can contain images 85 mm or 180 mm wide.

Format

The following formats are accepted:

TIFF (.tif) TIFF files should be saved using LZW compression or any other non-lossy compression method. JPEG (.jpg)

EPS (.eps) EPS files can be uploaded upon acceptance

Color Image Mode

Images must be submitted in the color mode RGB.

Resolution Requirements

All images must be uploaded separately in the submission procedure and have a resolution of **300 dpi at final size**. Check the resolution of your figure by enlarging it to 150%. If the resolution is too low, the image will appear blurry, jagged or have a stair-stepped effect.

Please note saving a figure directly as an image file (JPEG, TIF) can greatly affect the resolution of your image. To avoid this, one option is to export the file as PDF, then convert into TIFF or EPS using a graphics software. EPS files can be uploaded upon acceptance.

Chemical Structures

Chemical structures should be prepared using ChemDraw or a similar program according to the guidelines given below:

Drawing settings: chain angle, 120° bond spacing, 18% of width; fixed length, 14.4 pt; bold width, 2.0 pt; line width, 0.6 pt; margin width 1.6 pt; hash spacing 2.5 pt. Scale 100% Atom Label settings: font, Arial; size, 8 pt.

Assign all chemical compounds a bold, Arabic numeral in the order in which the compounds are presented in the manuscript text. Figures containing chemical structures should be submitted in a size appropriate for incorporation into the manuscript.

Legibility

Figures must be legible. Check the following:

- The smallest visible text is no less than 8 points in height, when viewed at actual size.
- Solid lines are not broken up.
- Image areas are not pixilated or stair stepped.
- Text is legible and of high quality.
- Any lines in the graphic are no smaller than 2 points width.

Funding disclosure

Details of all funding sources must be provided in the funding section of the manuscript including grant numbers, if applicable. All Frontiers articles are published with open access under the CC-BY Creative Commons attribution license. Articles published with Frontiers automatically fulfil or exceed the requirements for open access mandated by many institutions and funding bodies, including the National Institutes of Health, the Medical Research Council, Research Councils UK, and the Wellcome Trust. Frontiers submits funding data to the Open Funder Registry which is a funder identification service from CrossRef resulting from collaboration between scholarly publishers and funding agencies.

Availability of Materials

Authors are strongly encouraged to make all materials used to conduct their research available to other researchers. Research materials necessary to enable the reproduction of an experiment should be clearly indicated in the Materials and Methods section. Relevant materials such as protocols, analytic methods, and study material should preferably be uploaded to an online repository providing a global persistent link/identifier. If this is not possible, authors are strongly encouraged to make this material available upon request to interested researchers, and this should be stated in the manuscript.

Availability of Data

Frontiers requires that authors make all data relevant to the conclusions of the manuscript available to editors and reviewers during peer-review to enable complete and objective evaluation of the work described.

We strongly encourage authors to make the raw data supporting the conclusions of the manuscript available in publicly accessible repositories. To comply with best practice in their field of research, authors are required to make certain types of data available to readers at time of publication in specific stable, community-supported repositories such as those listed below. Authors are encouraged to contact our data availability office at datapolicy@frontiersin.org prior to submission with any queries concerning data reporting.

Statistics

Frontiers requires that all statements concerning quantitative differences should be based on quantitative data and statistical testing. For example, if a quantitative statement is made regarding the abundance of a certain protein based on a western blot, we request that the blot be scanned and the abundance assessed quantitatively using the correct analytic software (e.g. ImageJ) and statistics in order to support that statement.

Statistics should/must be applied for independent experiments. The number of independent samples and the deviation parameters (e.g. Standard Error of the Mean, Standard Deviation, Confidence Intervals) should be clearly stated in the Methods or the Figure legends. In general, technical replicates within a single experiment are not considered to be independent samples. Where multiple comparisons are employed (e.g. microarray data or Genome-wide association studies), any analysis should correct for false positive results. Descriptions of statistical procedures should include the software and analysis used, and must be sufficiently detailed to be reproduced.

Image Manipulation

Frontiers takes concerns regarding image manipulation seriously. We request that no individual features within an image are modified (eg. enhanced, obscured, moved, recycled, removed or added). Image processing methods (e.g. changes to the brightness,

contrast or color balance) must be applied to every pixel in the image and the changes should not alter the information illustrated in the figure. Where cropped images of blots are shown in figures, a full scan of the entire original gel(s) must be submitted as part of the supplementary material. Where control images are re-used for illustrative purposes, this must be clearly declared in the figure legend. If any form of image processing is legitimately required for the interpretation of the data, the software and the enhancement technique must be declared in the methods section of the manuscript. Image grouping and splicing must be clearly stated in the manuscript and the figure text. Any concerns raised over undeclared image modifications will be investigated and the authors will be asked to provide the original images.

Bioethics

All research submitted to Frontiers for consideration must have been conducted in accordance with Frontiers guidelines on study ethics. In accordance with COPE guidelines, Frontiers reserves the right to reject any manuscript that editors believe does not uphold high ethical standards, even if authors have obtained ethical approval or if ethical approval is not required.

Studies involving animal subjects

All research involving regulated animals (i.e. all live vertebrates and higher invertebrates) must be performed in accordance with relevant institutional and national guidelines and regulations. Frontiers follows International Association of Veterinary Editors guidelines for publication of studies including animal research. Approval of research involving regulated animals must be obtained from the relevant institutional review board or ethics committee prior to commencing the study. Confirmation of this approval is required upon submission of a manuscript to Frontiers; authors must provide a statement identifying the full name of the ethics committee that approved the study. For most article types, this statement should appear in the Materials and Methods section. An example ethics statement:

This study was carried out in accordance with the principles of the Basel Declaration and recommendations of [name of guidelines], [name of committee]. The protocol was approved by the [name of committee].

Should the study be exempt from ethics approval, authors need to clearly state the reasons in the cover letter and manuscript. Studies involving privately owned animals should demonstrate the best practice veterinary care and confirm that informed consent has been granted by the owner/s, or the legal representative of the owner/s. Frontiers supports and encourages authors to follow the ARRIVE guidelines for the design, analysis and reporting of scientific research.

Humane Endpoints

All manuscripts describing studies where death is an endpoint will be subject to additional ethical considerations. Frontiers reserves the right to reject any manuscripts lacking in appropriate justification.

Corrections

Frontiers recognizes our responsibility to correct errors in previously published articles. If it is necessary to communicate important, scientifically relevant errors or missing information, and compelling evidence can be shown that a major claim of the original article was incorrect, a Correction should be submitted detailing the reason(s) for and location(s) of the change(s) needed in the cover letter. Corrections can be submitted if a small portion of an otherwise reliable publication proves to be misleading, e.g. an error in a figure that does not alter conclusions OR an error in statistical data not altering conclusions OR mislabeled figures OR wrong slide of microscopy provided, or if the author / contributor list is incorrect when a deserving author has been omitted or somebody who does not meet authorship criteria has been included.

The title of the submission should have the following format: "Corrigendum: Title of original article". It is advised to use the corrigendum Word and LaTeX templates.

If the error was introduced during the publishing process, the Frontiers Production Office should be contacted.