UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Nutrição Experimental

Andrea Bonvini

Efeitos dos aminoácidos de cadeia ramificada na resposta inflamatória induzida por lipopolissacarídeo em macrófagos de linhagem celular RAW 264.7

São Paulo
2019

Andrea Bonvini

Efeitos dos aminoácidos de cadeia ramificada na resposta inflamatória induzida por lipopolissacarídeo em macrófagos de linhagem celular RAW 264.7

Versão Original

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutora em Ciências.

Orientador: Prof. Assoc. Julio O. Tirapegui Toledo
Coorientador: Prof. Assoc. Marcelo Macedo Rogero

São Paulo
2019

Nome: Bonvini, A.

Título: Efeitos dos aminoácidos de cadeia ramificada na resposta inflamatória induzida por lipopolissacarídeo em macrófagos de linhagem celular RAW 264.7

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutora em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

“Se eu lhe perguntar o que você quer da vida e você disser algo como ‘Quero ser feliz, ter uma família maravilhosa e um emprego de que eu goste’, essa é uma resposta tão comum e previsível que não significa nada. [...] Satisfação e propósito genuínos, sérios e duradouros devem ser conquistados pela maneira como conduzimos as nossas batalhas. [...] O que determina o sucesso não é ‘De qual prazer você quer desfrutar?’. A questão relevante é: ‘Qual dor você está disposto a suportar?’. O caminho da felicidade é cheio de obstáculos e humilhações.”

Mark Manson

DEDICATÓRIA

Aos meus pais,
Nerci Leoni Machado e
Bruno Alexandre Bonvini
pelo amor incondicional e pelo empenho genuíno na minha felicidade. Pelo meu caráter e pelos meus valores.

Aos meus padrinhos
Lucio Yamashita e
Maria Cristina Yamashita
por todo apoio, carinho e motivação.

DEDICATÓRIA

Ao meu orientador
Prof. Assoc. Julio Tirapegui
por ter acreditado em mim e ter me concedido essa incrível oportunidade.

Ao meu coorientador
Prof. Assoc. Marcelo Macedo Rogero
por estar sempre presente, por todo apoio, direcionamento e motivação. Foi um prazer trabalhar o seu lado

Ao
Prof. Assoc. José Luiz Guerra
que por meio do seu olhar atencioso e tamanha generosidade me encaminhou à vida acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, **à Deus** e ao **meu mentor** pelo direcionamento, pela força e pela proteção para seguir sempre em frente.

Ao **meu país**. Diante de tanta desigualdade, me sinto privilegiada pelas oportunidades que recebi. Espero ser digna de todas elas e que eu possa retribuir esse incentivo da melhor forma possível. Que esse trabalho tenha uma verdadeira contribuição para a ciência e para a nossa nação. Desejo um Brasil melhor para TODOS.

Aos meus pais**, Bruno Alexandre Bonvini** e **Nerci Leoni Machado**, que me deram o maior presente que se pode ganhar: a vida. Agradeço por terem me ensinado a ter disciplina, perseverança e a seguir o caminho da honestidade. Reconheço, inclusive, o esforço em tentar me ensinar a ter paciência, mas essa, ainda, levarei bastante tempo para aprender.

À minha amiga, mãe postiça e professora, **Mariana Rezende Gomes**, que me acolheu no laboratório e me ensinou a ser uma pessoa melhor. Sou grata todos os dias por ter te conhecido e por fazer parte da sua vida. Se sou seu braço direito e esquerdo, como você diz, você é a força e a motivação por trás deles.

Às colegas de laboratório e amigas, **Audrey Yule Coqueiro**, **Raquel Raizel** e **Jackeline Beltran**, não apenas pela parceria acadêmica que me proporcionou enorme crescimento e aprendizado, mas, principalmente, pelo apoio incondicional diante das adversidades enfrentadas durante a realização deste trabalho. Agradeço todos os momentos memoráveis que vivemos juntas e tenho certeza que muitos outros virão.

Ao Prof. Dr. **Ricardo Ambrósio Fock** por ter aberto as portas do seu laboratório para mim e ter me auxiliado durante toda a execução desse trabalho.

À Prof. Dr. **Primavera Borelli** pelos ensinamentos e pelo auxílio no planejamento e na execução das análises.

Ao Prof. Dr. **Fernando Salvador Moreno** que me acompanhou desde a minha chegada ao departamento e, com muito bom humor, sempre me motivou a continuar.

Aos colegas do GENUIN, **Bruna Quintanilha, Vinícius Cooper, Renata Juliana, Bruna Zavarize, Graziela Biude, Tatiane Fujii, Marina Norde, Renata Alves, Daniel Barreto, Flávia De Conti, Monica Yamada** e **Ângela Ferreira**, pelas reuniões científicas sempre muito produtivas e pelos momentos de divertimento e descontração.

Aos colegas do **Laboratório de Hematologia Clínica**, que me auxiliaram na execução dos experimentos.

Aos colegas do **Laboratório de Imunoendocrinologia**, pelo auxílio no treinamento das técnicas de análise, na execução dos experimentos e no tratamento dos dados.

A todos os **professores** que excelentemente ministraram as disciplinas que contribuíram para o meu aperfeiçoamento e formação.

Aos funcionários do **Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental** pela concessão do laboratório e dos equipamentos

Aos funcionários do **Departamento de Análises Clínicas**, também, pela concessão do laboratório e dos equipamentos.

À **FAPESP** pela concessão da bolsa de pesquisa 2016/11360-6, a qual me amparou financeiramente durante a execução desse trabalho e me proporcionou experiências nacionais e internacionais excepcionais, onde pude apresentar os meus resultados e aprender com os mais renomados nomes da comunidade científica.

RESUMO

BONVINI, A. **Efeitos dos aminoácidos de cadeia ramificada na resposta inflamatória induzida por lipopolissacarídeo em macrófagos de linhagem celular RAW 264.7**. 2019. 87 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Os aminoácidos de cadeia ramificada (ACR) são considerados indispensáveis, pois não podem ser sintetizados endogenamente, sendo facilmente obtidos pela dieta. Entretanto, em determinadas condições clínicas, tanto a ingestão quando a absorção desses aminoácidos pode estar comprometida, levando ao estado hipercatabólico e prejudicando a função imune. O papel imunomodulador dos ACR tem sido relacionado com a melhora no balanço nitrogenado e o aumento da síntese e proliferação de células imunes, bem como, da síntese de mediadores inflamatórios. Entretanto, o mecanismo pelo qual os ACR exercem essas funções supracitadas ainda não é claro na literatura científica. Desta forma, esse trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da suplementação com ACR sobre os parâmetros inflamatórios e moleculares em macrófagos RAW 264.7 estimulados com lipopolissacarídeo (LPS). As culturas celulares foram distribuídas em cinco grupos: CTL - sem suplementação com ACR; LEU - suplementado com leucina (2 mmol/L); ISO - suplementado com isoleucina (2mmol/L); VAL - suplementado com valina (2 mmol/L) e LIV - suplementado com leucina (2 mmol/L), isoleucina (2 mmol/L) e valina (2 mmol/L). O estado inflamatório foi induzido pela adição de LPS (1 µg/mL) ao meio de cultura, seguindo quatro protocolos de tratamento: PT – pré-tratamento; TA – tratamento agudo; TC – tratamento crônico e TT – tratamento tardio. O ensaio de viabilidade celular foi realizado pelo teste MTT e a dosagem de óxido nítrico (NO) pela reação de Griess. As citocinas pró e anti-inflamatórias, e a prostaglandina E2 (PGE2) foram analisadas pelo método de ELISA. Para a avaliação dos parâmetros moleculares foi utilizado o método de *western blotting*. Houve aumento da viabilidade celular em todos os grupos suplementados em relação ao grupo controle no TA, no TC e no TT. Acerca da síntese de NO, a suplementação com ACR foi capaz de aumentar esse parâmetro em três dos quatro tratamentos propostos (PT, TA e TC). Em relação à síntese de citocinas pró e anti-inflamatórias, o PT e o TC foram mais eficazes em aumentar esse parâmetro em comparação aos outros tratamentos. Não houve diferença entre os grupos em relação à capacidade de síntese de PGE2 e à fosforilação de proteínas intracelulares. A partir dos resultados obtidos é possível concluir que os ACR contribuem significativamente para a viabilidade celular, bem como para a síntese de mediadores pró e anti-inflamatórios, sendo que o protocolo de suplementação se apresenta como fator determinante para obtenção desses resultados. Apesar da literatura científica atribuir grande parte dos efeitos imunomodulatórios à leucina, os resultados obtidos nesse estudo atribuem relevante potencial imunomodulador à isoleucina, abrindo espaço para um importante tema de estudo.

Palavras-chave: Aminoácidos de cadeia ramificada (ACR). Lipopolissacarídeo (LPS). Macrófagos. Inflamação.

ABSTRACT

BONVINI, A. **Effects of branched-chain amino acids in the inflammatory response induced by lipopolysaccharide in a macrophage cell line RAW 264.7**. 2019. 87 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Branched chain amino acids (BCAA) are considered indispensable, since they cannot be endogenously synthesized, being easily obtained by diet. However, in certain clinical conditions, both the intake and absorption of these amino acids may be compromised, leading to the hypercatabolic state and impairing the immune function. The immunomodulatory role of BCAA has been associated with the nitrogen balance improvement and the increase of production and proliferation of immune cells, as well as the synthesis of inflammatory mediators. However, the mechanisms by which BCAA modulate the immune system have not yet been completely elucidated. In this sense, this study aimed to evaluate the effects of BCAA supplementation on intracellular mechanisms and inflammatory parameters in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7 macrophages. Cell cultures were distributed into five groups: CTL - without ACR supplementation; LEU - supplemented with leucine (2 mmol/L); ISO - supplemented with isoleucine (2mmol / L); VAL - supplemented with valine (2 mmol/L) and LIV - supplemented with leucine (2 mmol/L), isoleucine (2 mmol/L) and valine (2 mmol/L). The inflammatory state was induced by the addition of LPS (1 µg/ml) to the culture medium, following four treatment protocols: PT - pre-treatment; TA - acute treatment; TC - chronic treatment and TT - late treatment. The cell viability assay was performed by the MTT test and the nitric oxide (NO) dosage by the Griess reaction. Pro- and anti-inflammatory cytokines, and prostaglandin E2 (PGE2) were analyzed by ELISA. For the evaluation of the molecular parameters, the western blotting method was used. There was an increase in cell viability in all supplemented groups in relation to the control group in the TA, TC and TT treatments. Regarding NO synthesis, BCAA supplementation was able to increase NO production in three of the four proposed treatments (PT, TA and TC). In relation to the production of pro- and anti-inflammatory cytokines, PT and CT were more effective in increasing this parameter, compared to the other treatments. There was no difference between groups in relation to PGE2 production and intracellular protein phosphorylation. From the obtained results it is possible to conclude that the BCAA significantly contributed to the cell viability, as well as, for the production of pro and anti-inflammatory mediators, and the supplementation protocol presents as determinant factor to obtain these results. Although the scientific literature attributed a large part of the immunomodulatory effects to leucine, the results obtained in this study attribute relevant immunomodulatory potential to isoleucine, opening space for an important study topic.

Key words: Branched-chain amino acids (BCAA). Lipopolysaccharide (LPS). Macrophages. Inflammation

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1.	Estrutura dos aminoácidos de cadeia ramificada.....	**21**
Figura 2.	Transporte dos aminoácidos de cadeia ramificada.....	**23**
Figura 3.	Oxidação dos aminoácidos de cadeia ramificada.....	**25**
Figura 4.	Mecanismos de ativação da via da mTOR por ACR.....	**28**
Figura 5.	Estrutura química geral do LPS em bactérias Gram-negativas...	**31**
Figura 6.	Via de sinalização do NF-κB.....	**32**
Figura 7.	Mecanismos de integração da via da mTOR e da via do NF-κB.	**34**
Figura 8.	Cronograma de expansão das células Raw 264.7.....	**39**
Figura 9.	Distribuição dos grupos experimentais.....	**42**
Figura 10.	Sincronização do ciclo celular das células RAW 264.7.....	**53**
Figura 11.	Viabilidade das células RAW 264.7 após tratamento com SFB..	**54**
Figura 12.	Morfologia das células RAW 264.7 após estímulo com LPS.....	**55**
Figura 13.	Concentração de LDH após estímulo com LPS.....	**55**
Figura 14.	Viabilidade das células RAW 264.7 pelo ensaio de MTT.....	**57**
Figura 15.	Síntese de NO pelas células RAW 264.7.....	**58**
Figura 16.	Síntese de citocinas pelas células RAW 264.7 no PT.....	**59**
Figura 17.	Síntese de citocinas pelas células RAW 264.7 no TA.....	**60**
Figura 18.	Síntese de citocinas pelas células RAW 264.7 no TC.....	**61**
Figura 19.	Síntese de citocinas pelas células RAW 264.7 no TT.....	**62**
Figura 20.	Síntese de PGE2 pelas células RAW 264.7.....	**63**
Figura 21.	Ativação das proteínas intracelulares no PT.....	**64**
Figura 22.	Ativação das proteínas intracelulares no TC.....	**65**

LISTA DE TABELAS

Pág.

Tabela 1. Protocolo do pré-tratamento com ACR e LPS..... **43**

Tabela 2. Protocolo do tratamento agudo com ACR e LPS..... **44**

Tabela 3. Protocolo do tratamento crônico com ACR e LPS..... **45**

Tabela 4. Protocolo do tratamento tardio com ACR e LPS..... **46**

LISTA DE ABREVIATURAS

4E-BP1	Proteína de ligação 4E-1
ACR	Aminoácidos de cadeia ramificada
Akt	Proteína quinase B
ASCT	Transportador preferencial de alanina-serina-cisteína Na^+-dependente
ATCR	Aminotransferase de aminoácidos de cadeia ramificada
ATP	Trifosfato de adenosina
CTH	Células tronco hematopoiéticas
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
DMEM	*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
DαCCR	Desidrogenase de α-cetoácidos de cadeia ramificada
E1	Tiamina-pirofosfato
E2	Dihidrolipoamida aciltransferase
E3	Dihidrolipoamida desidrogenase
eIF4E	Fator de iniciação eucariótico 4E
ERO	Espécies reativas do oxigênio
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
HMB	β-hidroxi-β-metilbutirato
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IKK	Quinase inibidora do IκB
IL-10	Interleucina-10
IL-6	Interleucina-6
iNOS	Enzima óxido nítrico sintase induzível
IRAK	Quinase associada ao receptor de IL-1
KIC	α-cetoisocaproato
KICD	α-cetoisocaproato dioxigenase
KIV	α-cetoisovalerato
KMV	α-ceto-β-metilvalerato
LAT	Transportadores de aminoácidos tipo L
LBP	Proteína ligadora de LPS
LPS	Lipopolissacarídeo (s)
mTOR	Proteína alvo da rapamicina em mamíferos

NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NF-κB	Fator de transcrição nuclear kappa B
NK	Células *natural killer*
NO	Óxido nítrico
NPT	Nutrição parenteral total
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
RRP	Receptores de reconhecimento de padrões
S6K	Quinase ribissomal S6
SLC	Transportadores de soluto
TLR	Receptor tipo Toll
TN	Terapia nutricional
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TSC	Complexo de esclerose tuberosa
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	**16**
2. JUSTIFICATIVA	**18**
3. REVISÃO DA LITERATURA	**21**
3.1. Aminoácidos de Cadeia Ramificada	**21**
3.1.1. Transporte dos Aminoácidos de Cadeia Ramificada	**21**
3.1.2. Oxidação dos Aminoácidos de Cadeia Ramificada	**23**
3.1.2.1. Oxidação dos Aminoácidos de Cadeia Ramificada nas células imunes	**25**
3.1.3. Mecanismos de sinalização intracelular dos Aminoácidos de Cadeia Ramificada: a via da mTOR	**26**
3.2. O Sistema Imune	**29**
3.2.1. Mecanismos de ativação de macrófagos: LPS e TLR-4	**30**
3.2.2. A mTOR e a via do NF-κB	**32**
3.3. Aminoácidos de Cadeia Ramificada na terapia nutricional e na imunomodulação	**34**
4. OBJETIVOS	**37**
5. MATERIAL E MÉTODOS	**38**
5.1. Obtenção das células RAW 264.7 e do meio de cultivo celular	**38**
5.2. Procedimentos de cultivo e expansão das células RAW 264.7	**38**
5.3. Padronização das análises	**39**
5.3.1. Sincronização do ciclo celular e avaliação da viabilidade celular	**39**
5.3.2. Avaliação das concentrações de LPS	**40**
5.4. Distribuição dos grupos experimentais	**41**
5.5. Avaliação dos parâmetros inflamatórios	**42**
5.5.1. Protocolo de suplementação com ACR e de ativação com LPS	**42**
5.5.2. Ensaio MTT	**47**
5.5.3. Dosagem de óxido nítrico pela Reação de Griess	**47**
5.5.4. Dosagem de citocinas pró e anti-inflamatórias	**48**
5.5.5. Dosagem de prostaglandina E2	**49**
5.6. Avaliação dos mecanismos intracelulares	**50**
5.6.1. Protocolo de suplementação e de ativação das células com LPS	**50**

5.6.2. Western blotting..... 50
5.6.2.1. Preparo do gel de poliacrilamida..... 50
5.6.2.2. Preparo de lisado de proteínas para SDS-PAGE..... 50
5.6.2.3. Transferência de proteínas do gel para a membrana de difluoreto de polivinilideno..... 51
5.6.2.4. Sondagens das proteínas com anticorpos..... 51
5.6.2.5. Revelação com sistema quimioluminescente..... 51
6. RESULTADOS..... 53
6.1. Padronização das análises..... 53
6.1.1. Sincronização do ciclo celular e avaliação da viabilidade celular..... 53
6.1.2. Avaliação das concentrações de LPS..... 54
6.2. Avaliação dos parâmetros inflamatórios..... 56
6.2.1. Ensaio MTT..... 56
6.2.2. Dosagem de óxido nítrico pela Reação de Griess..... 57
6.2.3. Dosagem de citocinas pró e anti-inflamatórias..... 59
6.2.4. Dosagem de prostaglandina E2..... 62
6.3. Avaliação dos mecanismos intracelulares..... 63
6.3.1. Western blotting..... 63
7. DISCUSSÃO..... 66
8. CONCLUSÃO..... 72
REFERÊNCIAS..... 73

1. INTRODUÇÃO

A suplementação com aminoácidos de cadeia ramificada (ACR) – leucina, isoleucina e valina – é uma das principais estratégias utilizadas na prática clínica para a recuperação do estado nutricional e da imunocompetência de pacientes críticos, sobretudo na sepse, no câncer e nas hepatopatias.[1–14]

Estudos demonstram que os ACR têm ativa participação no metabolismo energético, pois atuam como precursores de intermediários do ciclo dos ácidos tricarboxílicos,[15] e no aumento da síntese proteica, devido ao papel chave desempenhado, especialmente pela leucina, na ativação intracelular da proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), que por sua vez, controla os processos de crescimento e de proliferação celular.

Em relação à função imune, os ACR fornecem substratos para a síntese de citocinas e imunoglobulinas, favorecendo a proliferação de linfócitos, a atividade das células *natural killer* e a função fagocítica de neutrófilos.[1–4,6,16–18] Ademais, esses aminoácidos podem servir como precursores na síntese de glutamina, um aminoácido condicionalmente indispensável, requerido por células imunes para o metabolismo energético e para a produção de citocinas, e que apresenta concentrações plasmáticas reduzidas em determinadas situações clinicas e catabólicas, como sepse, trauma e queimaduras.[19]

Além de atuarem como substratos energéticos e precursores de outros aminoácidos, um emergente papel imunomodulador tem sido atribuído aos ACR, devido a interação das vias de sinalização intracelular da mTOR e do fator de transcrição nuclear kB (NF-kB),[15,20–25] envolvido na transcrição de genes que controlam a síntese de diversos mediadores pró-inflamatórios, como o óxido nítrico (NO), as interleucinas (IL) e o fator de necrose tumoral (TNF)-α.[26]

Todavia, os mecanismos pelos quais os ACR modulam essas vias intracelulares e, consequentemente, impactam na síntese de mediadores inflamatórios ainda não estão completamente esclarecidos e muitos resultados conflitantes são encontrados na literatura científica.[27]

Dessa forma, a exploração e a elucidação dos possíveis mecanismos de ação dos ACR nos processos inflamatórios são cruciais para a evolução do tratamento de pacientes críticos, proporcionando expressiva mudança nos

resultados clínicos, bem como oferecendo uma melhora na qualidade de vida pré e pós-tratamento.

2. JUSTIFICATIVA

A desnutrição permanece como um dos principais desafios enfrentados pelos sistemas de saúde, devido à sua direta relação com o desenvolvimento de doenças, em particular, as de origem infecciosa.[28,29] Nessa condição nutricional, a maior incidência de infecções decorre do estado de hipercatabolismo, caracterizado pelo alto dispêndio energético e acentuado catabolismo proteico, e da imunodeficiência, na qual há o comprometimento da imunidade mediada por células e a atrofia dos órgãos linfoides primários e secundários[30,31]

É importante ressaltar que o estado de imunodeficiência aumenta consideravelmente o risco de morte, pois pode promover a resposta desregulada do organismo frente à infecção e a disfunção orgânica, sendo esse quadro clínico definido como sepse,[32–34] responsável pela morte de 5 milhões de pacientes ao ano no mundo e presente em 25,2% dos pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) no Brasil.[35]

Não obstante, o Brasil vivência um expressivo processo de transição nutricional, no qual, a obesidade consolidou-se como o agravo nutricional mais frequentemente associado ao desenvolvimento de doenças crônicas não-transmissíveis (DCNT),[36] que por sua vez, também estabelecem uma estreita relação com a sepse, sendo a pneumonia (42%), o diabetes mellitus (20%), a hipertensão arterial sistêmica (16,3%) e as neoplasias (16,3%) as doenças mais frequentemente encontradas nos pacientes com sepse.[37]

Diante do exposto, é possível perceber que o estado nutricional e o acometimento de doenças estabelecem uma dinâmica e sinérgica relação, na qual, o estado nutricional inadequado é um fator predisponente para o acometimento da doença, enquanto a doença impacta negativamente no estado nutricional.

Nesse contexto, a terapia nutricional (TN) apresenta-se como um dos principais pilares para a recuperação da função imune e para a manutenção do estado nutricional de pacientes críticos, viabilizando a dieta por vias não convencionais - enteral e parenteral, e fornecendo a quantidade adequada de nutrientes para suprir a demanda energética que o indivíduo necessita.[38,39]

Adicionalmente, a TN possibilita a combinação precisa de nutrientes com potencial imunomodulador, que, por meio de efeitos farmacológicos, atuarão no controle da resposta inflamatória à nível intestinal e sistêmico.[40–42]

Apesar dos efeitos pró ou anti-inflamatórios de determinados imunonutrientes já terem sido amplamente descritos na literatura científica,[43,44] no tocante ao papel desempenhado pelos ACR na modulação da inflamação, os resultados ainda são escassos e muitas vezes conflitantes, especialmente no contexto da obesidade.[45–52]

Embora concentrações plasmáticas elevadas de ACR em pacientes com sepse tenham sido associadas à redução do risco de mortalidade e à melhora da função hepática e do metabolismo energético[1], estudos recentes têm demonstrado que em indivíduos obesos, altas concentrações circulantes de ACR e de seus respectivos metabólitos estão correlacionadas a alterações metabólicas, à resistência à ação da insulina e à pré-disposição ao DM2.[25,49,53]

Considerando que o denominador comum entre a sepse, a obesidade e a resistência à ação da insulina são os processos inflamatórios desencadeados por lipopolissacarídeo (LPS),[54–56] esses prognósticos antagônicos associados as elevadas concentrações de ACR evidenciam uma importante lacuna a ser preenchida na literatura científica.

À vista disso, estudos *in vitro* têm investigado os efeitos da suplementação com altas doses de ACR sobre a síntese de mediadores inflamatórios em células imunes estimuladas com LPS, no intuito de esclarecer os possíveis mecanismos envolvidos nessa correlação.[25,53,57]

Alguns estudos em particular podem ser destacados: Zhenyukh et al.[25] observaram aumento da síntese de mediadores pró-inflamatórios, como o radical superóxido (O_2^-), a IL-6 e o TNF-α, em células mononucleares do sangue periférico humano estimuladas com LPS (1 µg/mL) e tratadas com 10 mmol/L de ACR. Em contrapartida, Lee et al.[57] demonstraram que em macrófagos de linhagem RAW 264.7 estimulados com LPS (1 µg/mL), a suplementação com doses similares de ACR (12,5 mmol/L) não influenciou a síntese de mediadores inflamatórios, como NO e IL-6. Já no estudo de De Simone et al.,[58] a suplementação com 10 mmol/L no meio de cultivo celular de células da micróglia estimuladas com LPS (10 ng/mL) apresentou efeitos anti-inflamatórios,

diminuindo a síntese de IL-1β, de TNF-α e de NO e aumentando a síntese de IL-10.

Ainda que os estudos supracitados apresentem determinado grau de similaridade em relação ao modelo experimental e à dose de suplementação com ACR, os resultados obtidos são visivelmente conflitantes.

Visto que os ensaios *in vitro* objetivam a avaliação do comportamento molecular, bioquímico, celular e histoquímico de tecidos normais ou patológicos a partir da mimetização de situações clínicas,[59] uma hipótese plausível que pode explicar essa divergência nos dados encontrados na literatura científica está relacionada ao delineamento do protocolo de tratamento, isto é, ao momento no qual a suplementação com ACR foi adicionada às culturas celulares, que reflete a intervenção nutricional, e ao momento de estímulo com LPS, que por sua vez, representa a condição inflamatória do indivíduo.

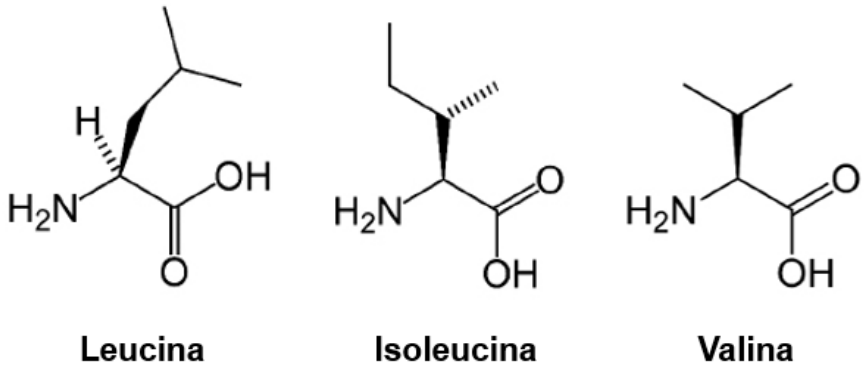
Diante do exposto, esse trabalho pretendeu estabelecer uma prova de conceito para elucidar os efeitos da suplementação com ACR na resposta inflamatória induzida por LPS em diferentes protocolos de tratamento.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Aminoácidos de Cadeia Ramificada

São classificados como aminoácidos indispensáveis, pois os esqueletos de carbono dos ACR não podem ser sintetizados pelo organismo, sendo necessária a ingestão por meio da dieta. Apresentam grupamentos R apolares, com estrutura alifática e ramificações em relação à cadeia carbônica linear principal (Figura 1).[60] A cadeia lateral da leucina e da isoleucina é composta por um grupamento isobutil e a ramificação ocorre no carbono β e γ, enquanto na valina, a cadeia lateral é constituída por um grupamento isopropil e a ramificação está presente no carbono β.[52]

Figura 1. Estrutura dos aminoácidos de cadeia ramificada.



Adaptado de Adeva et al. (2012).[52]

3.1.1. Transporte dos Aminoácidos de Cadeia Ramificada

O transporte dos ACR é realizado pelos transportadores Na^+-independentes de aminoácidos neutros, conhecidos como transportadores de soluto (“Solute carriers” - SLC)[61], categorizados em subfamílias contendo diferentes tipos de transportadores, dentre eles, a família SLC7, que inclui os transportadores de aminoácidos do tipo L (LAT) 1 (LAT1 ou SLC7A5) e 2 (LAT2 ou SLC7A8) e a família SLC43, que inclui LAT 3 (ou SLC43A1) e LAT4 (ou SLC43A2)[62].

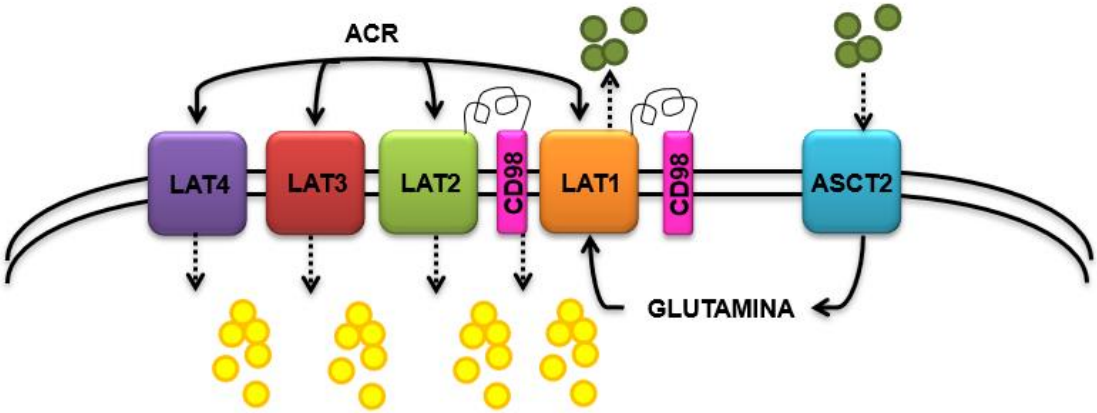
Todos os LAT 1, 2, 3 e 4 são capazes de transportar os ACR para o interior das células, sendo que o LAT1 e o LAT2 são expressos no cérebro, no baço, no fígado, no músculo esquelético, no estômago e na placenta[63,64], enquanto o LAT3 é expresso no fígado, no músculo esquelético e no pâncreas[65], e o LAT4 é expresso nos rins e no intestino delgado[66]. Estudos recentes também mostram que a LAT4 está presente em leucócitos oriundos do sangue periférico humano[62] e que o LAT1 é um importante transportador de ACR em linfócitos T humanos ativados[61].

Embora o transporte dos ACR seja independente de Na^+, tanto o LAT1 quanto o LAT2 dependem da glicoproteína transmembrana tipo II CD98 (4F2hc, SLC3A2) para a troca de aminoácidos através da membrana plasmática, a qual esses transportadores se ligam, formando um heterodímero de alta afinidade, facilitando a translocação de LAT1 e LAT2 para a membrana plasmática[67]. Em contrapartida, o LAT3 e o LAT4 são facilitadores da difusão de aminoácidos, não requerendo ligação específica às moléculas de superfície[68].

Adicionalmente, vale ressaltar que o transporte da leucina é dependente da glutamina. Primeiro, a glutamina é transportada para o interior das células pelo transportador alanina-serina-cisteína 2 (ASCT2), pertencente à família SLC1 (SLC1A5)[69], e posteriormente é transportada para fora das células pelo LAT1, que usa glutamina intracelular como substrato de efluxo para regular a captação de leucina extracelular (Figura 2)[70].

Estudos mostram que a leucina aumenta a expressão gênica de ASCT2 e do transportador de aminoácidos catiônicos 1 (CAT1), bem como outras proteínas envolvidas no transporte dos ACR, como o 4F2hc e o rBAT, associado aos transportadores de aminoácidos heteroméricos (HAT), enfatizando a importância da leucina na regulação do transporte de outros aminoácidos neutros e catiônicos[71].

Figura 2. Transporte dos aminoácidos de cadeia ramificada



Adaptado de McCracken e Edinger (2013).[72]

3.1.2. Oxidação dos Aminoácidos de Cadeia Ramificada

O primeiro passo no catabolismo dos ACR é o processo reversível de transaminação, que resultará nos respectivos α-cetoácidos de cadeia ramificada, ou seja, a leucina é convertida à α-cetoisocaproato (KIC), a isoleucina à α-ceto-β-metilvalerato (KMV) e a valina à α-cetoisovalerato (KIV)[73]. Essa reação é catalisada pela enzima aminotransferase de aminoácidos de cadeia ramificada (ATCR), a qual é encontrada em duas isoformas: a citosólica (ATCR1 ou ATCRc), expressa no cérebro e em células imunológicas, como células $TCD4^+$ ativadas, e a mitocondrial (ATCR2 ou ATCRm), também expressa em células imunológicas e na maioria dos tecidos de humano adultos, especialmente no músculo esquelético, no estômago, no pâncreas e nos rins[74,75]. Vale ressaltar que tanto a BCAT1 quanto a BCAT2 estão ausentes ou têm baixa atividade no fígado, restringindo esse tecido à descarboxilação oxidativa dos ACR[76].

O grupo amino (NH_3) oriundo desse processo de transaminação é transferido para o α-cetoglutarato, que é convertido a glutamato e pode ser utilizado para a síntese de outros aminoácidos, como alanina e glutamina[77].

O segundo passo corresponde ao processo irreversível de descarboxilação oxidativa dos α-cetoácidos formados no qual os esqueletos de carbono do KIC, KMV e KIV são convertidos à isovaleril-CoA, 3-metilbutiril-CoA e isobutiril-CoA, respectivamente.[75] Essa reação é catalizada pelo

complexo enzimático desidrogenase de α-cetoácidos de cadeia ramificada (DαCCR), composto por várias cópias das enzimas descarboxilase de α-cetoácidos de cadeia ramificada dependente de tiamina-pirofosfato (E1), dihidrolipoamida aciltransferase (E2) e dihidrolipoamida desidrogenase (E3).[74]

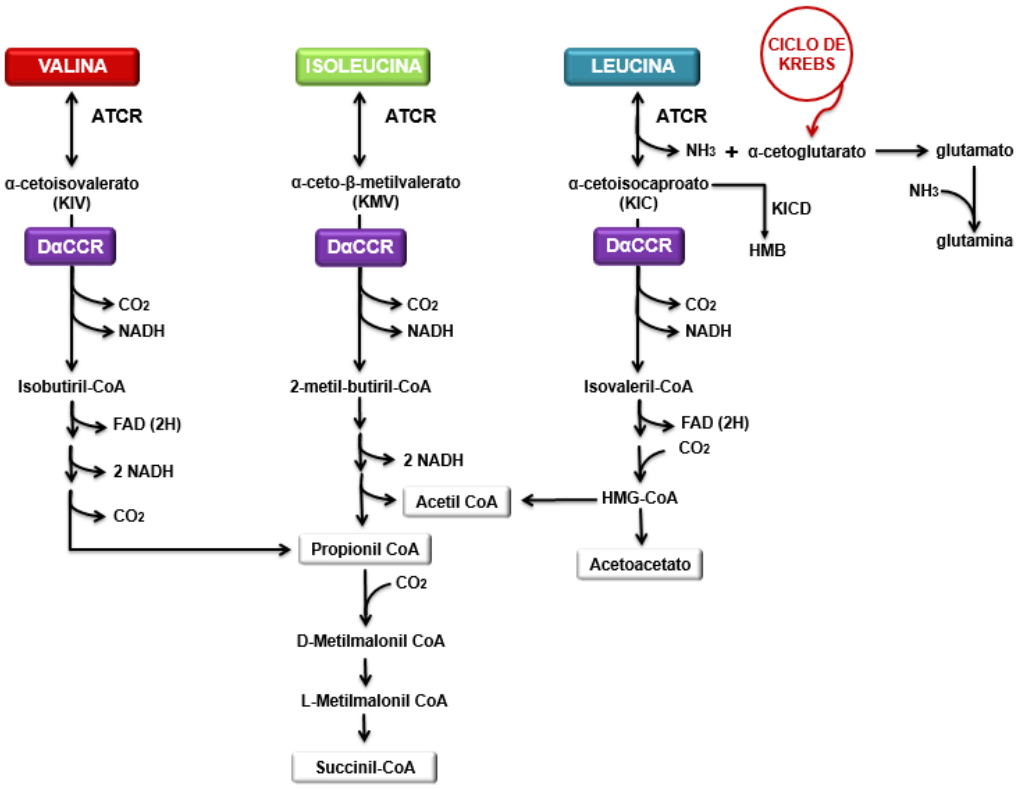
A E1 utiliza uma coenzima A reduzida como substrato para descarboxilação, enquanto a E2 utiliza um ácido lipoico como aceptor do substrato descarboxilado e o transfere para a acetil-CoA por meio da redução da lipoamida a dihidrolipoamina. A E3, por sua vez, constitui a lipoamida desidrogenase, transferindo o seu hidrogênio para a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) por meio da flavina adenina dinucleotídeo (FAD). O complexo DαCCR é regulado a partir da adição ou remoção de fosfato pela lipoamida quinase (inibição) e pela lipoamida fosforilase (ativação).[78]

O terceiro passo no catabolismo dos ACR corresponde ao processo de geração de ATP. O processo de desidrogenação dos ésteres de acil-CoA e de síntese dos α-β-acil CoA insaturados são catalisados pela enzima isovaleril-CoA desidrogenase, que converte a leucina, e pela enzima metil-acil-CoA desidrogenase, que converte a isoleucina e a valina. A leucina é cetogênica, pois forma acetil-CoA e acetoacetato, enquanto a valina é glicogênica, podendo ser convertida em succinil-CoA. Tanto a isoleucina quanto a valina são metabolizadas para succinato via metil-malonil-CoA. A isoleucina também pode formar acetoacetato e, desta forma, pode ser considerada como um aminoácido glicogênico e cetogênico[79,80].

Uma via alternativa do metabolismo da leucina é catabolizada pela enzima KIC dioxigenase (KICD), na qual o KIC é convertido a β-hidroxi-β-metilbutirato (HMB) no citosol de hepatócitos.[81,82,83]. O HMB está relacionado à redução de lesões na musculatura esquelética, atenuação da degradação proteica muscular, aumento da síntese proteica muscular e da atividade do eixo GH-IGF-1 e modulação da expressão de IGF-1 no músculo[84–86].

Os processos supracitados estão ilustrados na figura 3.

Figura 3. Oxidação dos aminoácidos de cadeia ramificada.



Adaptado de Rogero e Tirapegui (2008).

3.1.2.1. Oxidação dos Aminoácidos de Cadeia Ramificada nas células imunes

Estudos *in vitro* demonstraram que as células imunológicas apresentam alta atividade da ATCR e do DαCCR, utilizando a isoleucina, a valina e, principalmente, a leucina como substratos para síntese moléculas mediadoras da resposta inflamatória, bem como essas células aumentam a incorporação desses aminoácidos, principalmente durante a fase S do ciclo celular[18]. Adicionalmente, em resposta a mitógenos, a demanda por leucina é substancialmente elevada, apresentando aumento de 270% no transporte, 195% na transaminação e 122% na oxidação desse aminoácido[17].

Em linfócitos humanos periféricos, a taxa de transaminação da leucina é significativamente superior em relação à taxa de descarboxilação do KIC, o que resulta em acúmulo desse α-cetoácido, que por sua vez, exerce a inibição alostérica do DαCCR por meio da fosforilação do E1 pela lipoamida quinase. A

inibição do DαCCR resulta na menor oxidação da isoleucina e da valina, reduzindo as concentrações desses dois aminoácidos e de seus respectivos α-cetoácidos.[87–89] Além disso, em condições suprafisiológicas, a baixa concentração de isoleucina, valina e glutamina também pode exercer efeito inibidor da transaminação da leucina e da descarboxilação do KIC[87].

Durante a sua ativação, os linfócitos T passam por reprogramação metabólica e expansão clonal, aumentando a demanda por aminoácidos para sustentar a taxa elevada de síntese proteica. Essas células diminuem a descarboxilação oxidativa do piruvato, enquanto a formação de lactato regenera o NAD^+ necessário para dar continuidade ao processo de geração de energia. A oxidação mitocondrial dos ACR diminui enquanto o processo de transaminação desencadeada pela ATCRc aumenta[90].

Em linfócitos associados ao fígado (LAF), linfócitos granulares grandes e linfócitos agranulares, os ACR, especialmente a valina, aumentam a proliferação celular, por meio da estimulação da linfopoiese, além de aumentar a atividade das células *natural killer* (NK) e *limphokine-activated killer* (LAK) não apenas quantitativamente, mas também qualitativamente[91].

As células tronco hematopoiéticas (CTH) são especialmente sensíveis a privação de aminoácidos e, para manterem a sua integridade, contam com um complexo sistema de manutenção promovido pelas células não hematopoiéticas da medula óssea. Foi constatado que a privação de valina e de leucina durante o crescimento das CTH humanas é significativamente prejudicial e resulta no comprometimento do número de leucócitos e eritrócitos do sangue[92,93].

3.1.3. Mecanismos de sinalização intracelular dos aminoácidos de cadeia ramificada: a via da mTOR

A concentração intracelular dos aminoácidos é diretamente controlada pela sua concentração no plasma, pela sua capacidade em passar pelos transportadores celulares de aminoácidos e pelo aumento da sua disponibilidade decorrente de processos de catabolismo celular.[94]

Após uma refeição, há o aumento da concentração plasmática dos aminoácidos, especialmente dos ACR,[95] que possuem um papel único na

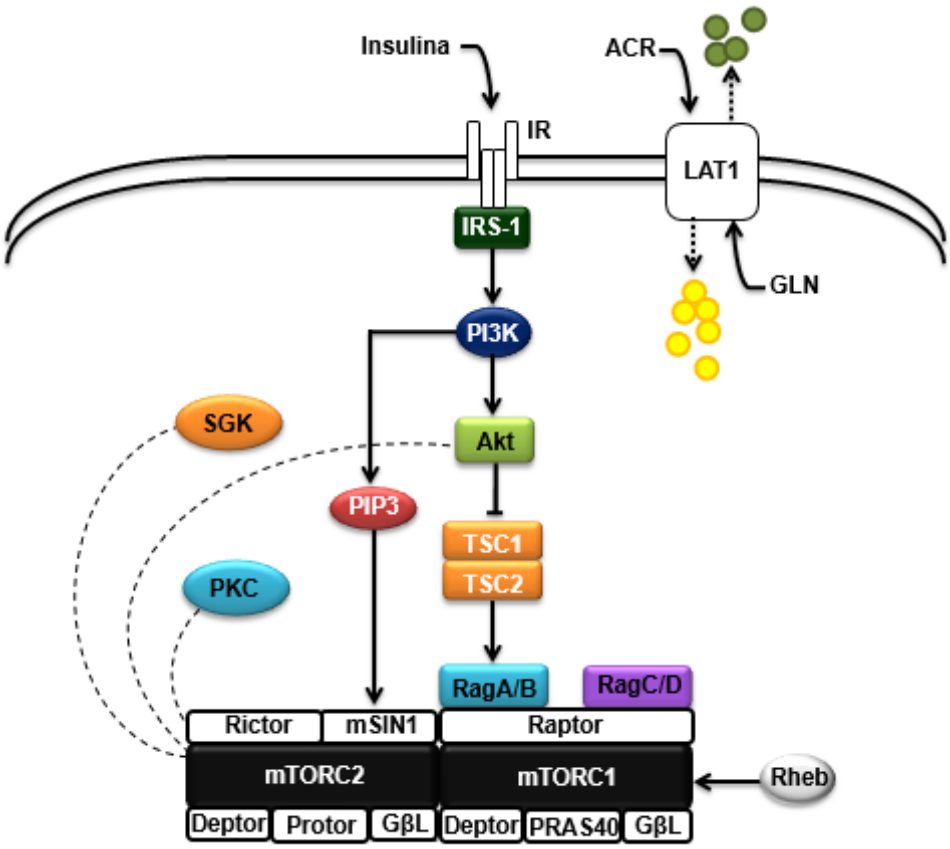
estimulação da síntese proteica, pois promovem a ativação da proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR).

Pertencente à superfamília das fosfatidilinositol-3-quinases (PIKK), a mTOR é uma proteína-quinase, constituída por dois complexos distintos, o mTORC1 e o mTORC2, envolvidos nos processos de crescimento e de divisão celular que atuam a partir da integração de sinais derivados de nutrientes e de fatores de crescimento.[96–98]

O mTORC1 é composto pela mTOR, a proteína regulatória associada a mTOR (Raptor), a proteína G-sub-unidade tipo-β (GβL ou *mammalian lethal with Sec13 protein 8* – mLST8), o substrato de Akt rico em prolina de 40 kDa (PRAS40) e o domínio DEP que interage com a proteína mTOR (Deptor).[99] O mTORC2, por sua vez, contém a mTOR, o Deptor, a GβL, a proteína companheira de mTOR insensível à rapamicina (Rictor), a proteína que interage com a quinase ativada por estresse de mamíferos 1 (mSIN1) e a proteína observada com Rictor (Protor).[100]

Quando estimulada pela concentração intracelular de aminoácidos, especialmente de leucina, a ativação do mTORC1 é regulada pela proteína quinase B (Akt) e pela fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), que resultam na fosforilação e inibição dos complexos de esclerose tuberosa 1 e 2 (TSC1 e TSC2).[101] O complexo TSC1-TSC2 atua como ativador de GTPases, as quais apresentam heterodímeros com sítios ativos de ligações GTP-RagA/B e de ligações GDP-RagC/D. A ligação do Raptor no sítio ativo GTP-RagA/B promove a translocação do mTORC1 para o lisossomo, onde a proteína homóloga de Ras enriquecida no cérebro (Rheb) estimula a atividade quinase do mTORC1.[15] Vale ressaltar que a ausência de aminoácidos promove a inativação das GTPases com mudança das ligações para GDP-RagA/B e GTP-RagC/RagD (Figura 4).[101]

Figura 4. Mecanismos de ativação da via da mTOR por ACR



Adaptado de Bonvini et al. (2018)

Os mecanismos de ativação do mTORC2 são pouco elucidados na literatura. É suposto que a proteína fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (PIP3) gerada a partir da ativação da PI3K promove a ativação do mTORC2 a partir da interação com a proteína mSin1.[102] Quando estimulado por aminoácidos, o mTORC2 desempenha papel ativador da Akt, da proteína quinase C (PKC) e da proteína quinase induzida por soro e glicocorticoides (SGK).[103,104] A PKC é responsável pela regulação de múltiplas funções celulares, como adesão, proliferação, diferenciação e apoptose, enquanto a SGK participa do controle da atividade de enzimas, como a iNOS, e da regulação dos processos de proliferação e sobrevivência celular, assim como de organização do citoesqueleto (Figura 4).[105]

3.2. O Sistema Imune

Em resposta aos microrganismos invasores como vírus, bactérias, fungos e protozoários, o organismo conta com um eficaz complexo de proteção que atua de maneira dinâmica e coordenada na eliminação destes agressores: o sistema imunológico.[106] Esse sistema é conceitualmente dividido em duas partes: a resposta imune inata e a resposta imune adaptativa.[107]

A resposta imune inata corresponde a primeira linha de defesa do organismo, sendo composta por barreiras físicas, químicas e biológicas, além de apresentar células com propriedades fagocíticas e apresentadoras de antígenos.[107] Apesar de apresentar baixa especificidade e ausência de memória imunológica, estas células atuam rapidamente em resposta a um grande número de estímulos gerados a partir da interação entre os padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) e os receptores de reconhecimento de padrões (RRP), especialmente pelo conjunto de receptores tipo Toll ("*Toll-like receptors*"-TLR).[107]

Dentre os fagócitos que compõe a resposta imune intata, destacam-se os macrófagos, células com diâmetro entre 10 a 80 µM, de forma e núcleo irregular, com um ou dois nucléolos e cromatina dispersa que produzem uma vasta quantidade de compostos, como espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (RONS), prostaglandinas e citocinas que auxiliam no processo de destruição do patógeno fagocitado e ainda iniciam e regulam a resposta imune. [108,109]

As RONS pertencem à duas classes de moléculas quimicamente reativas que contém oxigênio e nitrogênio em sua composição, e que apresentam, em sua maioria, elétrons desemparelhados, por isso chamados de radicais livres.[110] Em mamíferos, essas moléculas são geradas, principalmente, a partir da atividade das enzimas NADPH-oxidase, mieloperoxidase e óxido nítrito sintase induzível (iNOS), e participam ativamente do mecanismo bactericida de fagócitos durante a resposta imune inata.[111] Todavia, apesar do importante papel desempenhado pelas RONS na função imunológica, a síntese exacerbada dessas moléculas pode provocar efeitos deletérios ao organismo, causando danos às estruturas biológicas por meio da indução do estresse oxidativo.[112]

As prostaglandinas são sintetizadas a partir do ácido araquidônico, o qual é liberado da membrana plasmática, por meio da ação da fosfolipase A e,

imediatamente metabolizado, em reações em cascata, pelas enzimas prostaglandina G/H sintase e ciclooxigenase (COX) 1 e 2.[113,114] Existem quatro principais classes de prostaglandinas que são produzidas em humanos, a prostaglandina E2 (PGE2), a prostaciclina (PGI2), a prostaglandina D2 (PGD2) e a prostaglandina F2α (PGF2α).[113] A PGE2 é a prostaglandina mais abundantemente produzida, inclusive por fagócitos, e desempenha papel fundamental na resposta inflamatória. A síntese dessa molécula é significativamente aumentada no local da injúria tecidual, uma vez que contribui para o desenvolvimento dos cinco sinais cardinais da inflamação aguda (dor, calor, rubor, tumor e perda da função). Esses sinais são resultantes do aumento da permeabilidade vascular e do fluxo sanguíneo local e da ação da PGE2 em neurônios sensoriais periféricos e em sítios centrais dentro da medula espinhal e do cérebro.[113]

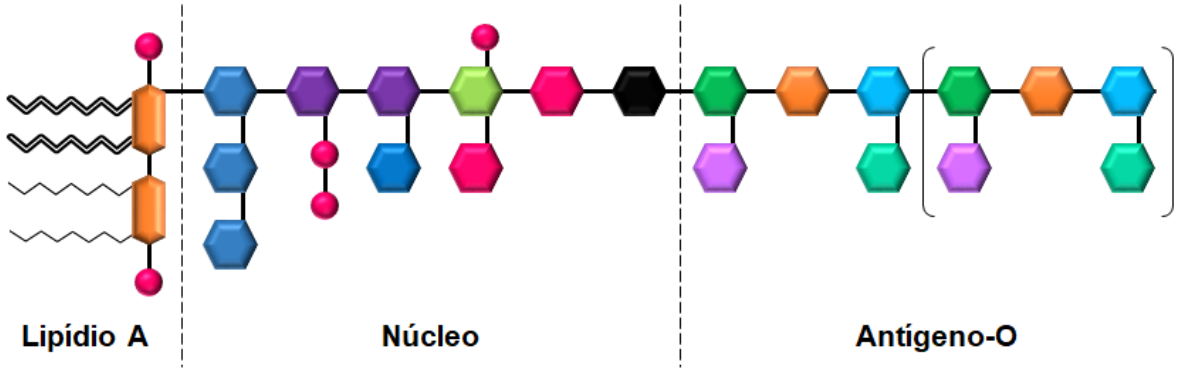
As citocinas, por sua vez, são proteínas de baixo peso molecular que atuam na proliferação, na diferenciação, na sobrevida das células imunes e na modulação das respostas imune e inflamatória.[115] Atuando como citocinas pró-inflamatórias, a IL-1, a IL-6 e o TNF-α possuem importante papel na modulação da fase aguda da resposta inflamatória, pois são sintetizadas pelos macrófagos a partir da interação PAMP-RRP.[116] A IL-10, também secretada por macrófagos, desempenha papel anti-inflamatório, inibindo a expressão e a síntese de citocinas pró-inflamatórias por *feedback* negativo, evitando a prorrogação da resposta inflamatória que levaria à injúria tecidual e a efeitos deletérios.[117]

3.2.1. Mecanismos de ativação de macrófagos: LPS e TLR-4

Diversos PAMP podem promover a ativação de RRP em macrófagos, dentre eles, o LPS, uma endotoxina presente na parede celular de bactérias Gram-negativas que ativa a via de sinalização do TLR-4, principalmente em enterócitos e macrófagos.[118,119]

O LPS é constituído por uma cadeia hidrofílica de oligossacarídeos sorotipo-específica, denominada antígeno-O, um núcleo hidrofílico de polissacarídeos e uma cadeia lipídica hidrofóbica, chamada lipídio A, sendo este responsável pelas propriedades tóxicas da molécula (Figura 5).[120,121]

Figura 5. Estrutura química geral do LPS em bactérias Gram-negativas.



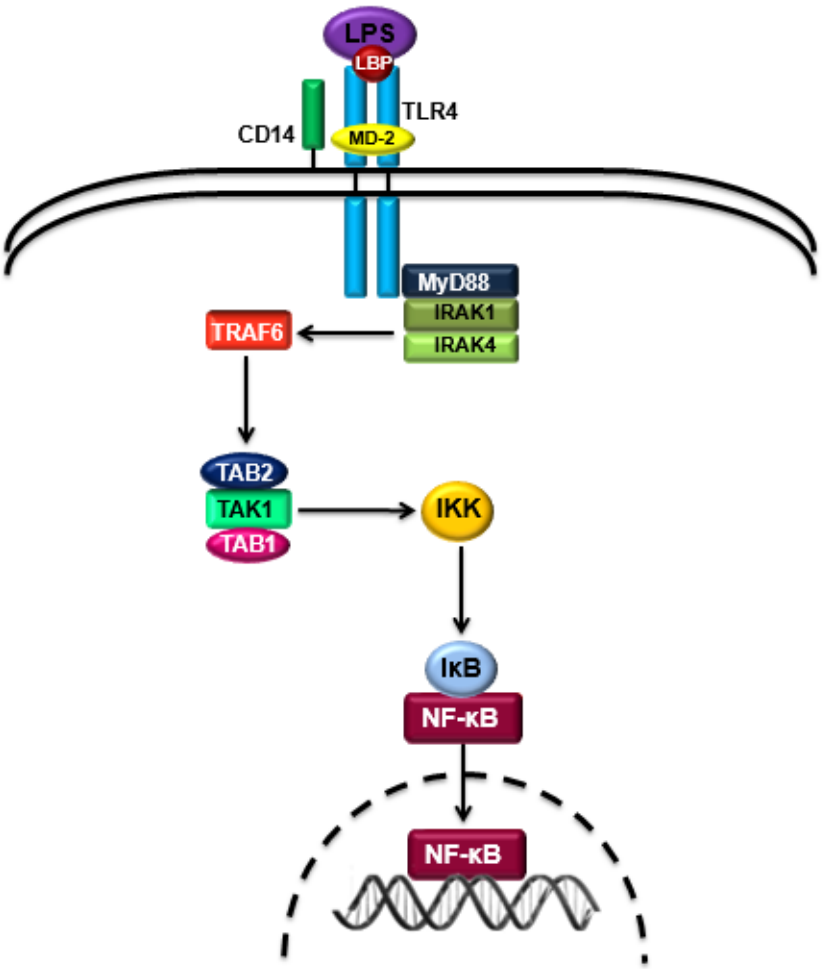
Adaptado de Wiederschain (2011)

O LPS se associa a proteína ligadora de LPS (LBP) que facilita a ligação do LPS ao CD14 presente na bicamada lipídica da membrana celular, formando um complexo LPS-LBP-CD14. A LBP se dissocia do complexo e o lipídio A se liga ao receptor do tipo TLR-4 que depende da proteína extracelular MD-2 para efetivo reconhecimento do LPS e, posteriormente, a proteína adaptadora citoplasmática MyD88 liga-se ao receptor TLR4.[115,122]

A associação do TLR4 e MyD88 recruta membros da família quinase associada ao receptor de IL-1 (IRAK); dois membros, IRAK4 e IRAK1, são sequencialmente fosforilados, o que promove a dissociação dos mesmos a partir do complexo receptor e a posterior associação desses com a proteína denominada fator 6 associado ao receptor de TNF (TRAF6), mediada pela proteína ligadora de TAK1 (TAB1) e pela proteína ligadora de TRAF6 à TAK-1 (TAB2). O TRAF6 promove a ativação do complexo IκB quinases (IKK).[122]

Esse complexo é composto de duas subunidades catalíticas IKKα e IKKβ e uma subunidade regulatória IKKγ que induz a fosforilação do IκBα. A fosforilação do IκBα resulta na sua poliubiquitinação, a qual, por sua vez, acarreta na sua degradação mediada pelo proteassoma 26S, o que permite, desse modo, que o fator de transcrição nuclear κB (NF-κB) se transloque para o interior do núcleo celular e se ligue às regiões promotoras do DNA, promovendo o aumento da expressão de genes dependentes do κB, como os que regulam a síntese de citocinas pró-inflamatórias e de proteínas envolvidas na síntese de RONS (Figura 6).[123]

Figura 6. Via de sinalização do NF-κB.



Adaptado de Rogero et al. (2008).

3.2.2. A mTOR e a via do NF-kB

O NF-kB é constituído por cinco membros, c-REL, RELB, p105, p100 e p65 (RELA), sendo este último responsável por desempenhar a maior parte da atividade transcricional.[124] A via do NF-kB pode ser ativada por diversos estímulos como TNF-α, IL-1, proteínas de choque térmico (Hsp) e LPS já previamente mencionado culminando na transcrição gênica de citocinas pró-inflamatórias, óxido nítrico e outros mediadores inflamatórios,[26] desempenhando assim, papel chave na resposta inflamatória.[21] Entretanto, a ativação contínua da via do NF-kB, pode levar à resposta inflamatória crônica, encontrada tanto em doenças autoimunes, como artrite reumatoide, quanto em doenças metabólicas,

como obesidade e diabetes tipo 2 (DM2). A atenuação da atividade desse fator de transcrição tem sido relatada como importante alvo no tratamento de diversos tipos de cânceres, resultando na apoptose de células cancerígenas.[125–127]

A via de sinalização da mTOR exerce papel chave na resposta inflamatória mediada pelo NF-κB.[128] Foi demonstrado que o IKKβ fosforila e suprime o TSC-1, levando a ativação da mTOR, que, por sua vez, aumentará o processo de angiogênese e a síntese de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), resultando no desenvolvimento de tumores.[129]

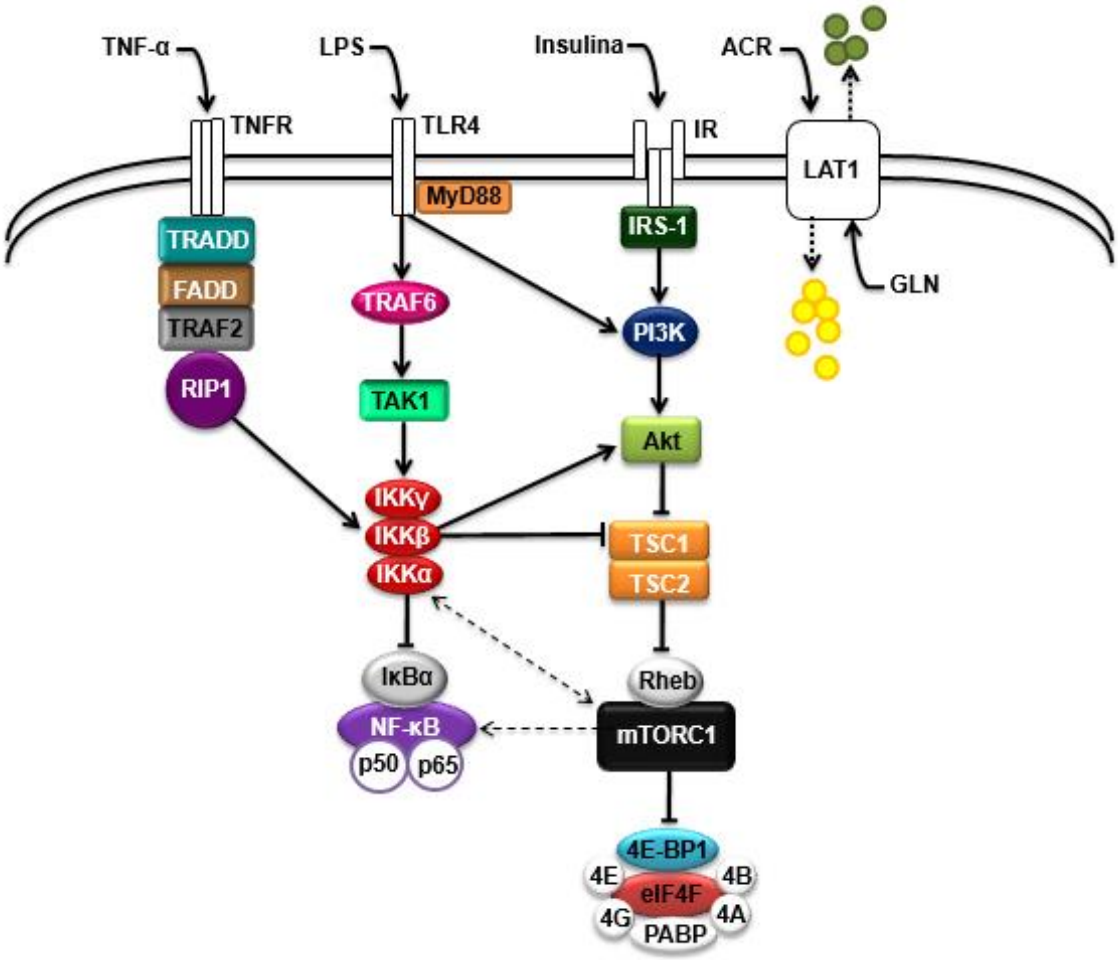
Outros estudos mostram que o IKKβ também pode interagir com a Akt, resultando na ativação da mTOR.[130] Adicionalmente, foi reportado que, quando o IKKα interage com o mTORC1, a mTOR ativa reciprocamente o IKK e o NF-κB. A mTOR ativada se associa com a MyD88 e promove a ativação do fator regulador de interferon 5 e 7, promovendo a síntese de interferon (IFN) tipo I, envolvido no sistema de defesa contra infecções virais.[131]

Ademais, a ativação da via da mTOR e do NF-κB aumenta a expressão da iNOS e da COX-2, levando a efeitos pró-inflamatórios e vasodilatadores que contribuem para a inflamação e para a hipotensão induzida pelo LPS.[20]

Paradoxalmente, o insulto inflamatório produzido pelo LPS parece diminuir a fosforilação da mTOR e de outras duas proteínas reguladas por ela, a proteína 1 ligante do fator de iniciação eucariótico 4E (4E-BP1) e o fator de iniciação eucariótico 4G (eIF4G), comprometendo a síntese proteica e levando ao decréscimo da massa magra corporal.[132] Apesar do mecanismo envolvido nesse processo não estar bem esclarecido, estudos corroboram esse impacto negativo na resposta anabólica promovido pelo LPS.[132,133]

Uma hipótese plausível para explicar essa resistência à leucina está relacionada com a depleção dos estoques de glutamina durante o quadro de sepse, comprometendo o transporte de ACR para o espaço intracelular, uma vez que esses aminoácidos estabelecem um mecanismo bidirecional e dependente do efluxo de glutamina.[134,135]

Figura 7. Mecanismos de integração da via da mTOR e da via do NF-κB



Adaptado de Bonvini et al., 2018

3.3. Aminoácidos de Cadeia Ramificada na terapia nutricional e na imunomodulação

Em meados das décadas de 1970 e 1980, surgiram os primeiros estudos que avaliaram a capacidade imunomoduladora dos ACR, nos quais, pesquisadores avaliaram pacientes em estado crítico recebendo nutrição parenteral total (NPT) e observaram que o aumento na quantidade total de ACR na fórmula aumentou a contagem de linfócitos no sangue e reduziu a mortalidade, principalmente no período pós-operatório e em casos de sepse[1–3].

Ademais, ao compararem as concentrações plasmáticas de aminoácidos, os pacientes sobreviventes apresentaram concentrações plasmáticas significativamente maiores de ACR e menores concentrações de aminoácidos

aromáticos e sulfurados em relação àqueles que não sobreviveram à sepse, indicando função hepática preservada e melhor manutenção do metabolismo energético[1]. Considerando que a insuficiência hepática é uma causa comum de morte em pacientes sépticos, este resultado demonstra o efeito benéfico da suplementação com ACR na melhora da sobrevida dos pacientes[4].

Bower et al.[5] realizaram análises tanto quantitativas como qualitativas da NPT para pacientes com sepse. Foram utilizadas três fórmulas com diferentes proporções de ACR, sendo uma fórmula de controle padrão que continha 25% de BCAA (660 mg/mL de leucina, 560 mg/mL de valina e 510 mg/mL de isoleucina), enquanto as outras duas fórmulas continham 45% de BCAA, uma com predomínio de leucina (1576 mg/mL de leucina, 789 mg/mL de valina e 789 mg/mL de isoleucina) e outra com predomínio de valina (263 mg/mL de leucina, 1838 mg/mL de valina e 1050 mg/mL de isoleucina).

No entanto, na primeira fase do estudo, a solução rica em valina foi insuficiente para manter a concentração plasmática de proteínas com meia-vida curta, enquanto a solução rica em leucina provou ser mais eficaz neste contexto. É possível que este resultado positivo obtido com a administração da solução rica em leucina tenha sido mediado pelo efeito secretagogo da leucina em relação à insulina, no entanto, o balanço nitrogenado foi marginalmente melhorado com ambas as soluções, embora o balanço cumulativo de nitrogênio não tenha sido alterado.

Nakamura et al.[6] avaliaram o efeito da suplementação oral com 12 g/dia de ACR (2,8 g de isoleucina, 5,7 g de leucina e 3,4 g de valina) na função fagocitária de neutrófilos, na atividade de células *natural killer* (NK), nas concentrações plasmáticas de albumina e na razão de Fisher em pacientes com cirrose hepática. Após três meses de suplementação, o índice de Fisher aumentou significativamente; no entanto, não houve diferença estatística nas concentrações de albumina no plasma. Os autores também observaram uma melhora significativa na função fagocítica dos neutrófilos e na atividade das células NK, concluindo que a suplementação com ACR poderia reduzir o risco de infecções bacterianas e virais em pacientes com cirrose descompensada.

Considerando que as células NK também desempenham papel importante na defesa contra o desenvolvimento de tumores, a suplementação com ACR em pacientes cirróticos pode reduzir o risco de desenvolver cânceres

hepáticos[6]. Estudos indicam que a suplementação com ACR está associada a menor incidência de carcinoma hepatocelular (CHC) em pacientes com cirrose e podem melhorar o estado nutricional e a qualidade de vida destes indivíduos[7–12]. Ademais, em pacientes submetidos a intervenções terapêuticas para tratamento de CHC, a suplementação com ACR previne a diminuição das concentrações séricas de albumina, além de reduzir complicações pós-operatórias[13].

Além dos efeitos benéficos sobre o CHC, a suplementação com ACR está relacionada à melhora do estado inflamatório e nutricional de pacientes com câncer gastrointestinal. Sun et al.[14] investigaram os benefícios potenciais da administração parenteral de uma solução enriquecida com 30% de ACR em pacientes desnutridos com câncer gastrointestinal submetidos à cirurgia. Foi observada a diminuição da contagem de leucócitos, da concentração plasmática de proteína C-reativa (PCR), da fosfatase alcalina e da gama-glutamil transferase (γ-GT). A solução enriquecida também manteve concentrações plasmáticas estáveis de albumina e de pré-albumina e balanço nitrogenado positivo. Neste estudo, houve também diminuição significativa na incidência de comorbidades pós-operatórias.

Pacientes críticos frequentemente apresentam estado avançado de desnutrição, levando ao estresse metabólico e catabolismo intenso, caracterizados pelo aumento do consumo de energia, balanço nitrogenado negativo, aumento da utilização de glutamina e alteração do metabolismo de aminoácidos. Na tentativa de compensar o aumento no gasto de energia e no consumo de glutamina, há um aumento na oxidação dos ACR no músculo esquelético.

Estudos mostram que a suplementação com glutamina melhora o equilíbrio do nitrogênio e a recuperação da infecção em várias condições clínicas, como queimaduras, lesões por radiação, estresse cirúrgico grave, sepse e câncer[19]. O aumento da disponibilidade de glutamina também promove aumento do glutamato, que é um componente da glutationa, o principal antioxidante intracelular não enzimático[136]. Nesse sentido, o papel imunomodulador e antioxidante dos ACR, seja direta ou indiretamente, pode ser de grande importância para a prevenção e tratamento de outras condições que envolvem estados inflamatórios e oxidativos.

4. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da suplementação com aminoácidos de cadeia ramificada sobre os mecanismos intracelulares e os parâmetros inflamatórios em macrófagos de linhagem RAW 264.7 estimulados com lipopolissacarídeos.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Obtenção das células RAW 264.7 e do meio de cultivo celular

A linhagem celular de macrófagos Raw 264.7 foi originalmente estabelecida a partir da ascite induzida por tumor formado após injeção do vírus da leucemia Abselon (A-MuLV) em um camundongo macho. São células com características de monócitos e macrófagos de crescimento semiaderente, que possuem capacidade de espraiamento, de ativação intracelular e de síntese de mediadores pró e anti-inflamatórios quando estimulados com LPS.

No presente estudo, esta linhagem celular foi obtida pelo Banco de Células do Rio de Janeiro (APABCAM), em criotubos individuais contendo $1x10^6$ células/mL de meio de congelamento (10% DMSO e 90% soro fetal bovino (SFB)).

O meio de cultivo celular utilizado para o descongelamento, o cultivo e a expansão das células RAW 264.7 foi o *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) alta glicose (4500 mg/mL), com glutamina (4 mmol/L), da marca Vitrocell (Atená Biotecnologia, Campinas, SP, BR). Após a aquisição, o DMEM foi suplementado com SFB (10%) e com os antibióticos penicilina (100 unidades/mL) e estreptomicina (100 µg/mL), sendo referido no presente trabalho como *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*-Padrão (DMEM-P).

5.2. Procedimentos de cultivo e expansão das células RAW 264.7

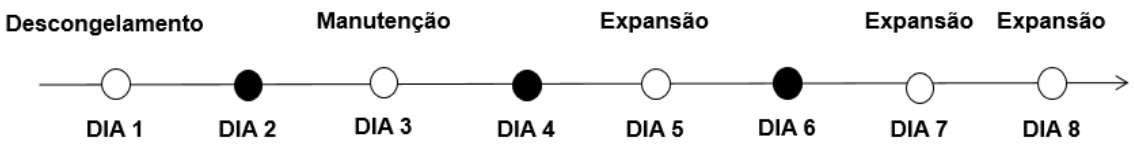
Os criotubos contendo as células RAW 264.7 foram descongelados em banho maria a 37 °C, às células foram, então, retiradas e suspendidas em DMEM-P e imediatamente centrifugadas à 1000 rpm por 10 minutos à 4 °C. Após esse procedimento, as células foram resuspendidas em DMEM-P e transferidas para garrafas de cultivo celular. As garrafas foram mantidas em confluência celular de 70-80%, atmosfera umidificada com 5% de CO2 e temperatura de 37ºC controladas.

Para a manutenção das células, o meio de cultivo na garrafa foi descartado e substituído por um DMEM-P novo e para a expansão celular, o DMEM-P na garrafa foi descartado, as monocamadas confluentes foram

descoladas da superfície de cultivo com *Cell Scraper* (Corning, Nova York, EUA) e ressuspendidas em DMEM-P novo. Essa suspensão foi transferida para novas garrafas com maior área de crescimento. A técnica de aproveitamento do meio de cultivo celular (50%-50%) não foi aplicada nesses procedimentos, uma vez que, devido ao rápido crescimento e elevado metabolismo dessas células, o risco de contaminação das culturas celulares apresenta-se alto.

Esses procedimentos de cultivo ocorreram de acordo com o cronograma apresentado na figura 8. Vale ressaltar que o procedimento de expansão das células respeitou o limite de quatro passagens até serem utilizadas para a realização dos ensaios

Figura 8. Cronograma de expansão das células Raw 264.7



5.3. Padronização das análises

5.3.1. Sincronização do ciclo celular e avaliação da viabilidade celular

Para a padronização do ciclo celular das células RAW 264.7, foi realizada a sincronização de ciclo celular em todas as culturas celulares antes dos tratamentos com os ACR.

As células foram cultivadas e expandidas em DMEM-P até atingirem 80% de confluência. Posteriormente, foram recobertas com meio de cultivo celular DMEM sem a suplementação com SFB (DMEM-SFB$^-$) por 24 horas, de acordo com o protocolo proposto por Davis et al. (2001).

Após esse período, $5x10^5$ células foram retiradas de cada cultura, fixadas, permeabilizadas com Etanol 70% e mantidas no gelo por 20 minutos. Em seguida, foram centrifugadas à 1500 rpm por seis minutos e seu sobrenadante descartado. Depois, foram tratadas com 4 µg/mL de RNase, mantidas à 37 °C durante 30 minutos. Após o tratamento, as células foram marcadas com 5 µL de Iodeto de Propídeo (PI). A aquisição dos dados foi realizada por Citometria de

Fluxo BD FACS Canto II e o conteúdo de DNA lido no canal FL3. A análise do ciclo celular foi realizada quantificando-se a porcentagem de células nas regiões G0/G1 e S/G2/M.

Na parte remanescente da cultura celular, o DMEM-P foi reintroduzido por duas horas e, em seguida, essa foi submetida ao ensaio de viabilidade celular.

Nesse ensaio, $5x10^5$ células de cada cultura foram marcadas com Anexina-V conjugada com FITC, a qual se liga à fosfatidilserina que é externalizada durante o processo de morte por apoptose e 7AAD, intercalando-se entre as bases do DNA de células com a membrana rompida, característica da morte celular por necrose. Para a marcação com anexina-V e 7AAD, $1x10^5$ células foram ressuspendidas em uma solução tampão de Anexina. À suspensão de células foram adicionados 5 μL de anexina-V e 25 μg/mL de 7AAD, 10 μL do coquetel c-Kit-APC e Lin-PE (x) por 20 minutos na presença de uma solução tampão de anexina. Posteriormente a marcação foi avaliada no citômetro de fluxo FACsCalibur. As células mortas por apoptose ou necrose e as células viáveis foram expressas em porcentagem.

5.3.2. Avaliação das concentrações de LPS

Para determinar a concentração de LPS utilizada para induzir a resposta inflamatória nas células RAW 264.7 foi realizada a avaliação citológica visando observar a morfologia, a estrutura da membrana celular e a formação de grânulos.

Para tal procedimento, lamínulas redondas de 13 mm foram colocadas em cada poço de placas de 24 poços, em seguida, $1x10^5$ células foram adicionadas sobre cada lamínula e cobertas por meio de cultivo celular DMEM-P por 24 horas. Após esse período, o meio de cultivo foi substituído e foi adicionado o LPS nas concentrações de 1 µg/mL, 5 µg/mL e 10 µg/mL por 24 horas.

O sobrenadante foi coletado para mensuração da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) e as lamínulas foram analisadas em microscópio (Nikon Eclipse 80i).

5.4. Distribuição dos grupos experimentais

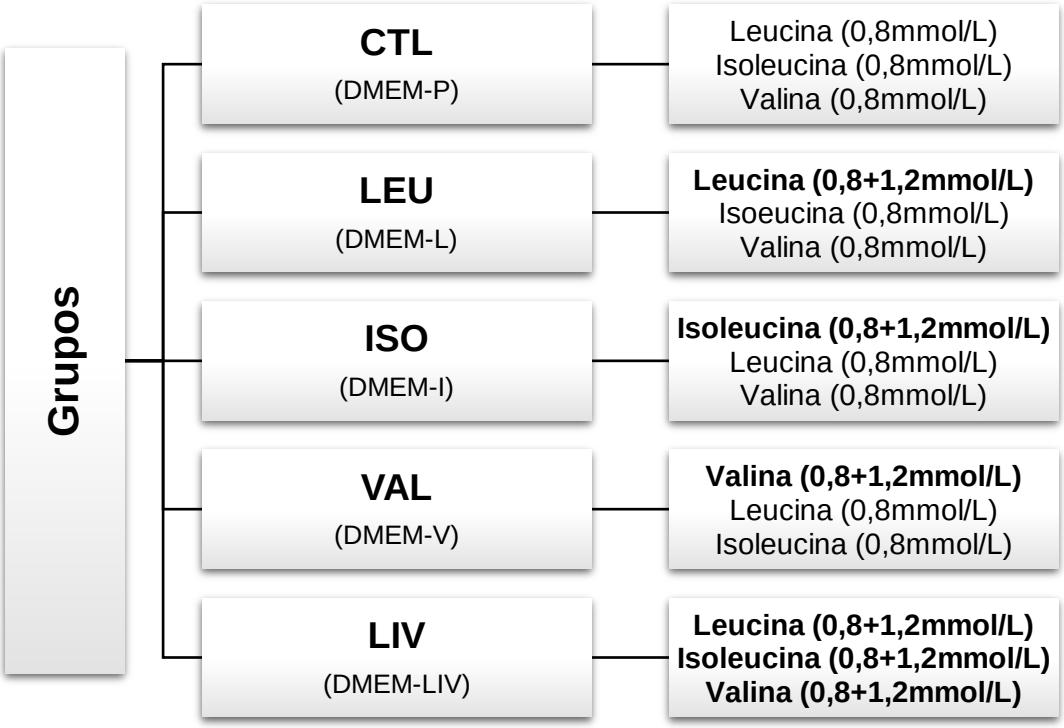
Após a sincronização do ciclo celular, as culturas de células foram divididas em cinco grupos: controle (CTL), leucina (LEU), isoleucina (ISO), valina (VAL) e associação de ACR (LIV).

O grupo CTL foi tratado com o meio de cultivo celular DMEM-P, que já contém em sua composição original 0,8 mmol/L de cada um dos três aminoácidos, pois esses são substanciais para o crescimento celular.[17]

O grupo LEU foi tratado com DMEM-P acrescido com 1,2 mmol/L de leucina (DMEM-L), o grupo ISO foi tratado com o meio de cultivo celular DMEM-P acrescido com 1,2 mmol/L de isoleucina (DMEM-I), o grupo VAL foi tratado com o meio de cultivo celular DMEM-P acrescido com 1,2 mmol/L de valina (DMEM-V) e, finalmente, o grupo LIV foi tratado com o meio de cultivo celular DMEM-P acrescido com 1,2 mmol/L de leucina, 1,2 mmol/L de isoleucina e 1,2 mmol/L de valina (DMEM-LIV).

Dessa forma, a concentração final em cada grupo suplementado foi de 2mmol/L dos aminoácidos correspondentes (Figura 5). Os meios de cultivo suplementados foram obtidos pela Vitrocell (Atená Biotecnologia, Campinas, SP, BR).

Figura 9. Distribuição dos grupos experimentais



5.5. Avaliação dos parâmetros inflamatórios

5.5.1. Protocolo de suplementação com ACR e de ativação com LPS

Para avaliar a viabilidade celular e realizar a dosagem dos parâmetros inflamatórios, após a sincronização do ciclo celular, $5x10^5$ células foram colocadas em cada um dos 24 poços das placas de cultivo (Corning®).

Cada grupo (CTL, LEU, ISO, VAL e LIV) foi submetido à quatro protocolos diferentes de tratamento com os ACR e de ativação com LPS, o pré-tratamento (PT), o tratamento agudo (TA), o tratamento crônico (TC) e o tratamento tardio (TT), divididos em duas etapas com duração total de 48 horas (Etapa 1 – 24 horas e etapa 2 – 24 horas).

Para fins de controle da intervenção, em cada um dos protocolos, o mesmo tratamento com ACR foi reproduzido com e sem adição de LPS, entretanto, no caso do TT, o LPS foi introduzido apenas na etapa 1 e retirado na etapa 2.

No PT cada grupo foi tratado com 1 mL/poço de DMEM-P, DMEM-L, DMEM-I, DMEM-V ou DMEM-LIV por 24 horas (Etapa 1). Após esse período, o

meio foi coletado, armazenado e substituído por 1 mL/poço de DMEM-P em todos os grupos. Após 20 minutos, foi adicionado 1 µg/mL de LPS em cada poço durante 24 horas (Etapa 2) (Tabela 1).

Tabela 1. Protocolo do pré-tratamento com ACR e LPS

	ETAPA 1 - 24 HORAS	**ETAPA 2 - 24 HORAS**
DMEM	DMEM-P DMEM-L DMEM-I DMEM-V DMEM-LIV	DMEM-P
LPS	-	-
DMEM	DMEM-P DMEM-L DMEM-I DMEM-V DMEM-LIV	DMEM-P
LPS	-	1 µg/mL

No TA todos os grupos foram tratados com 1 mL/poço de DMEM-P por 24 horas (Etapa 1). Após esse período, o meio foi coletado, armazenado e substituído por 1 mL/poço de DMEM-P, DMEM-L, DMEM-I, DMEM-V ou DMEM-LIV. Após 20 minutos, foi adicionado 1 µg/mL de LPS por poço durante 24 horas (Etapa 2) (Tabela 2).

Tabela 2. Protocolo do tratamento agudo com ACR e LPS

	ETAPA 1 - 24 HORAS	**ETAPA 2 - 24 HORAS**
DMEM	DMEM-P	DMEM-P DMEM-L DMEM-I DMEM-V DMEM-LIV
LPS	-	-
DMEM	DMEM-P	DMEM-P DMEM-L DMEM-I DMEM-V DMEM-LIV
LPS	-	1 µg/mL

No TC cada grupo foi tratado com 1 mL/poço de DMEM-P, DMEM-L, DMEM-I, DMEM-V ou DMEM-LIV por 24 horas (Etapa 1). Após esse período, o meio foi coletado, armazenado e substituído por 1 mL/poço de DMEM-P, DMEM-L, DMEM-I, DMEM-V ou DMEM-LIV. Após 20 minutos, foi adicionado 1 µg/mL de LPS por poço durante 24 horas (Etapa 2) (Tabela 3).

Tabela 3. Protocolo do tratamento crônico com ACR e LPS

	ETAPA 1 - 24 HORAS	**ETAPA 2 - 24 HORAS**
DMEM	DMEM-P DMEM-L DMEM-I DMEM-V DMEM-LIV	DMEM-P DMEM-L DMEM-I DMEM-V DMEM-LIV
LPS	-	-
DMEM	DMEM-P DMEM-L DMEM-I DMEM-V DMEM-LIV	DMEM-P DMEM-L DMEM-I DMEM-V DMEM-LIV
LPS	-	1 µg/mL

No TT todos os grupos foram tratados com 1 mL/poço de DMEM-P e com 1 µg/mL de LPS por poço durante 24 horas (Etapa 1). Após esse período, o meio foi coletado, armazenado e substituído por 1 mL/poço de DMEM-P, DMEM-L, DMEM-I, DMEM-V ou DMEM-LIV. Após 20 minutos, foi adicionado 1 µg/mL de LPS por poço durante 24 horas (Etapa 2) (Tabela 4).

Tabela 4. Protocolo do tratamento tardio com ACR e LPS

	ETAPA 1 - 24 HORAS	**ETAPA 2 - 24 HORAS**
DMEM	DMEM-P	DMEM-P DMEM-L DMEM-I DMEM-V DMEM-LIV
LPS	1 µg/ml	-
DMEM	DMEM-P	DMEM-P DMEM-L DMEM-I DMEM-V DMEM-LIV
LPS	1 µg/ml	1 µg/mL

5.5.2. Ensaio MTT

O ensaio de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) foi utilizado para determinar a viabilidade celular, quantificando o MTT reduzido no meio de cultura pela atividade metabólica celular ligada ao NADH e NADPH formando cristais de formazan, de cor azul. Dessa maneira a quantidade de formazan, medida por espectrofotometria, é diretamente proporcional ao número de células viáveis.

Após os tratamentos com os ACR e ativação com LPS, o meio de cultivo foi trocado por DMEM-P (900 µL/poço) e as culturas de células foram tratadas com 100 µL da solução de MTT (5 mg/mL em PBS) por três horas e incubadas em estufa à 37 °C com atmosfera contendo 5% de CO_2. Passado o período mencionado acima, a solução de MTT foi retirada e foi adicionado, em cada poço, 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) para a dissolução dos cristais de formazan. As placas foram mantidas ao abrigo da luz, em agitação constante e à temperatura ambiente por 30 minutos.

A absorbância dos cristais de formazan dissolvidos em DMSO foi medida por espectofotometria (EL800 Universal Microplate Reader Bio-Tek® Instrumentals, Winooski, EUA) a 570 nm, com comprimento de onda de referência a 650 nm.

5.5.3. Dosagem de óxido nítrico pela Reação de Griess

A concentração de NO foi medida por meio da reação de Griess, no qual o conteúdo de nitrito (NO_2^-) medido reflete indiretamente a concentração de NO produzido.

Para essa análise, os sobrenadantes das culturas celulares foram coletados em microtubos plásticos e centrifugados à 1000 rpm por cinco minutos à 25 °C. Em seguida, 50 µL de cada alíquota foram distribuídos, em duplicata, nas placas de 96 poços na presença de 50 µL da solução de Griess, constituída pela mistura 1:1 (v/v) das soluções de sulfanilamida a 2% diluída em ácido orto-fosfórico a 5% e N-nafitil etilenodiamina (NEED) a 0,2% diluída em água e incubada por 10 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. O conteúdo de nitrito foi determinado utilizando-se, como padrão, uma curva de nitrito de

sódio ($NaNO_2$) em diluição seriada (200 a 0 mM) e a densidade óptica foi determinada por espectofotometria (EL800 Universal Microplate Reader Bio-Tek® Instrumentals, Winooski, EUA) a 540nm.

5.5.4. Dosagem de citocinas pró e anti-inflamatórias

A determinação das concentrações das citocinas IL-6, IL-10 e TNF-α foi realizada pelo método de ELISA (*Enzyme Linked Immnunosorbent Assay*) – kits R&D Systems.

O teste de ELISA foi realizado em placas de microtitulação de 96 cavidades sensibilizadas com 100 µL do anticorpo de captura por poço e incubadas em temperatura ambiente por 18 horas. Após este período, as placas foram lavadas três vezes com o tampão de lavagem contendo 0,05% de Tween 20 (300 µL por poço) e incubadas em temperatura ambiente com o reagente diluente (1% de albumina de soro bovino) (300 µL por poço) durante duas horas.

Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com o tampão de lavagem contendo 0,05% de Tween 20 (300 µL por poço) e incubadas em temperatura ambiente com as amostras de sobrenadante de cultura celular (100 µL por poço) e com os padrões, durante o período de duas horas. Após esse período, as placas foram novamente lavadas, três vezes, com o tampão de lavagem contendo 0,05% de Tween 20 (300 µL por poço) e incubadas com o anticorpo de detecção biotinilado (100 µL por poço), durante duas horas, em temperatura ambiente.

Após um novo ciclo de lavagem com o tampão de lavagem, as placas receberam estreptavidina-peroxidase (100 µL por poço) e foram incubadas por 20 minutos à temperatura ambiente. Após a lavagem das placas com o tampão de lavagem contendo 0,05% de Tween 20 (300 µL por poço), receberam a solução substrato, composta de peróxido de hidrogênio e tetrametilbenzidina (1:1) (100 µL por poço) e foram incubadas por 20 minutos à temperatura ambiente em ambiente escuro.

A reação foi, então, interrrompida pela adição de 50 µL por poço da solução *stop* (H2SO4, 2 N), e a densidade óptica foi determinada em espectofotômetro (EL800 Universal Microplate Reader Bio-Tek® Instrumentals, Winooski, EUA) a 450 nm, com comprimento de onda de correção a 570 nm.

5.5.5. Dosagem de prostaglandina E2

A determinação da concentração de prostaglandina E2 foi realizada pelo método de ELISA – kits R&D Systems.

A dosagem de prostaglandina foi realizada em placas de microtitulação de 96 cavidades sensibilizadas com anticorpo policlonal anti-camundongo. Em cada poço da placa foram adicionados 150 µL de diluente calibrador, seguido pela adição de 150 µl da curva padrão (2500 pg/mL a 39 pg/mL) ou das amostras diluídas no diluente calibrador. Imediatamente, 50 µL da solução do anticorpo primário foram adicionados e as placas foram incubadas por uma hora à temperatura ambiente e sob agitação orbital constante (500 rpm).

Após esse período, foram adicionados 50 µL de PGE2 conjugada com peroxidase de raiz forte em cada poço e as placas foram novamente incubadas à temperatura ambiente e sob agitação orbital contínua por duas horas. As placas foram lavadas quatro vezes com o tampão de lavagem contendo 0,05% de Tween 20 (300 µL por poço)

Em seguida, foram adicionados 200 µL da solução substrato e as placas foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente sem agitação. Foram adicionados 100 µL da solução *stop* (H2SO4, 2 N) em cada poço e a densidade óptica foi determinada em espectofotômetro (EL800 Universal Microplate Reader Bio-Tek® Instrumentals, Winooski, EUA) a 450 nm, com comprimento de onda de correção a 570 nm.

5.6. Avaliação dos mecanismos intracelulares

5.6.1. Protocolo de suplementação e de ativação das células com LPS

Para avaliação dos mecanismos de ativação intracelular, foram utilizados os protocolos de PT e de TC apenas. Entretanto, na Etapa 2, em vez de 24 horas de tratamento com ACR e de estímulo com LPS, foi utilizado o período de uma hora para ambos os protocolos.

5.6.2. *Western blotting*

A ativação das proteínas intracelulares mTORC1$^{(Ser2448)}$, mTORC2$^{(Ser\ 2481)}$, IKK$^{(Ser176/180)}$, IkBα$^{(Ser32)}$ e NF-kB$^{(Ser536)}$ foi avaliada pelo método de *western blotting* descrito a seguir.

5.6.2.1. Preparo do gel de poliacrilamida

Foram preparados géis em bicamada, sendo a camada superior (gel de empilhamento) constituída de acrilamida a 5%, 125 mM Tris pH 6,8, 0,1% SDS, 0,1% persulfato de amônio e 0,1 % TEMED. O gel inferior (resolutivo) foi preparado com 6 a 10 % de poliacrilamida, 380 mM Tris.HCl (pH 8,8), 0,1 % persulfato de amônio e 0,077 % TEMED.

5.6.2.2. Preparo de lisado de proteínas para SDS-PAGE

Os lisados celulares foram preparados a partir de $3x10^6$ células em tampão RIPA (0,1 % SDS, 1 % Igepal CA-630, 1 % deoxicolato de sódio, 10 mM Tris.HCL, pH 7,5, 150 mM NaCl, 2 µg/mL aprotinina, 1 µg/mL leupeptina, 100 µg/mL PMSF, 0,5 mM EDTA). O material foi centrifugado por 10 minutos, a 20.000 rpm, e 4 °C. O sobrenadante foi coletado e acrescido de tampão Laemmli (4x concentrado, 100 mM Tris.HCL, pH 6,8, 5 % 2-mercaptoetanol (v/v), 2 % SDS, 20 % glicerol, 0,01 % azul de bromofenol) na proporção 4:1. Posteriormente, a mistura de sobrenadante e tampão foi fervida por 10 minutos e submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida. Como padrão foi utilizado o

marcador de peso molecular *ECL DualVue western blotting* (GE Healthcare Life Sciences).

5.6.2.3. Transferência de proteínas do gel para a membrana de difluoreto de polivinilideno

Inicialmente, a membrana de difluoreto de nitrocelulose foi incubada em solução de TBST por 1 minuto para sua hidratação. Um "sanduíche" foi então montado na seguinte ordem: esponja, papel filtro de 5 mm, gel de poliacrilamida, membrana de nitrocelulose, papel filtro de 5 mm e esponja. A transferência de proteínas do gel para a membrana foi realizada em cuba de eletroforese, na presença de tampão de transferência por 3 horas. A eficiência da transferência foi verificada corando-se a membrana por 5-10 min com corante Ponceau (1% Ponceau, 1 % ácido acético), seguida de lavagem com TBST (Tris, pH 7,5, 20 mM, NaCl 0,9 %, Tween 20 0,05%).

5.6.2.4. Sondagens das proteínas com anticorpos

Os sítios sem proteínas da membrana foram bloqueados com albumina (Fração-V) a 5%, em tampão TBST por 1 hora sob agitação contínua. Posteriormente, a membrana foi novamente lavada com TBST e incubada *overnight* em solução de TBST e albumina à 3% com anticorpo primário monoclonal na diluição especificada pelo fabricante (Cell Signaling, Boston, EUA). Após esse período, a membrana foi novamente lavada com TBST e incubada com anticorpo secundário conjugado com peroxidase de raiz forte, diluído 1:5.000 em tampão TBST com leite desnatado a 5 % por 2 horas sob agitação contínua. Foi realizado um novo ciclo de lavagem e, em seguida, foi realizada a revelação da membrana

5.6.2.5. Revelação com sistema quimioluminescente

A solução de revelação foi preparada a partir da mistura dos reagentes A e B do kit ECL (GE Healthcare, Nova York, EUA) na proporção de 1:1. Essa solução, quando colocada sobre a membrana de nitrocelulose, resulta em uma

reação de quimioluminescência. A aquisição e a análise da imagem resultante foram realizadas por meio de um sistema de imagem digital (IMAGE QUANT™ 400 versão 1.0.0), utilizando o software ImageQuant™ Capture Software.

6. RESULTADOS

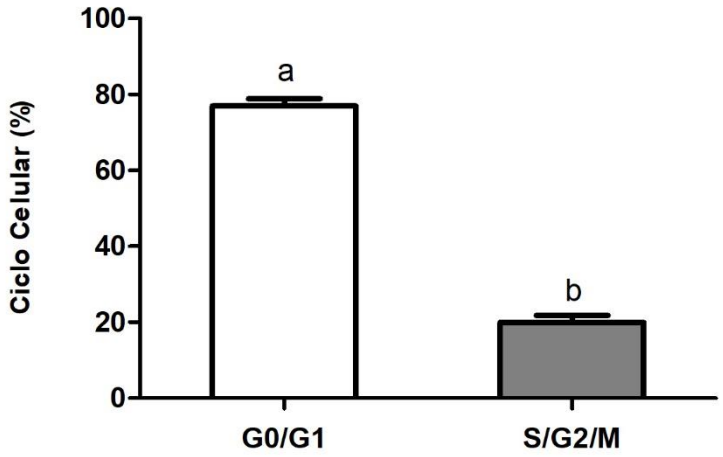
6.1. Padronização das análises

6.1.1. Sincronização do ciclo celular e avaliação da viabilidade celular

O ensaio de sincronização do ciclo celular foi realizado com o intuito de padronizar as culturas de células nas fases G0/G1 do ciclo celular. Após a privação de SFB, 78% das células apresentaram parada em G0/G1 em contraste com 22% nas fases S/G2/M do ciclo (Figura 10).

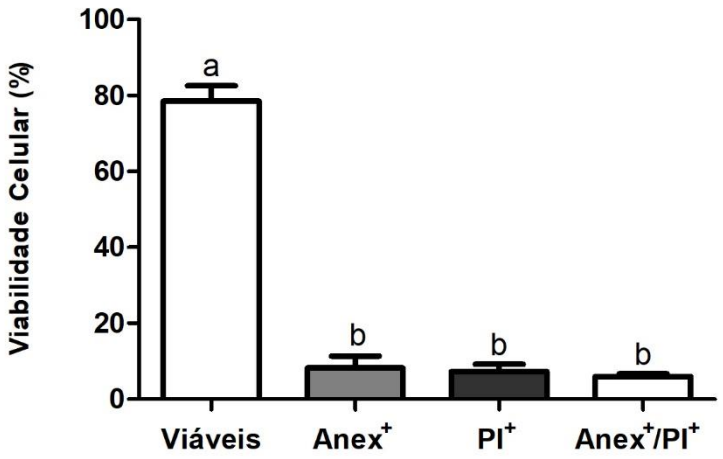
O ensaio de viabilidade celular foi realizado com o intuito de constatar a exequibilidade do procedimento de sincronização do ciclo celular. As células apresentaram 77% de viabilidade, em contraste, 7% das células foram marcadas com Anexina-V, indicando morte por apoptose celular, 8% foram marcadas com Iodeto de Propídeo, indicando morte por necrose celular e 7% foram marcadas por Anexina-V e Iodeto de Propídeo, indicando apoptose tardia ou necro-apoptose (Figura 11).

Figura 10. Sincronização do ciclo celular das células RAW 264.7



Resultados expressos em média ± desvio padrão (N=3/grupo). Contrastes calculados por teste T de *Mann Whitney* ($p<0,05$). Letras diferentes expressam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. **G0/G1; S/G2/M** = fases do ciclo celular.

Figura 11. Viabilidade das células RAW 264.7 após tratamento com SFB.



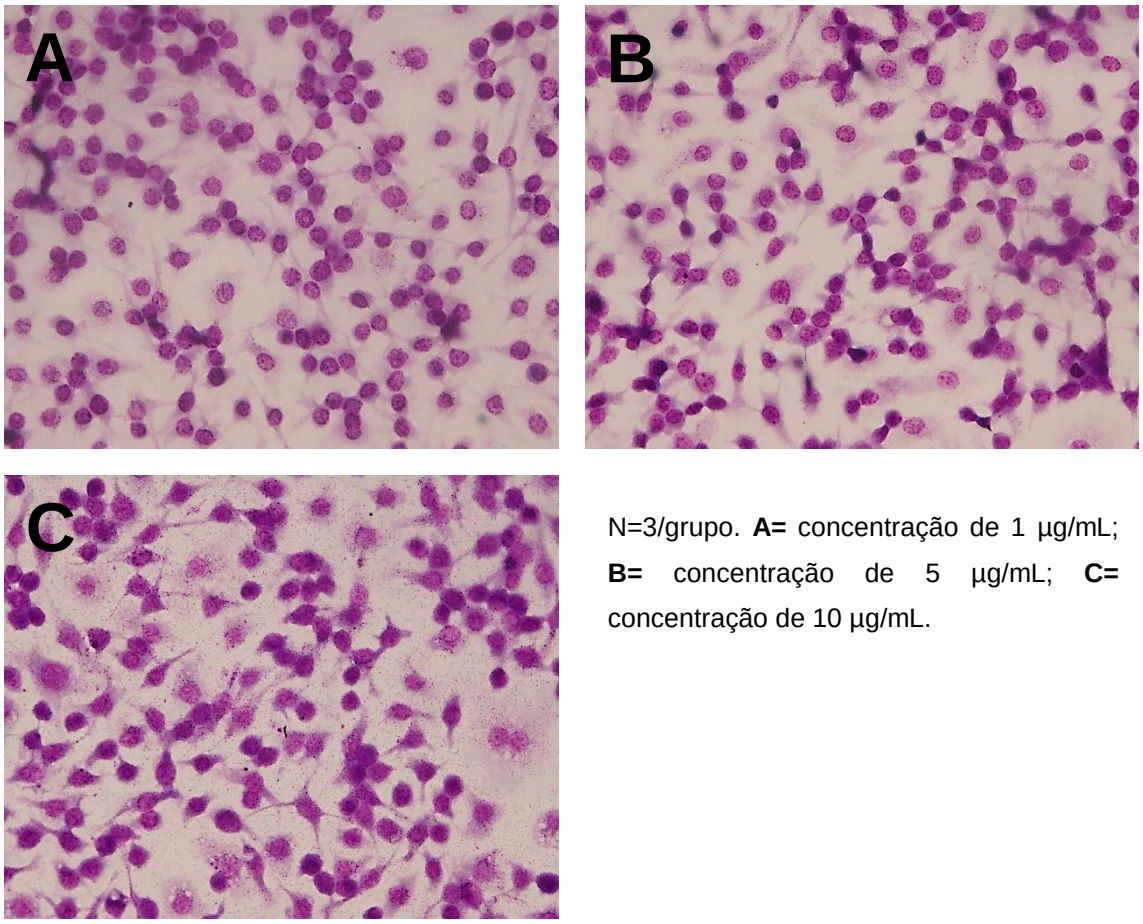
Resultados expressos em média ± desvio padrão (N=3/grupo). Contrastes calculados por *Anova One-way* seguida por pós-teste de Tukey ($p<0,05$). Letras diferentes expressam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. **Anex$^+$=** células marcadas por Anexina-V; **PI$^+$=** células marcadas por Iodeto de Propídeo; **Anex$^+$/PI$^+$=** células marcadas por Anexina-V e Iodeto de Propídeo.

6.1.2. Avaliação das concentrações de LPS

As células estimuladas com diferentes concentrações de LPS não apresentaram comprometimento da morfologia, da estrutura da membrana celular, ou formação de grânulos, demonstrando que todas as concentrações de LPS são seguras para induzir o estado inflamatório nas células sem comprometimento morfológico. Para tanto, foi utilizada a menor concentração de 1 µg/mL de LPS para todas as análises (Figura 12).

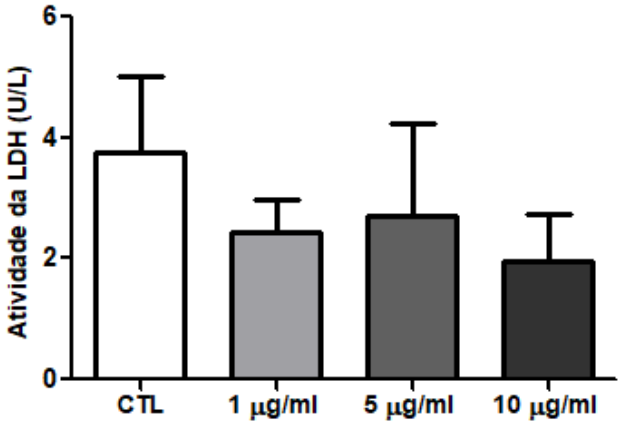
Em relação ao teste da atividade da enzima LDH, não houve diferença significativa na concentração de LDH após estímulo com LPS em nenhuma das concentrações de LPS em relação ao grupo controle (Figura 13).

Figura 12. Morfologia das células RAW 264.7 após estímulo com LPS.



N=3/grupo. **A=** concentração de 1 µg/mL; **B=** concentração de 5 µg/mL; **C=** concentração de 10 µg/mL.

Figura 13. Concentração de LDH após estímulo com LPS



Resultados expressos em média ± desvio padrão (N=3/grupo). Contrastes calculados por *Anova One-way* seguida por pós-teste de Tukey ($p<0.05$). **CTL=** grupo controle. **Concentrações de LPS=** 1 µg/mL, 5 µg/mL e 10 µg/mL.

6.2. Avaliação dos parâmetros inflamatórios

6.2.1. Ensaio MTT

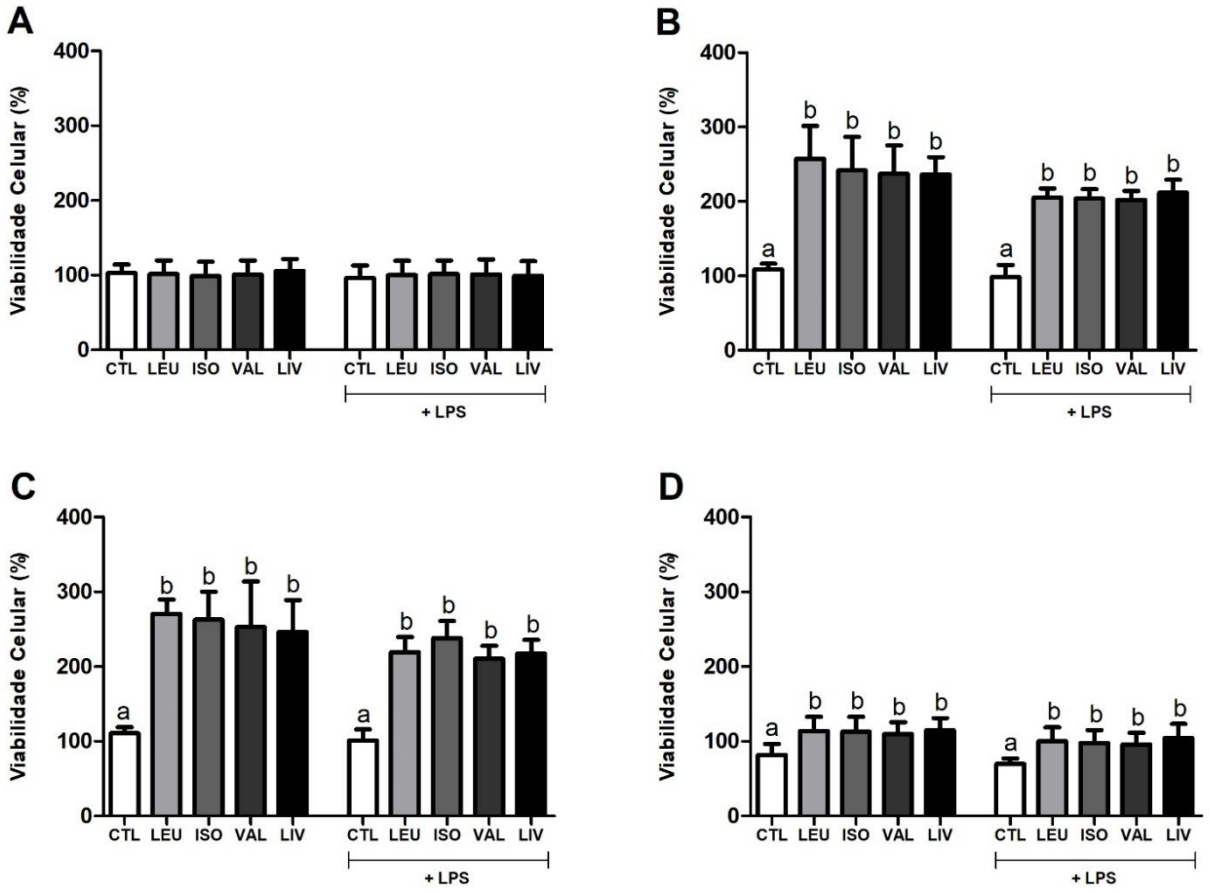
As células submetidas ao tratamento com MTT não apresentaram comprometimento da viabilidade celular. Não houve diferença significativa entre os grupos no PT (Figura 14A).

No TA, houve aumento significativo da viabilidade celular em todos os grupos suplementados não estimulados com LPS em relação ao grupo CTL ($p<0,001$). Nos grupos estimulados com LPS, também houve aumento significativo da viabilidade celular em todos os grupos suplementados em relação ao grupo CTL ($p<0,001$) (Figura 14B).

No TC, todos os grupos suplementados não estimulados com LPS apresentaram aumento significativo da viabilidade celular em relação grupo CTL ($p<0,001$). Os grupos suplementados estimulados com LPS também apresentaram aumento significativo da viabilidade celular em relação ao grupo controle ($p<0,001$) (Figura 14C).

No TT, houve aumento significativo da viabilidade celular nos grupos LEU ($p<0,01$), ISO ($p<0,05$), VAL ($p<0.05$) e LIV ($p<0,01$) em relação ao grupo CTL, quando estimulados com LPS apenas na etapa 1. Foi observado aumento significativo da viabilidade celular nos grupos LEU ($p<0,01$), ISO ($p<0,05$), VAL ($p<0,05$) e LIV ($p<0,01$) em relação ao grupo CTL, quando estimulados com LPS na etapa 1 e 2 (Figura 14D).

Figura 14. Viabilidade das células RAW 264.7 pelo ensaio de MTT



Resultados expressos em média ± desvio padrão (N=8/grupo). Contrastes calculados por *Anova One-way* seguida por pós-teste de Tukey ($p<0.05$). Letras diferentes expressam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. **CTL=** grupo controle sem suplementação com ACR; **LEU=** grupo suplementado com 1,2 mmol/L de leucina; **ISO=** grupo suplementado com 1,2 mmol/L de isoleucina; **VAL=** grupo suplementado com 1,2 mmol/L de valina; **LIV=** grupo suplementado com 1,2 mmol/L de leucina, isoleucina e valina; **LPS=** 1 µg/mL.

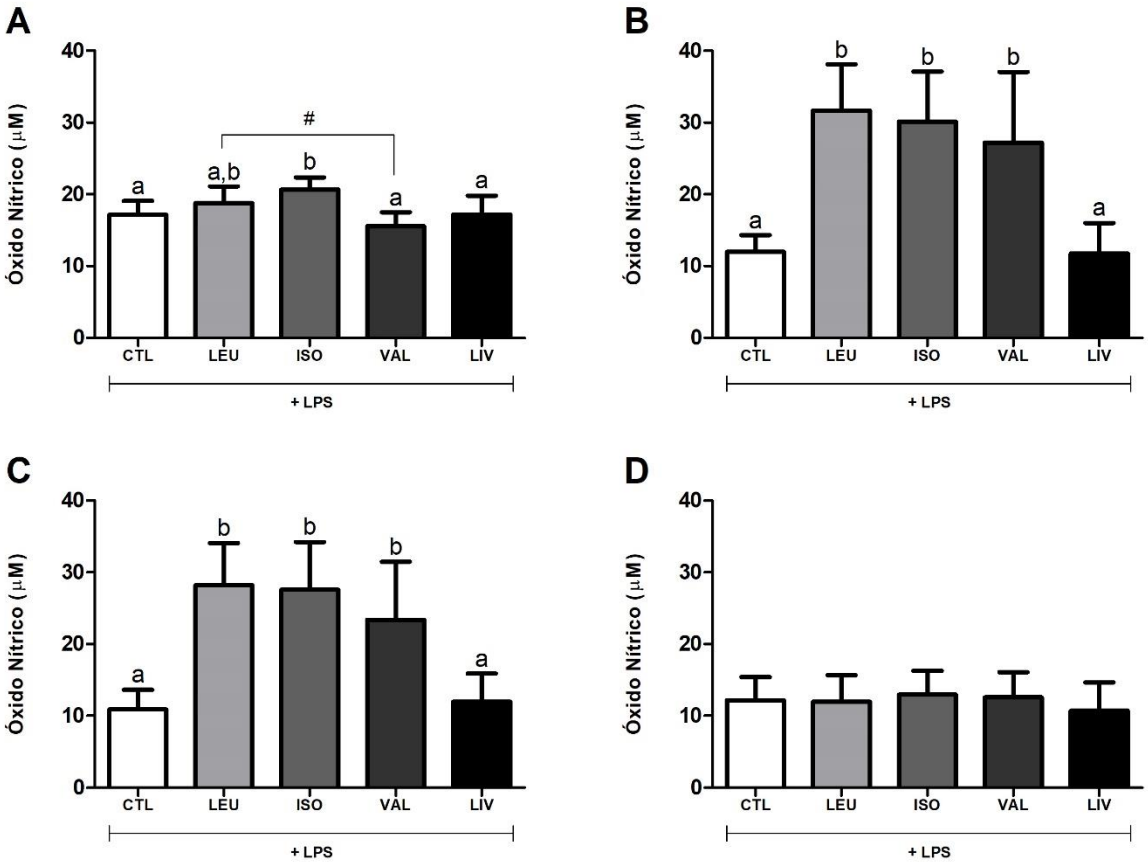
6.2.2. Dosagem de óxido nítrico pela reação de Griess

A dosagem de NO realizada por meio da reação de Griess foi realizada no sobrenadante das culturas celulares. No PT, houve aumento significativo da síntese de NO no grupo ISO em relação ao grupo CTL ($p<0,05$), no grupo LEU em relação ao grupo VAL ($p<0,05$), e no grupo ISO em relação aos grupos VAL (0,001) e LIV (0,05) (Figura 15A).

No TA, houve aumento significativo da síntese de NO nos grupos LEU, ISO e VAL em relação ao grupo CTL (p<0,001) e nos grupos LEU, ISO e VAL em relação ao grupo LIV (p<0,001) (Figura 15B).

No TC, houve aumento significativo da síntese de NO nos grupos LEU (p<0,001), ISO (p<0,001) e VAL (p<0,01) em relação ao grupo CTL, nos grupos LEU e ISO em relação ao grupo LIV (p<0,001) e no grupo VAL em relação ao grupo LIV (p<0,01) (Figura 15C). No TT, não houve diferença significativa entre os grupos em relação a síntese de NO (Figura 15D).

Figura 15. Síntese de NO pelas células RAW 264.7

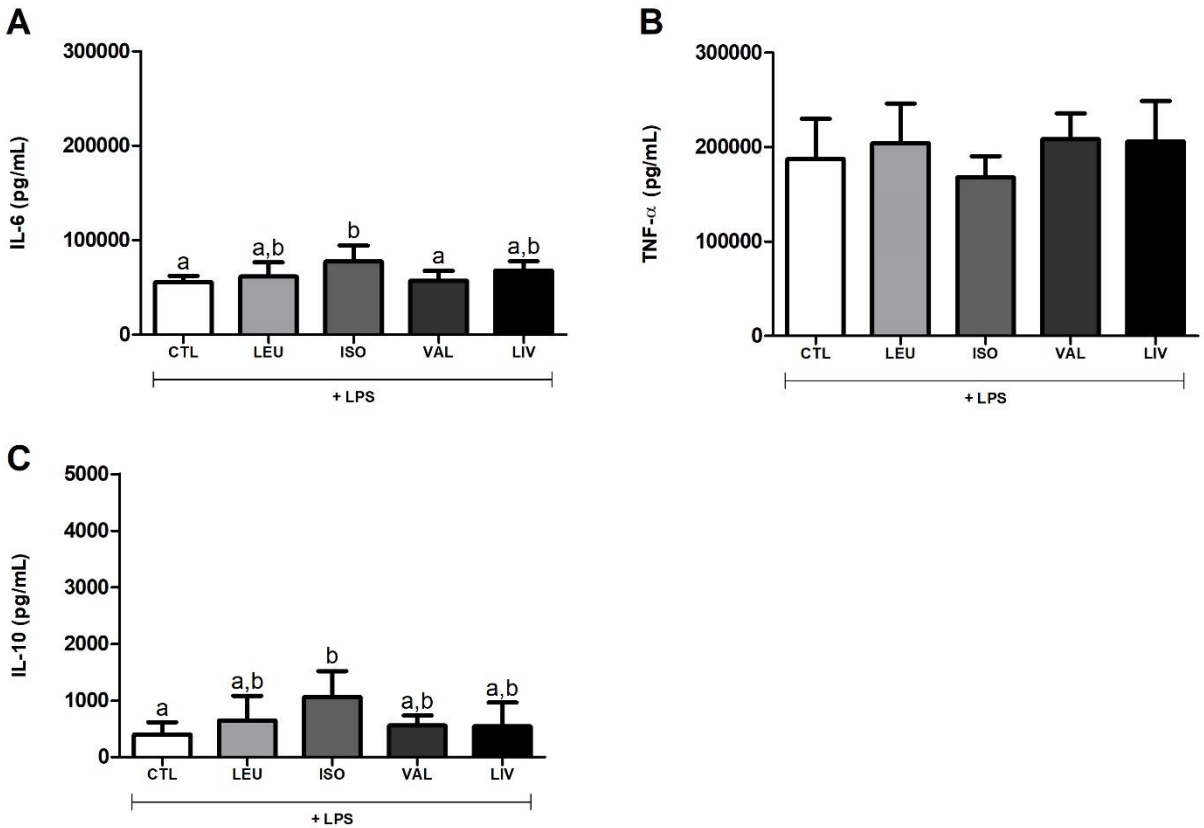


Resultados expressos em média ± desvio padrão (N=8/grupo). Contrastes calculados por *Anova One-way* seguida por pós-teste de Tukey (p<0.05). Letras e símbolos diferentes expressam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. **CTL=** grupo controle sem suplementação com ACR; **LEU=** grupo suplementado com 1,2 mmol/L de leucina; **ISO=** grupo suplementado com 1,2 mmol/L de isoleucina; **VAL=** grupo suplementado com 1,2 mmol/L de valina; **LIV=** grupo suplementado com 1,2 mmol/L de leucina, isoleucina e valina; **LPS=** 1 µg/mL.

6.2.3. Dosagem de citocinas pró e anti-inflamatórias

A dosagem de citocinas pró e anti-inflamatórias foi realizada com o sobrenadante da cultura celular. No PT, houve aumento significativo na síntese de IL-6 no grupo ISO em relação ao grupo CTL e ao grupo VAL ($p<0,05$) (Figura 16A). Também houve aumento na síntese de IL-10 no grupo ISO em relação ao grupo CTL ($p<0,01$) (Figura 16C). Não houve diferença significativa entre os grupos em relação a síntese de TNF-α (Figura 16B).

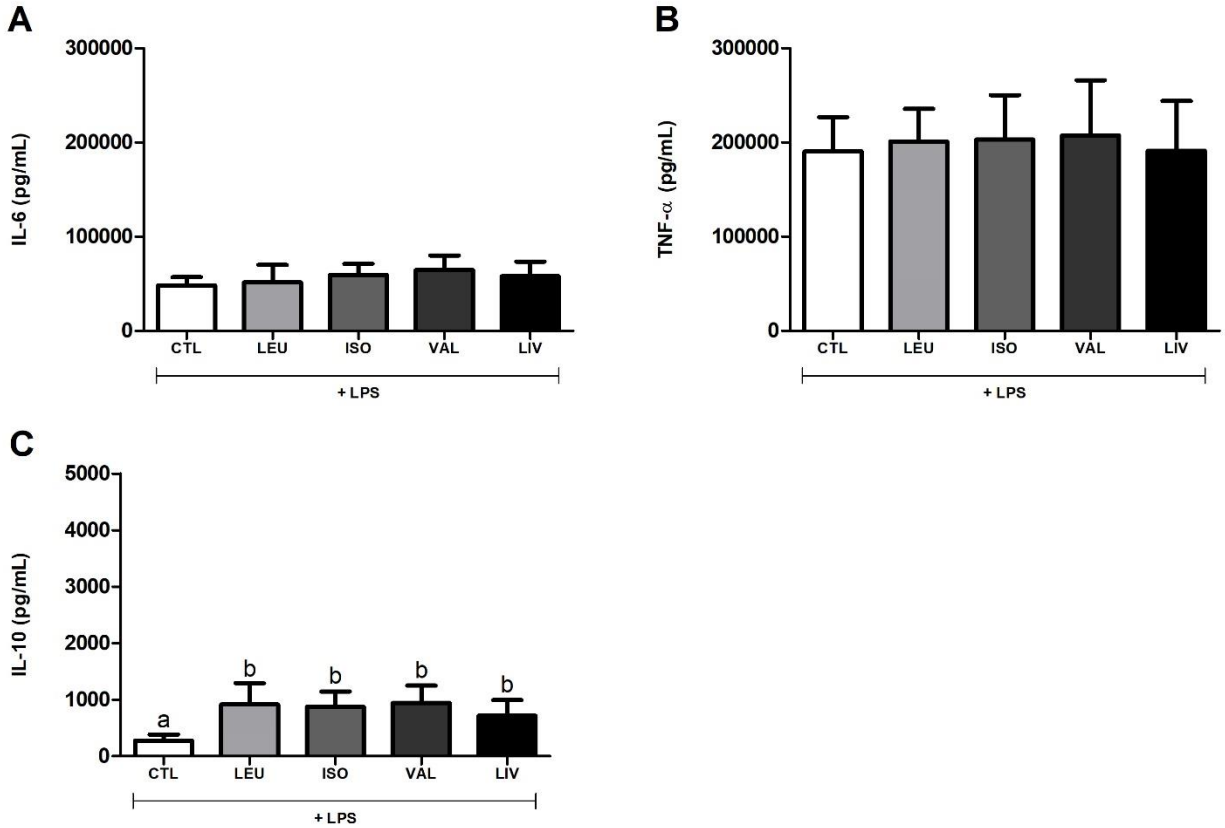
Figura 16. Síntese de citocinas pelas células RAW 264.7 no PT



Resultados expressos em média ± desvio padrão (N=8/grupo). Contrastes calculados por *Anova One-way* seguida por pós-teste de Tukey ($p<0.05$). **CTL=** grupo controle sem suplementação com ACR; **LEU=** grupo suplementado com 1,2 mmol/L de leucina; **ISO=** grupo suplementado com 1,2 mmol/L de isoleucina; **VAL=** grupo suplementado com 1,2 mmol/L de valina; **LIV=** grupo suplementado com 1,2 mmol/L de leucina, isoleucina e valina; **LPS=** 1 µg/mL.

No TA, não houve diferença significativa entre os grupos em relação a síntese de IL-6 e TNF-α (Figuras 17A e 17 B). Houve aumento significativo na síntese de IL-10 nos grupos LEU (p<0,01), ISO (p<0,01), VAL (p<0,001) e LIV (p<0,05) em relação ao grupo CTL (Figura 17C).

Figura 17. Síntese de citocinas pelas células RAW 264.7 no TA

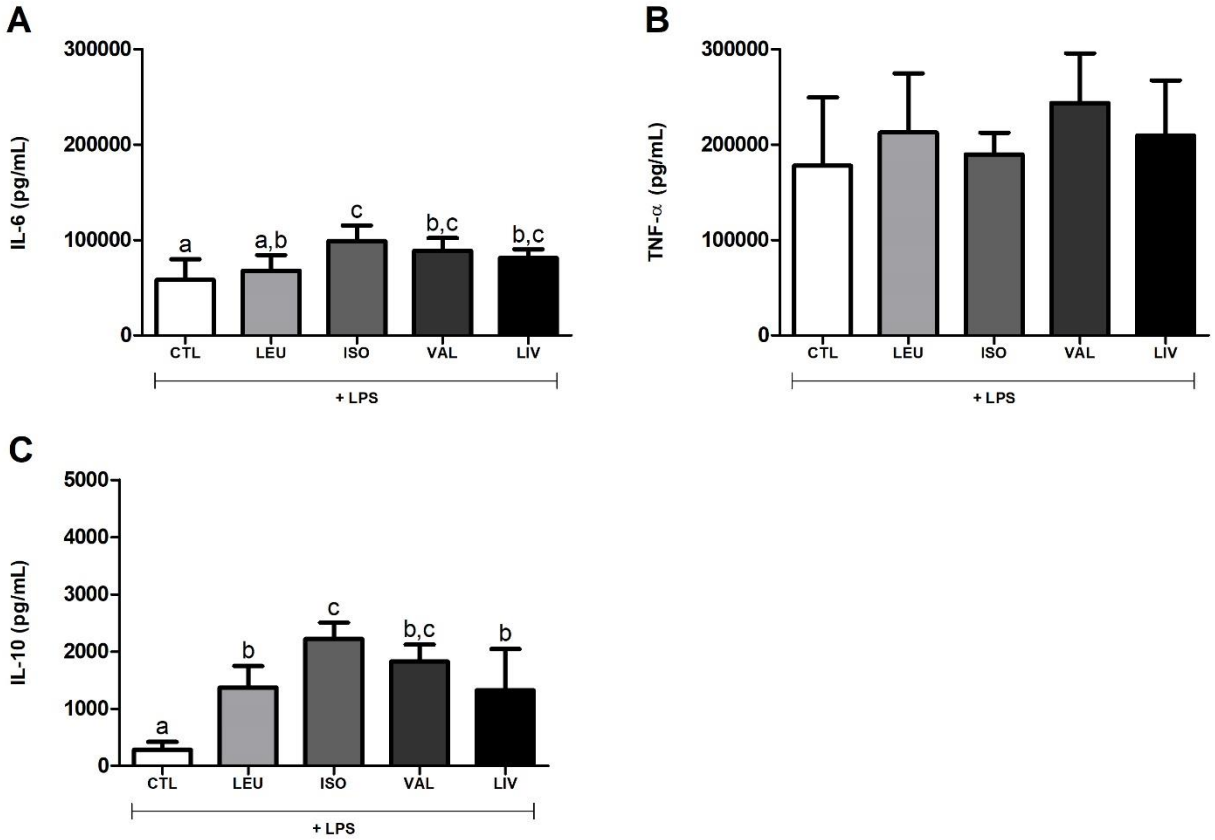


Resultados expressos em média ± desvio padrão (N=8/grupo). Contrastes calculados por *Anova One-way* seguida por pós-teste de Tukey (p<0.05). **CTL=** grupo controle sem suplementação com ACR; **LEU=** grupo suplementado com 1,2 mmol/L de leucina; **ISO=** grupo suplementado com 1,2 mmol/L de isoleucina; **VAL=** grupo suplementado com 1,2 mmol/L de valina; **LIV=** grupo suplementado com 1,2 mmol/L de leucina, isoleucina e valina; **LPS=** 1 µg/mL.

No TC, não houve diferença significativa entre os grupos em relação a síntese de TNF-α (Figura 18B). Houve aumento significativo na síntese de IL-6 nos grupos ISO (p<0,001), VAL (p<0,01) e LIV (p<0,05) em relação ao grupo CTL e no grupo ISO em relação ao grupo LEU (p<0.01) (Figura 18A). Também houve aumento significativo na síntese de IL-10 nos grupos LEU, ISO, VAL e LIV

em relação ao grupo CTL (p<0,001) e no grupo ISO em relação ao grupo LEU e LIV (p<0,01) (Figura 18C).

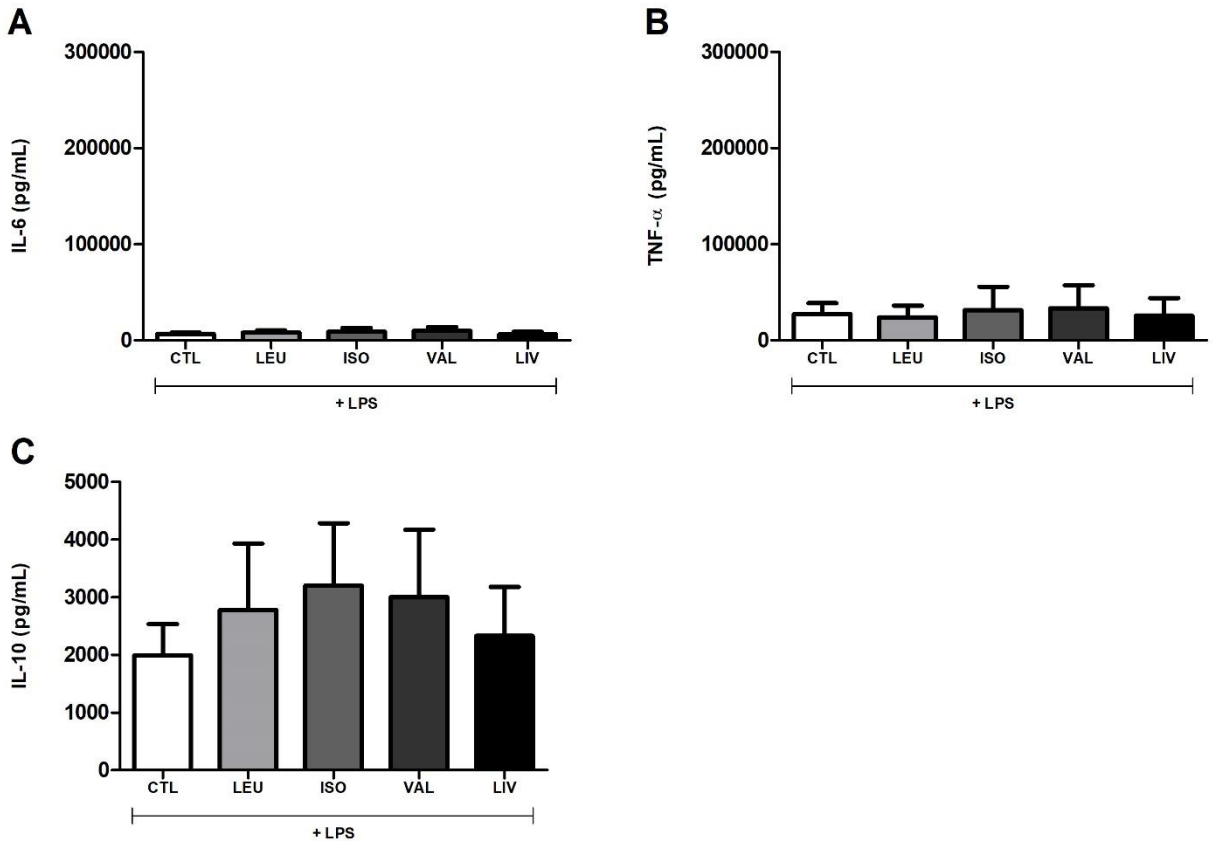
Figura 18. Síntese de citocinas pelas células RAW 264.7 no TC



Resultados expressos em média ± desvio padrão (N=8/grupo). Contrastes calculados por *Anova One-way* seguida por pós-teste de Tukey (p<0.05). **CTL=** grupo controle sem suplementação com ACR; **LEU=** grupo suplementado com 1,2 mmol/L de leucina; **ISO=** grupo suplementado com 1,2 mmol/L de isoleucina; **VAL=** grupo suplementado com 1,2 mmol/L de valina; **LIV=** grupo suplementado com 1,2 mmol/L de leucina, isoleucina e valina; **LPS=** 1 µg/ml.

No TT, não houve diferença significativa entre os grupos em relação a síntese de IL-6, TNF-α e IL-10 (Figura 19A, 19B e 19C).

Figura 19. Síntese de citocinas pelas células RAW 264.7 no TT

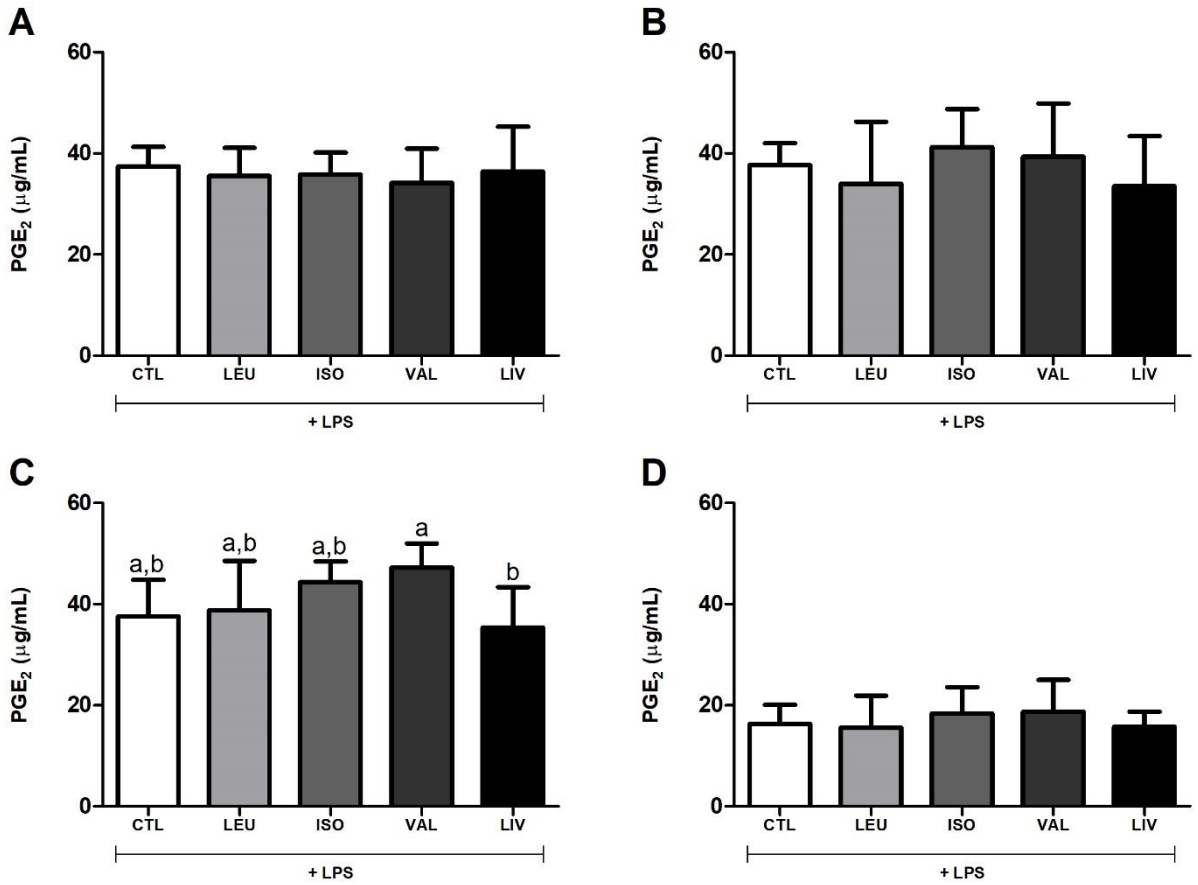


Resultados expressos em média ± desvio padrão (N=8/grupo). Contrastes calculados por *Anova One-way* seguida por pós-teste de Tukey ($p<0.05$). **CTL=** grupo controle sem suplementação com ACR; **LEU=** grupo suplementado com 1,2 mmol/L de leucina; **ISO=** grupo suplementado com 1,2 mmol/L de isoleucina; **VAL=** grupo suplementado com 1,2 mmol/L de valina; **LIV=** grupo suplementado com 1,2 mmol/L de leucina, isoleucina e valina; **LPS=** 1 µg/mL.

6.2.4. Dosagem de prostaglandina E2

A dosagem de PGE2 foi realizada com o sobrenadante da cultura celular. Não houve diferença significativa entre os grupos no PT, no TA e no TT (Figura 20A, 20B e 20D). No TC, houve aumento significativo da síntese de PGE2 no grupo VAL em relação ao grupo LIV ($p<0,05$) (Figura 20C).

Figura 20. Síntese de PGE2 pelas células RAW 264.7



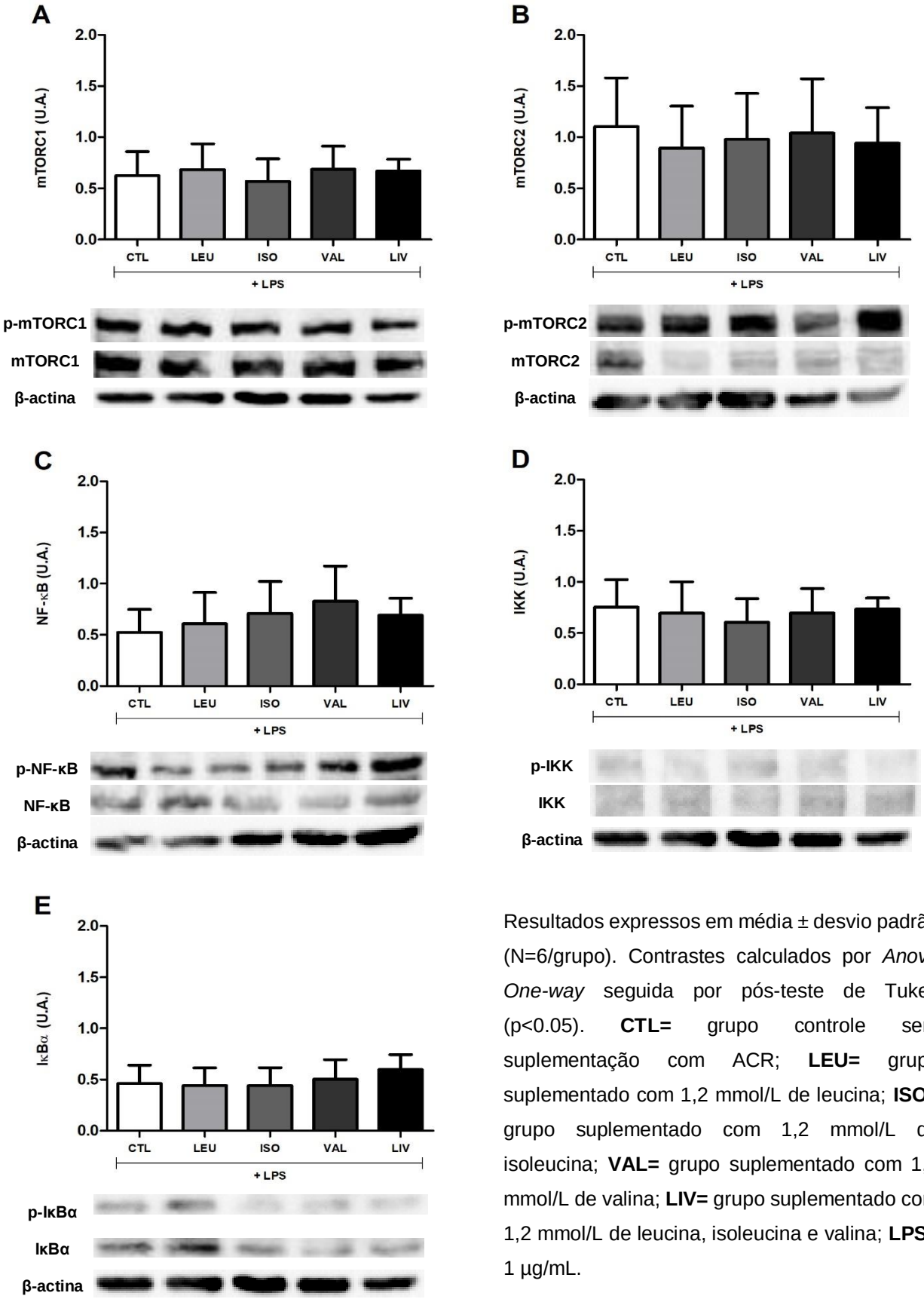
Resultados expressos em média ± desvio padrão (N=8/grupo). Contrastes calculados por *Anova One-way* seguida por pós-teste de Tukey ($p<0.05$). **CTL=** grupo controle sem suplementação com ACR; **LEU=** grupo suplementado com 1,2 mmol/L de leucina; **ISO=** grupo suplementado com 1,2 mmol/L de isoleucina; **VAL=** grupo suplementado com 1,2 mmol/L de valina; **LIV=** grupo suplementado com 1,2 mmol/L de leucina, isoleucina e valina; **LPS=** 1 µg/mL.

6.3. Avaliação dos mecanismos intracelulares

6.3.1. *Western blotting*

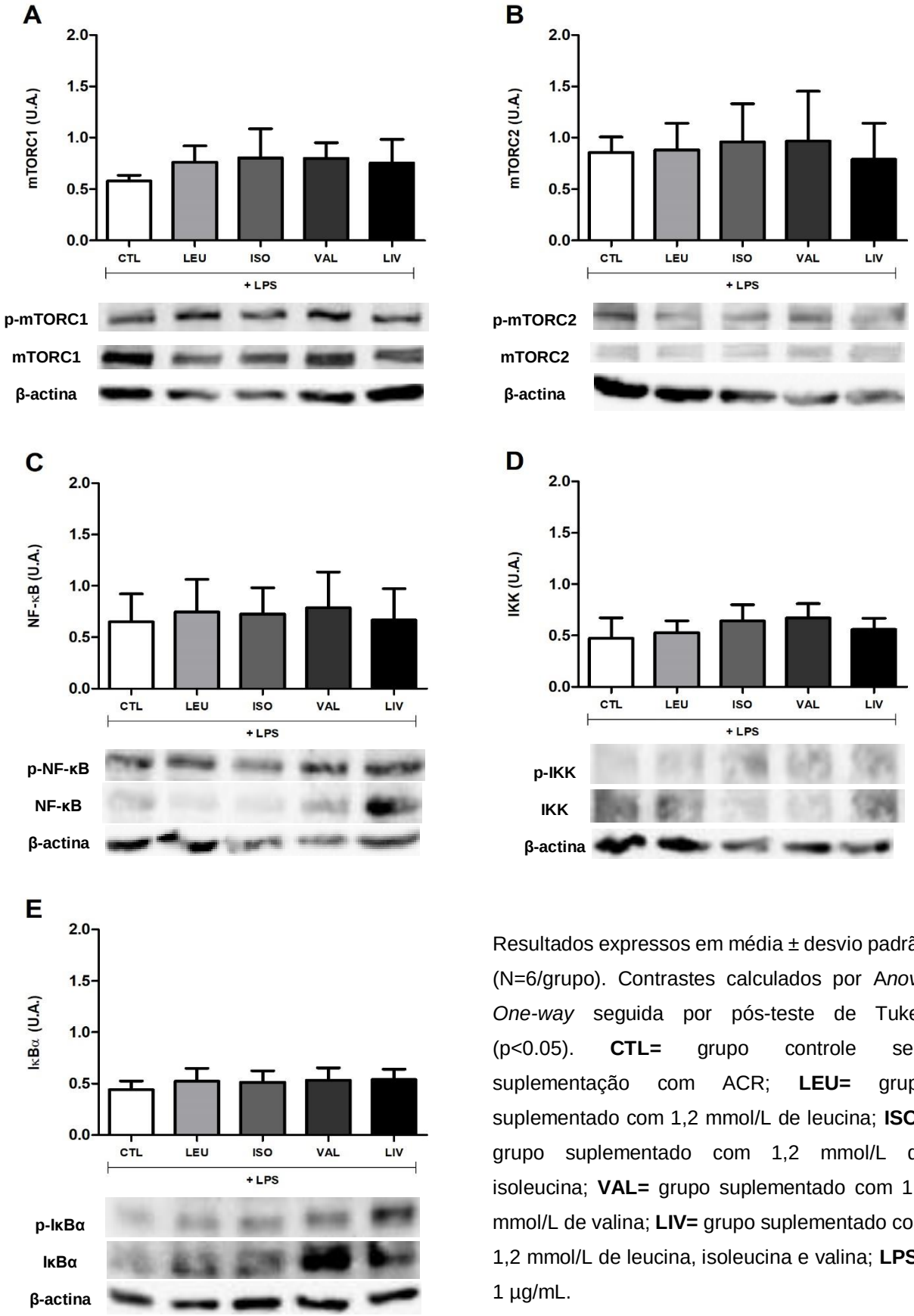
A ativação das proteínas intracelulares mTORC1, mTORC2, IKK, IkBα e NF-kB foi avaliada pelo método de *western blotting* e os valores foram expressos em unidades arbitrárias. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos em todas as proteínas avaliadas tanto no PT (Figura 21) quanto no TC (Figura 22).

Figura 21. Ativação das proteínas intracelulares no PT



Resultados expressos em média ± desvio padrão (N=6/grupo). Contrastes calculados por *Anova One-way* seguida por pós-teste de Tukey ($p<0.05$). **CTL=** grupo controle sem suplementação com ACR; **LEU=** grupo suplementado com 1,2 mmol/L de leucina; **ISO=** grupo suplementado com 1,2 mmol/L de isoleucina; **VAL=** grupo suplementado com 1,2 mmol/L de valina; **LIV=** grupo suplementado com 1,2 mmol/L de leucina, isoleucina e valina; **LPS=** 1 µg/mL.

Figura 22. Ativação das proteínas intracelulares no TC



Resultados expressos em média ± desvio padrão (N=6/grupo). Contrastes calculados por A*nova One-way* seguida por pós-teste de Tukey ($p<0.05$). **CTL=** grupo controle sem suplementação com ACR; **LEU=** grupo suplementado com 1,2 mmol/L de leucina; **ISO=** grupo suplementado com 1,2 mmol/L de isoleucina; **VAL=** grupo suplementado com 1,2 mmol/L de valina; **LIV=** grupo suplementado com 1,2 mmol/L de leucina, isoleucina e valina; **LPS=** 1 µg/mL.

7. DISCUSSÃO

No presente trabalho foi proposta a avaliação dos parâmetros funcionais, inflamatórios e moleculares das células RAW 264.7 estimuladas com LPS sob diferentes protocolos de suplementação com ACR. Inicialmente, as culturas de células foram submetidas aos protocolos de padronização, que compreendem os ensaios de sincronização, viabilidade e toxicidade celular.

Visto que, os eventos moleculares e bioquímicos diferem entre as fases do ciclo celular, inclusive no que tange a incorporação de aminoácidos, que é superior na fase S[17,18], a sincronização das células submetidas aos diferentes protocolos de suplementação é de suma importância para garantir a concentração adequada de ACR durante o período completo de tratamento e a resposta homogênea entre às culturas após os tratamentos.

Neste sentido, diferentes protocolos são utilizados para induzir o estado de quiescência em culturas celulares, como a inibição do crescimento por contato célula-célula, a adição de drogas, a elutriação centrífuga e a privação de SFB.[138–140]

Entretanto, tratando-se de células de linhagem, como a RAW 264.7, a indução do estado de quiescência por meio do contato célula-célula torna-se inviável, uma vez que estas células, ao serem submetidas à confluência máxima nas garrafas de cultivo, tendem a multiplicar-se umas sobre as outras, desprendendo-se da superfície de aderência, promovendo a morte celular.

Por outro lado, a adição de drogas, como a lovastatina, amplamente utilizada em ensaios *in vitro*, pode induzir mecanismos apoptóticos em grande variedade de células de linhagem. Ademais, a elutriação centrífuga baseia-se na diferença do tamanho das células entre as fases do ciclo celular para promover a separação. Na fase G1, as células apresentam aproximadamente metade do tamanho das células na fase G2 e M e na fase S, estas células apresentam um tamanho intermediário.[138,141] Nesse sentido, esse método é aplicado quando se objetiva a separação das células nos diferentes estágios do ciclo celular e não na indução do estado de quiescência pretendido.

Dessa forma, a utilização do protocolo de privação do SFB apresenta-se como um método eficaz para induzir o estado de quiescência em células de linhagem. Adicionalmente, neste estudo, para assegurar a aplicabilidade desse

método, foi realizado o ensaio de viabilidade celular, em que foi constatado que as culturas de células não apresentam comprometimento após a privação com SFB por 24 horas.

Após a padronização dos experimentos, prosseguiu-se com a avaliação dos parâmetros funcionais e inflamatórios das células RAW 264.7 *in vitro*.

Embora estudos relatem que os ACR prejudicam as funções mitocondriais devido a síntese de radicais livres[142], os resultados obtidos no teste de viabilidade por MTT demonstraram que não há comprometimento celular mediante a suplementação com ACR. Estes resultados corroboram os resultados de De Simone et al.[53], em que a suplementação com ACR (1 mM ou 10 mM) por 24 horas em células da micróglia, não apresentou dano mitocondrial.

Ademais, no presente estudo, apesar da citotoxidade induzida pela adição de LPS, também não houve comprometimento da atividade mitocondrial e da morfologia celular. O aumento da viabilidade celular nos grupos suplementados indica que a presença dos ACR no meio de cultura celular durante o estado inflamatório é essencial para a obtenção deste resultado, visto que, apenas no PT esse parâmetro não foi alterado, mesmo nos grupos não estimulados com LPS.

Em relação a síntese de NO, a suplementação com ACR foi capaz de aumentar a síntese desse mediador inflamatório em três dos quatro tratamentos propostos (PT, TA e TC). Adicionalmente, é importante destacar que, especialmente no TA e no TC, os grupos suplementados com ACR individualmente apresentaram maior aumento da síntese de NO em comparação ao grupo LIV, no qual os ACR são adicionados concomitantemente.

Uma vez que os ACR não são precursores diretos de NO, o aumento da síntese desse mediador inflamatório após a suplementação com ACR pode ser explicado pelo aumento da expressão gênica do transportador de arginina, o CAT1, induzido pela leucina,[71] pelo aumento da síntese de TNF-α, um importante ativador da iNOS[143,144] e, para suprir a demanda de arginina mediante esses estímulos, pelo aumento da conversão dos ACR em glutamina que, por sua vez, é convertida em citrulina e, posteriormente, em arginina, sendo esta a percursora direta de NO.[145]

Estudos mostram que macrófagos ativados aumentam significativamente a demanda por arginina e a atividade da argininosuccinato sintase a fim de sustentar a síntese de NO frente ao estímulo com LPS.[146]

Ademais, outros estudos mostram que a síntese de NO em macrófagos tratados com ACR é dose dependente, sendo que altas concentrações de ACR reduzem a síntese desse mediador inflamatório. Esse resultado corrobora os resultados obtidos no grupo LIV, no qual houve menor síntese de NO em relação aos grupos suplementados individualmente.[57,58]

A menor síntese de NO mediante a altas doses de ACR também pode ser explicada pelo mecanismo proposto acima, uma vez que os ACR dependem da concentração de glutamina intracelular para serem transportados, quando a glutamina está presente em quantidades inferiores às dos ACR, estes não conseguem ser transportados para o interior da célula e tampouco serem convertidos em glutamina, o que resulta na menor síntese de NO. Nesse sentido, a suplementação com ACR deve estar associada a concentrações equivalentes de glutamina, com o intuito de manter a homeostase no transporte e na oxidação desses aminoácidos.

Embora o NO apresente potencial benéfico relacionado ao aumento da propriedade microbicida de macrófagos, da perfusão sanguínea e do consequente aumento da oxigenação tecidual e do aporte de nutrientes, quando presente em altas concentrações, o NO pode promover efeitos citotóxicos a partir da reação com o radical superóxido (O^{2-}) culminando na formação de peroxinitrito ($ONOO^{-}$) envolvido no processo de lesão tecidual,[147] o que inclui dano nuclear, alterações nos fosfolipídios de membrana e inibição da respiração mitrocondrial.[148]

Considerando que no presente estudo não houve comprometimento da atividade mitocondrial ou das estruturas celulares, a dose de suplementação com ACR utilizada representa principalmente os efeitos benéficos do NO.

Em relação à síntese de citocinas pró e anti-inflamatórias, o TC foi mais eficaz em aumentar esse parâmetro em comparação aos outros tratamentos. Nesse protocolo, é possível observar que a isoleucina potencializa a síntese de IL-6 e IL-10. No PT também é possível observar esse papel de destaque da isoleucina, embora a síntese de IL-6 e IL-10 tenha sido inferior e apresente menor diferença estatisticamente significativa em comparação aos outros

grupos. Esses resultados suportam a hipótese de que a suplementação pode ser feita antes da indução do estado inflamatório e um efeito potencializador é observado quando a suplementação é continuada durante o estado inflamatório.

Apesar da literatura científica atribuir grande parte dos efeitos imunomodulatórios à leucina, os resultados obtidos nesse estudo atribuem relevante potencial imunomodulador à isoleucina, abrindo espaço para um importante tema de estudo e investigação.

O aumento na síntese de mediadores pró e anti-inflamatórios pode contribuir para a resolução da resposta inflamatória aguda, como na sepse, atuando tanto na síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) que ativa o sistema imunológico para culminar na eliminação de patógenos, quanto na síndrome da resposta anti-inflamatória compensatória (CARS) que promove a diminuição da função imune com o intuito de restaurar a homeostase.[149]

Ainda que o presente estudo apresente um efeito potencialmente benéfico dos ACR em relação à resposta inflamatória aguda, vale considerar que, na inflamação crônica, especialmente de baixo grau, presente na obesidade, no DM2 e nas doenças cardiovasculares, o aumento dos mediadores pró-inflamatórios poderia promover o agravamento do quadro clínico, mesmo na presença de mediadores anti-inflamatórios de compensação.

A relação entre a obesidade, as doenças cardiovasculares e o DM2 tem sido amplamente discutida na literatura científica, embora os mecanismos de integração destas condições clínicas ainda não sejam totalmente claros.[150] Estudos mostram que, além do LPS, os ácidos graxos saturados (AGS) da dieta, particularmente os ácidos láurico e mirístico, também podem ativar o TLR4 na membrana de enterócitos, resultando na inflamação local, no comprometimento da permeabilidade intestinal e no desenvolvimento da disbiose.[151–153]

Adicionalmente, quando na presença de AGS, os enterócitos podem internalizar o LPS presente na superfície apical e transportá-lo para o complexo de Golgi, onde os quilomícrons recém-formados farão o transporte involuntário dessa endotoxina, uma vez que o LPS apresenta alta afinidade por essas partículas.[154] Os quilomícrons, então, transportarão tanto os AGS da dieta quanto o LPS pelo sistema linfático e circulatório onde, após a ação das lipases de lipoproteínas, serão captados pelo tecido adiposo.

No tecido adiposo, o LPS pode se ligar ao TLR4 e induzir a ativação da via do NF-κB, promovendo a síntese da proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1), da IL-6 e do TNF-α.[47] A MCP-1 é responsável pela quimiotaxia de monócitos, que infiltram no tecido adiposo, diferenciam-se em macrófagos e ampliam a resposta inflamatória, uma vez que também são ativados pelo LPS, pelos AGS e pelas próprias citocinas secretadas pelos adipócitos. A IL-6, por sua vez, reduz a expressão do transportador de glicose-4 (GLUT-4) e do substrato do receptor de insulina-1 (IRS-1), enquanto o TNF-α aumenta a fosforilação da IRS-1 no resíduo de serina/treonina, diminuindo a translocação do GLUT-4 para a membrana celular, culminando no quadro de resistência à ação da insulina.[47]

A elevada concentração plasmática de citocinas pró-inflamatórias associada à hiperinsulinemia promovem a redução da atividade da ATCR e do DαCCR em adipócitos, diminuindo a capacidade de oxidação dos ACR por essas células e culminando no aumento da concentração plasmática desses aminoácidos e de seus respectivos α-cetoácidos.[49]

Em contrapartida, esse acúmulo de α-cetoácidos pode levar a disfunção mitocondrial em células β-pancreáticas, enquanto altas concentrações de ACR promovem a ativação persistente do mTORC1 levando ao aumento do tecido adiposo branco[49] e ao desacoplamento da via de sinalização da insulina, também por meio da fosforilação do resíduo de serina/treonina do IRS-1 e do IRS-2, em resposta à hiperinsulinemia e à hiperaminoacidemia.[49]

Diante do exposto, considerando os resultados obtidos no presente estudo, nos quais os ACR aumentam a síntese de mediadores inflamatórios pelos macrófagos — especialmente da IL-6 no PT e no TC — pode-se hipotetizar que, quando esses fagócitos estão infiltrados no tecido adiposo, haveria o agravamento do estado inflamatório do indivíduo obeso e do quadro de resistência à ação da insulina.

Ademais, considerando que as células imunes possuem uma particular demanda por glutamina como substrato energético, a maior transaminação dos ACR para síntese de glutamina poderia contribuir para o acúmulo plasmático de α-cetoácidos de cadeia ramificada, corroborando os resultados de estudos que demonstraram que concentrações circulantes de ACR e de seus metabólitos tendem a ser aumentadas em indivíduos obesos e estão associadas a alterações metabólicas, à resistência à ação da insulina e à pré-disposição ao DM2.[25,49,53]

No contexto da sinalização intracelular mediada pelos ACR, embora os resultados obtidos nesse estudo tenham mostrado ausência de diferença estatisticamente significativa entre os grupos, é importante ressaltar que o grupo CTL não foi privado de ACR, permitindo especular que, apesar das vias moleculares serem, de fato, ativadas pelos ACR, como mostrado nos grupos suplementados e no grupo controle, e culminarem no aumento substancial da síntese de mediadores inflamatórios, a ativação das proteínas intracelulares segue um padrão de fosforilação persistente e não pontual. Dessa forma, a avaliação da fosforilação das proteínas chave das vias da mTOR e do NF-κB em diferentes momentos durante o tratamento com ACR e LPS poderia confirmar a hipótese supracitada.

Vale ressaltar que o presente trabalho apresenta importantes limitações inerentes aos estudos *in vitro.* Apesar desse modelo experimental possibilitar o melhor controle das variáveis experimentais e permitir a obtenção de dados específicos e, até mesmo, inexequíveis em estudos *in vivo*, a extrapolação dos resultados para a prática clínica é restrita.

8. CONCLUSÃO

A partir do presente estudo foi possível concluir que a suplementação com ACR estabelece, de fato, uma correlação com a síntese de mediadores pró e anti-inflamatórios e que esse resultado é categoricamente dependente do protocolo de tratamento utilizado, sendo que esses parâmetros foram quantitativamente mais elevados no TC.

Ademais, a suplementação com isoleucina mostrou-se mais eficaz em promover o aumento dos mediadores inflamatórios analisados, evidenciando um potencial tema de investigação para estudo futuros.

Considerando que o delineamento de cada um dos protocolos utilizados reflete uma determinada condição clínica, os resultados obtidos no presente estudo podem auxiliar no planejamento da intervenção nutricional com ACR mediante a avaliação do estado inflamatório do paciente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Freund HR, Ryan JA, Fischer JE. Amino acid derangements in patients with sepsis: treatment with branched chain amino acid rich infusions. *Ann Surg*. 1978;188(3):423-430. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1396972&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.
2. Freund H, Hoover HC, Atamian S, Fischer JE. Infusion of the branched chain amino acids in postoperative patients. Anticatabolic properties. *Ann Surg*. 1979;190(1):18-23. doi:10.1097/00000658-197907000-00004.
3. Cerra FB, Mazuski JE, Chute E, et al. Branched Chain Metabolic Support. *Ann Surg*. 1983:286-291.
4. Garcia-de-Lorenzo A, Ortiz-Leyba C, Planas M, et al. Parenteral administration of different amounts of branch-chain amino acids in septic patients: clinical and metabolic aspects. *Crit Care Med*. 1997;25(3):418-424.
5. Bower RH, Muggia-Sullam M, Vallgren S, et al. Branched chain amino acid-enriched solutions in the septic patient: A randomized, prospective trial. *Ann Surg*. 1986;203(1):13-20. doi:10.1097/00000658-198601000-00003.
6. Nakamura I, Ochiai K, Imai Y, Moriyasu F, Imawari M. Restoration of innate host defense responses by oral supplementation of branched-chain amino acids in decompensated cirrhotic patients. 2007:1062-1067. doi:http://dx.doi.org/10.1111/j.1872-034X.2007.00166.x.
7. Kawaguchi T, Shiraishi K, Ito T, et al. Branched-Chain Amino Acids Prevent Hepatocarcinogenesis and Prolong Survival of Patients With Cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2014;12(6):1012-1018.e1. doi:10.1016/j.cgh.2013.08.050.
8. Harima Y, Yamasaki T, Hamabe S, et al. Effect of a late evening snack using branched-chain amino acid-enriched nutrients in patients undergoing hepatic arterial infusion chemotherapy for advanced hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res*. 2010;40(6):574-584. doi:10.1111/j.1872-034X.2010.00665.x.
9. Nishikawa H, Osaki Y. Clinical significance of therapy using branched-chain amino acid granules in patients with liver cirrhosis and hepatocellular

carcinoma. *Hepatol Res*. 2014;44(2):149-158. doi:10.1111/hepr.12194.

10. Kuroda H, Ushio A, Miyamoto Y, et al. Effects of branched-chain amino acid-enriched nutrient for patients with hepatocellular carcinoma following radiofrequency ablation: A one-year prospective trial. *J Gastroenterol Hepatol*. 2010;25(9):1550-1555. doi:10.1111/j.1440-1746.2010.06306.x.
11. Ichikawa K, Okabayashi T, Maeda H, et al. Oral supplementation of branched-chain amino acids reduces early recurrence after hepatic resection in patients with hepatocellular carcinoma: A prospective study. *Surg Today*. 2013;43(7):720-726. doi:10.1007/s00595-012-0288-4.
12. Hayaishi S, Chung H, Kudo M, et al. Oral branched-chain amino acid granules reduce the incidence of hepatocellular carcinoma and improve event-free survival in patients with liver cirrhosis. *Dig Dis*. 2011;29(3):326-332. doi:10.1159/000327571.
13. Ishihara T, Iwasa M, Tanaka H, et al. Effect of branched-chain amino acids in patients receiving intervention for hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2014;20(10):2673-2680. doi:10.3748/wjg.v20.i10.2673.
14. Sun L, Shih Y, Lu C, et al. Randomized, controlled study of branched chain amino acid-enriched total parenteral nutrition in malnourished patients with gastrointestinal cancer undergoing surgery. *Am Surg*. 2008;74(3):237-242.
15. Bonvini A, Coqueiro AY, Tirapegui J, Calder PC, Rogero MM. Nutrition in Clinical Care Immunomodulatory role of branched-chain amino acids. 2018;0(August):1-17. doi:10.1093/nutrit/nuy037.
16. Chuang JC, Yu CL, Wang SR. Modulation of human lymphocyte proliferation by amino acids. *Clin Exp Immunol*. 1990;81(1):173-176. doi:10.1111/j.1365-2249.1990.tb05310.x.
17. Calder PC. Branched-chain amino acids and immunity. *J Nutr*. 2006;136(1 Suppl):288S-93S. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16365100.
18. Li P, Yin Y-L, Li D, Woo Kim S, Wu G. Amino acids and immune function. *Br J Nutr*. 2007;98(2):237. doi:10.1017/S000711450769936X.
19. Choudry HA, Pan M, Karinch AM, Souba WW. Branched-chain amino acid-enriched nutritional support in surgical and cancer patients. *J Nutr*. 2006;136(1 Suppl):314S-8S. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16365105.
20. Temiz-Resitoglu M, Kucukkavruk SP, Guden DS, et al. Activation of

mTOR/IκB-α/NF-κB pathway contributes to LPS-induced hypotension and inflammation in rats. *Eur J Pharmacol*. 2017;802(January):7-19. doi:10.1016/j.ejphar.2017.02.034.

21. Dan HC, Cooper MJ, Cogswell PC, Duncan JA, Ting JPY, Baldwin AS. Akt-dependent regulation of NF-κB is controlled by mTOR and Raptor in association with IKK. *Genes Dev*. 2008;22(11):1490-1500. doi:10.1101/gad.1662308.
22. Kim JH, Lee C, Lee M, et al. Control of leucine-dependent mTORC1 pathway through chemical intervention of leucyl-tRNA synthetase and RagD interaction. *Nat Commun*. 2017;8(1):1-15. doi:10.1038/s41467-017-00785-0.
23. Ahmad A, Biersack B, Li Y, et al. Targeted regulation of PI3K/Akt/mTOR/NF-κB signaling by indole compounds and their derivatives: mechanistic details and biological implications for cancer therapy. *Anticancer Agents Med Chem*. 2013;13(7):1002-1013. doi:10.2174/18715206113139990078.
24. Yue Y, Wang Y, Li D, Song Z, Jiao H, Lin H. A central role for the mammalian target of rapamycin in LPS-induced anorexia in mice. *J Endocrinol*. 2015;224(1):37-47. doi:10.1530/JOE-14-0523.
25. Zhenyukh O, Civantos E, Ruiz-Ortega M, et al. High concentration of branched-chain amino acids promotes oxidative stress, inflammation and migration of human peripheral blood mononuclear cells via mTORC1 activation. *Free Radic Biol Med*. 2017;104(December 2016):165-177. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.009.
26. Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009;1(6):1-10. doi:10.1101/cshperspect.a001651.
27. Ginguay A, De Bandt JP, Cynober L. Indications and contraindications for infusing specific amino acids (leucine, glutamine, arginine, citrulline, and taurine) in critical illness. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2016;19(2):161-169. doi:10.1097/MCO.0000000000000255.
28. Morelli NR, Enokida DM. Trauma , Sepse e Desnutrição : Um Estudo de Caso Trauma , Sepsis and Malnutrition : A Case Study. *Unopar Científica Ciência Biológicas Saúde*. 2013;15(1):59-63.

29. Felblinger DM. Malnutrition, infection, and sepsis in acute and chronic illness. *Crit Care Nurs Clin North Am*. 2003;15(1):71-78. doi:10.1016/S0899-5885(02)00040-0.
30. Calder PC. Feeding the immune system. *Proc Nutr Soc*. 2013;72(3):299-309. doi:10.1017/S0029665113001286.
31. Kosałka K, Wachowska E, Słotwiński R. Disorders of nutritional status in sepsis-facts and myths. *Prz Gastroenterol*. 2017;12(2):73-82. doi:10.5114/pg.2017.68165.
32. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016;315(8):801. doi:10.1001/jama.2016.0287.
33. Jordão V, Nascimento L, Lima V, Farah M. Sepse : uma discussão sobre as mudanças de seus critérios diagnósticos. *Brazilian J Heal Rev*. 2019;2(2):1294-1312.
34. Mogensen KM, Horkan CM, Purtle SW, et al. Malnutrition, Critical Illness Survivors, and Postdischarge Outcomes: A Cohort Study. *J Parenter Enter Nutr*. May 2017:14860711770976. doi:10.1177/0148607117709766.
35. Lobo SM, Rezende E, Mendes CL, Oliveira MC de. Mortality due to sepsis in Brazil in a real scenario: the Brazilian ICUs project. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2019;31(1):7-10. doi:10.5935/0103-507X.20190008.
36. De Souza E. Transição nutricional no Brasil: análise dos principais fatores Nutritional transition in Brazil: Analysis of the main factors. *Cad UniFOA*. 2010;13(13):49-53. http://revistas.unifoa.edu.br/index.php/cadernos/article/view/1025%0Ahttp://web.unifoa.edu.br/cadernos/edicao/13/49.pdf.
37. Barros LL dos S, Maia C do SF, Monteiro MC. Fatores de risco associados ao agravamento de sepse em pacientes em Unidade de Terapia Intensiva. *Cad Saúde Coletiva*. 2016;24(4):388-396. doi:10.1590/1414-462x201600040091.
38. McClave SA, Taylor BE, Martindale RG, et al. Guidelines for the Provision and Assessment of Nutrition Support Therapy in the Adult Critically Ill Patient: Society of Critical Care Medicine (SCCM) and American Society for Parenteral and Enteral Nutrition (A.S.P.E.N.). *J Parenter Enter Nutr*. 2016;40(2):159-211. doi:10.1177/0148607115621863.

39. Muscaritoli M, Krznarić Z, Singer P, et al. Effectiveness and efficacy of nutritional therapy: A systematic review following Cochrane methodology. *Clin Nutr*. 2017;36(4):939-957. doi:10.1016/j.clnu.2016.06.022.
40. Trindade KR de C, Costa CL. Uso de terapia nutricional imunomoduladora em pacientes politraumatizados : uma revisão da literatura. *Ceres, Nutr e saúde*. 2010;5(2):27-38.
41. Ferreira IKC. Terapia Nutricional em Unidade de Terapia Intensiva *. 2007;19(62):90-97.
42. Maria S, Piovacari F, Maria R, Oliveira C. Saúde Alimentar. 2008;6:41-43.
43. Grimble RF. Basics in clinical nutrition: Immunonutrition - Nutrients which influence immunity: Effect and mechanism of action. *e-SPEN*. 2009;4(1):e10-e13. doi:10.1016/j.eclnm.2008.07.015.
44. Annetta MG, Pittiruti M, Vecchiarelli P, Silvestri D, Caricato A, Antonelli M. Immunonutrients in critically ill patients: an analysis of the most recent literature. *Minerva Anestesiol*. 2015;(March):320-331. doi:10.1177/0884533613486297.
45. Yao K, Duan Y, Li F, et al. Leucine in Obesity: Therapeutic Prospects. *Trends Pharmacol Sci*. 2016;37(8):714-727. doi:10.1016/j.tips.2016.05.004.
46. Layman DK, Walker DA. Potential importance of leucine in treatment of obesity and the metabolic syndrome. *J Nutr*. 2006;136(1 Suppl):319S-23S.
47. Chen L, Chen R, Wang H, Liang F. Mechanisms Linking Inflammation to Insulin Resistance. *Int J Endocrinol*. 2015;2015:1-9. doi:10.1155/2015/508409.
48. Jiang H, Westerterp M, Wang C, Zhu Y, Ai D. Macrophage mTORC1 disruption reduces inflammation and insulin resistance in obese mice. *Diabetologia*. 2014;57(11):2393-2404. doi:10.1007/s00125-014-3350-5.
49. Lynch CJ, Adams SH. Branched-chain amino acids in metabolic signalling and insulin resistance. *Nat Rev Endocrinol*. 2014;10(12):723-736. doi:10.1038/nrendo.2014.171.
50. Yoshiji H, Noguchi R, Namisaki T, et al. Branched-chain amino acids suppress the cumulative recurrence of hepatocellular carcinoma under conditions of insulin-resistance. *Oncol Rep*. 2013;30(2):545-552. doi:10.3892/or.2013.2497.

51. Yoon M-S. The Emerging Role of Branched-Chain Amino Acids in Insulin Resistance and Metabolism. *Nutrients*. 2016;8(7):405. doi:10.3390/nu8070405.
52. Adeva MM, Calviño J, Souto G, Donapetry C. Insulin resistance and the metabolism of branched-chain amino acids in humans. *Amino Acids*. 2012;43(1):171-181. doi:10.1007/s00726-011-1088-7.
53. De Simone R, Vissicchio F, Mingarelli C, et al. Branched-chain amino acids influence the immune properties of microglial cells and their responsiveness to pro-inflammatory signals. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2013;1832(5):650-659. doi:10.1016/j.bbadis.2013.02.001.
54. Neves AL, Coelho J, Couto L, Leite-Moreira A, Roncon-Albuquerque R. Metabolic endotoxemia: a molecular link between obesity and cardiovascular risk. *J Mol Endocrinol*. 2013;51(2):R51-R64. doi:10.1530/jme-13-0079.
55. Cani PD, Knauf C, Iglesias MA, et al. Metabolic Endotoxemia Initiates Obesity and Insulin Resistance. *Am Diabetes Assoc*. 2006;55(5):1484-1490. doi:10.2337/diabetes.
56. Opal SM. *Endotoxins and Other Sepsis Triggers*. Vol 167.; 2010. doi:10.1159/000315915.
57. Lee JH, Park E, Jin HJ, Lee Y. Anti-inflammatory and anti-genotoxic activity of branched chain amino acids (BCAA) in lipopolysaccharide (LPS) stimulated RAW. *Food Sci Biotechnol*. 2017;26(5):1371-1377. doi:10.1007/s10068-017-0165-4.
58. De Simone R, Vissicchio F, Mingarelli C, et al. Branched-chain amino acids influence the immune properties of microglial cells and their responsiveness to pro-inflammatory signals. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2013;1832(5):650-659. doi:10.1016/j.bbadis.2013.02.001.
59. Ferreira LM, Hochman B, Barbosa MVJ. [Experimental models in research]. *Acta Cir Bras*. 2005;20 Suppl 2:28-34. doi:/S0102-86502005000800008.
60. Rogero MM, Tirapegui J. Aspectos atuais sobre aminoácidos de cadeia ramificada e exercício físico. *Rev Bras Ciências Farm*. 2008;44(4):563-575. doi:10.1590/S1516-93322008000400004.
61. Hayashi K, Anzai N. Novel therapeutic approaches targeting L-type amino

acid transporters for cancer treatment. *World J Gastrointest Oncol*. 2017;9(1):21. doi:10.4251/wjgo.v9.i1.21.

62. Wang Q, Holst J. L-type amino acid transport and cancer: Targeting the mTORC1 pathway to inhibit neoplasia. *Am J Cancer Res*. 2015;5(4):1281-1294.
63. Pineda M, Fernández E, Torrents D, et al. Identification of a membrane protein, LAT-2, that co-expresses with 4F2 heavy chain, an L-type amino acid transport activity with broad specificity for small and large zwitterionic amino acids. *J Biol Chem*. 1999;274(28):19738-19744. doi:10.1074/jbc.274.28.19738.
64. Fraga S, Pinho MJ, Soares-Da-Silva P. Expression of LAT1 and LAT2 amino acid transporters in human and rat intestinal epithelial cells. *Amino Acids*. 2005;29(3):229-233. doi:10.1007/s00726-005-0221-x.
65. Sekine Y, Nishibori Y, Akimoto Y, et al. Amino Acid Transporter LAT3 Is Required for Podocyte Development and Function. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20(7):1586-1596. doi:10.1681/ASN.2008070809.
66. Guetg A, Mariotta L, Bock L, et al. Essential amino acid transporter Lat4 (Slc43a2) is required for mouse development. *J Physiol*. 2015;593(5):1273-1289. doi:10.1113/jphysiol.2014.283960.
67. Dickens D, Chiduza GN, Wright GSA, Pirmohamed M, Antonyuk S V., Hasnain SS. Modulation of LAT1 (SLC7A5) transporter activity and stability by membrane cholesterol. *Sci Rep*. 2017;7(March):1-13. doi:10.1038/srep43580.
68. Yothaisong S, Dokduang H, Anzai N, et al. Inhibition of l-type amino acid transporter 1 activity as a new therapeutic target for cholangiocarcinoma treatment. *Tumor Biol*. 2017;39(3). doi:10.1177/1010428317694545.
69. Scopelliti AJ, Font J, Vandenberg RJ, Boudker O, Ryan RM. Structural characterisation reveals insights into substrate recognition by the glutamine transporter ASCT2/SLC1A5. *Nat Commun*. 2018;9(1):1-12. doi:10.1038/s41467-017-02444-w.
70. Nicklin P, Bergman P, Zhang B, et al. Bidirectional Transport of Amino Acids Regulates mTOR and Autophagy. *Cell*. 2009;136(3):521-534. doi:10.1016/j.cell.2008.11.044.
71. Zhang S, Ren M, Zeng X, He P, Ma X, Qiao S. Leucine stimulates ASCT2

amino acid transporter expression in porcine jejunal epithelial cell line (IPEC-J2) through PI3K/Akt/mTOR and ERK signaling pathways. *Amino Acids*. 2014;46(12):2633-2642. doi:10.1007/s00726-014-1809-9.

72. McCracken AN, Edinger AL. Nutrient transporters: The Achilles' heel of anabolism. *Trends Endocrinol Metab*. 2013;24(4):200-208. doi:10.1016/j.tem.2013.01.002.
73. Sperringer JE, Addington A, Hutson SM. Branched-Chain Amino Acids and Brain Metabolism. *Neurochem Res*. 2017;42(6):1697-1709. doi:10.1007/s11064-017-2261-5.
74. Suryawan A, Hawes J, Harris R, Shimomura Y, Jenkins A, Hutson S. A molecular model of human branched-chain amino acid metabolism. *Am J Clin Nutr*. 1998;68(1):72-81. http://ajcn.nutrition.org/content/68/1/72.short.
75. Adeva-Andany MM, López-Maside L, Donapetry-García C, Fernández-Fernández C, Sixto-Leal C. Enzymes involved in branched-chain amino acid metabolism in humans. *Amino Acids*. 2017;49(6):1005-1028. doi:10.1007/s00726-017-2412-7.
76. Sweatt AJ, Wood M, Suryawan A, Wallin R, Willingham MC, Hutson SM. Branched-chain amino acid catabolism: unique segregation of pathway enzymes in organ systems and peripheral nerves. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004;286(1):E64-E76. doi:10.1152/ajpendo.00276.2003.
77. Yudkoff M. Brain metabolism of branched-chain amino acids. *Glia*. 1997;21(1):92-98. doi:10.1002/(SICI)1098-1136(199709)21:1<92::AID-GLIA10>3.0.CO;2-W.
78. Bifari F, Nisoli E. Branched-chain amino acids differently modulate catabolic and anabolic states in mammals: a pharmacological point of view. *Br J Pharmacol*. 2017;174(11):1366-1377. doi:10.1111/bph.13624.
79. Harris RA, Joshi M, Jeoung NH. Mechanisms responsible for regulation of branched-chain amino acid catabolism. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;313(2):391-396. doi:10.1016/j.bbrc.2003.11.007.
80. Monirujjaman M, Ferdouse A. Metabolic and physiological roles of branched-chain amino acids. *Adv Mol Biol*. 2014;2014:1-6. doi:10.1155/2014/364976.
81. Siwicki AK, Fuller JC, Nissen S, Ostaszewski P, Studnicka M. In vitro effects of b-hydroxy-b-methylbutyrate (HMB) on cell-mediated immunity

in fish. *Vet Immunol Immunopathol*. 2000;76:191-197.

82. Nunes EA, Lomax AR, Noakes PS, Miles EA, Fernandes LC, Calder PC. ??-Hydroxy-??-methylbutyrate modifies human peripheral blood mononuclear cell proliferation and cytokine production in vitro. *Nutrition*. 2011;27(1):92-99. doi:10.1016/j.nut.2009.12.008.
83. Wilson GJ, Wilson JM, Manninen AH. Effects of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) on exercise performance and body composition across varying levels of age, sex, and training experience: A review. *Nutr Metab*. 2008;5(1):1-17. doi:10.1186/1743-7075-5-1.
84. Nissen SL, Abumrad NN. Nutritional role of the leucine metabolite β-hydroxy β-methylbutyrate (HMB). *J Nutr Biochem*. 1997;8(6):300-311. doi:10.1016/S0955-2863(97)00048-X.
85. Siwicki AK, Fuller JC, Nissen S, et al. Effect of HMB (β-hydroxy-β-methylbutyrate) on in vitro proliferative responses of sheatfish (Silurus glanis) and catfish (Ictalurus melas) lymphocytes stimulated by mitogens. *Acta Vet Brno*. 2004;73(1):119-122. doi:10.2754/avb200473010119.
86. Townsend JR, Fragala MS, Jajtner AR, et al. β-Hydroxy-β-methylbutyrate (HMB)-free acid attenuates circulating TNF-α and TNFR1 expression postresistance exercise. *J Appl Physiol*. 2013;115(8):1173-1182. doi:10.1152/japplphysiol.00738.2013.
87. Schafer G, Schauder P. Assessment of effects of amino acids and branched chain keto acids on leucine oxidation in human lymphocytes. *Scand J Clin Lab Invest*. 1988;48(6):531-536. doi:10.3109/00365518809085769.
88. Tom A, Nair KS. Assessment of branched-chain amino Acid status and potential for biomarkers. *J Nutr*. 2006;136(1 Suppl):324S-30S. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16365107.
89. Brosnan JT, Brosnan ME. Branched-Chain Amino Acids: Enzyme and Substrate Regulation. *J Nutr*. 2006;136(February 2006):207-211. doi:136/1/207S [pii].
90. Ananieva EA, Patel CH, Drake CH, Powell JD, Hutson SM. Cytosolic branched chain aminotransferase (BCATc) regulates mTORC1 signaling and glycolytic metabolism in CD4- T cells. *J Biol Chem*. 2014;289(27):18793-18804. doi:10.1074/jbc.M114.554113.

91. Tsukishiro T, Shimizu Y, Higuchi K, Watanabe A. Effect of branched-chain amino acids on the composition and cytolytic activity of liver-associated lymphocytes in rats. *J Gastroenterol Hepatol*. 2000;15(8):849-859. doi:10.1046/j.1440-1746.2000.02220.x.

92. Taya Y, Ota Y, Wilkinson AC, et al. Depleting dietary valine permits nonmyeloablative mouse hematopoietic stem cell transplantation. *Science (80-)*. 2016;354(6316):1152-1155. doi:10.1126/science.aag3145.

93. Rowe RG, Daley GQ. Stem cells: Valine starvation leads to a hungry niche. *Nature*. 2017;541(7636):166-167. doi:10.1038/nature21106.

94. Dickinson JM, Rasmussen BB. Author Manuscript. 2012;(409):1-10. doi:10.1097/MCO.0b013e3283406f3e.Essential.

95. Mattick JSA, Kamisoglu K, Ierapetritou MG, Androulakis IP, Berthiaume F. Branched-chain amino acid supplementation: Impact on signaling and relevance to critical illness. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2013;5(4):449-460. doi:10.1002/wsbm.1219.

96. Wang X, Proud CG. The mTOR pathway in the control of protein synthesis. *Physiology (Bethesda)*. 2006;21:362-369. doi:10.1152/physiol.00024.2006.

97. Schriever SC, Deutsch MJ, Adamski J, Roscher AA, Ensenauer R. Cellular signaling of amino acids towards mTORC1 activation in impaired human leucine catabolism. *J Nutr Biochem*. 2013;24(5):824-831. doi:10.1016/j.jnutbio.2012.04.018.

98. Goberdhan DCI, Wilson C, Harris AL. Amino Acid Sensing by mTORC1: Intracellular Transporters Mark the Spot. *Cell Metab*. 2016;23(4):580-589. doi:10.1016/j.cmet.2016.03.013.

99. Gan X, Wang J, Su B, Wu D. Evidence for direct activation of mTORC2 kinase activity by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem*. 2011;286(13):10998-11002. doi:10.1074/jbc.M110.195016.

100. Dan HC, Antonia RJ, Baldwin AS. PI3K/Akt promotes feedforward mTORC2 activation through IKKα *Oncotarget*. 2016;7(16):21064-21075. doi:10.18632/oncotarget.8383.

101. Weichhart T, Costantino G, Poglitsch M, et al. The TSC-mTOR Signaling Pathway Regulates the Innate Inflammatory Response. *Immunity*. 2008;29(4):565-577. doi:10.1016/j.immuni.2008.08.012.

102. Yuan H-X, Guan K-L. The SIN1-PH Domain Connects mTORC2 to PI3K. *Cancer Discov*. 2015;5(11):1127-1129. doi:10.1158/2159-8290.CD-15-1125.

103. Tato I, Bartrons R, Ventura F, Rosa JL. Amino acids activate mammalian target of rapamycin complex 2 (mTORC2) via PI3K/Akt signaling. *J Biol Chem*. 2011;286(8):6128-6142. doi:10.1074/jbc.M110.166991.

104. Showkat M, Beigh MA, Andrabi KI. mTOR Signaling in Protein Translation Regulation: Implications in Cancer Genesis and Therapeutic Interventions. *Mol Biol Int*. 2014;2014:1-14. doi:10.1155/2014/686984.

105. Konopatskaya O, Poole AW. Protein kinase Cα: disease regulator and therapeutic target. *Trends Pharmacol Sci*. 2010;31(1):8-14. doi:10.1016/j.tips.2009.10.006.

106. Córdova Martínez A, Alvarez-Mon M. O sistema imunológico (I): conceitos gerais, adaptação ao exercício físico e implicações clínicas. *Rev Bras Med do Esporte*. 1999;5(3):120-125. doi:10.1590/S1517-86921999000300010.

107. Souza AWS De, Mesquita Júnior D, Araújo JAP, et al. Sistema imunitário: parte II . O delicado equilíbrio do sistema imunológico entre os pólos de tolerância e autoimunidade. *Rev Bras Reumatol*. 2010;50(11):665-679. doi:10.1590/S0482-50042010000600007.

108. Mesquita Júnior D, Antônio Pereira Araújo J, Tieko Takao Catelan T, et al. ARTIGO DE REVISÃO Sistema Imunitário – Parte II Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. *Rev Bras Reum*. 2010;50(5):552-580. doi:10.1590/S0482-50042010000500008.

109. Nunes EA, Kuczera D, Brito GAP, et al. β-Hydroxy-β-methylbutyrate supplementation reduces tumor growth and tumor cell proliferation ex vivo and prevents cachexia in Walker 256 tumor-bearing rats by modifying nuclear factor-κB expression. *Nutr Res*. 2008;28(7):487-493. doi:10.1016/j.nutres.2008.04.006.

110. Martínez MC, Andriantsitohaina R. Reactive Nitrogen Species: Molecular Mechanisms and Potential Significance in Health and Disease. *Antioxid Redox Signal*. 2008;11(3):669-702. doi:10.1089/ars.2007.1993.

111. Adams L, Franco MC, Estevez AG. Reactive nitrogen species in cellular signaling. *Exp Biol Med*. 2015;240(6):711-717. doi:10.1177/1535370215581314.

112. Weidinger A, Kozlov A V. Biological activities of reactive oxygen and nitrogen species: Oxidative stress versus signal transduction. *Biomolecules*. 2015;5(2):472-484. doi:10.3390/biom5020472.

113. Fattahi MJ, Mirshafiey A. Prostaglandins and Rheumatoid Arthritis. *Arthritis*. 2012;2012:1-7. doi:10.1155/2012/239310.

114. Terragno NA, Terragno A. Role of prostaglandins in hypertension of pregnancy. *(No Journal)*. 32676BC:19-22.

115. Takeda K, Kaisho T, Akira S. T OLL -L IKE R ECEPTORS. 2003;(1). doi:10.1146/annurev.immunol.21.120601.141126.

116. Akira S, Takeda K. FOCUS ON TLR SIGNALLING. 2004;4(July). doi:10.1038/nri1391.

117. R.F. V, F.D.A.Q. R. The role of Tumor Necrosis Factor -Alpha (TNF-á) in bone resorption present in middle ear cholesteatoma. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2007;73(1):123-127. doi:S0034-72992007000100020 [pii].

118. Sharif O, Bolshakov VN, Raines S, Newham P, Perkins ND. Transcriptional profiling of the LPS induced NF-??B response in macrophages. *BMC Immunol*. 2007;8:1-17. doi:10.1186/1471-2172-8-1.

119. Chow JC, Young DW, Douglas T, et al. Signal Transduction *. 1999. doi:10.1074/jbc.274.16.10689.

120. Jerala R. Structural biology of the LPS recognition. *Int J Med Microbiol*. 2007;297(5):353-363. doi:10.1016/j.ijmm.2007.04.001.

121. Wiederschain GY. *Endotoxins: Structure, Function and Recognition*. Vol 76.; 2011. doi:10.1134/s0006297911050129.

122. Fock RA, Rogero MM, Vinolo MAR, Curi R, Borges MC, Borelli P. Effects of protein-energy malnutrition on NF-KappaB signalling in murine peritoneal macrophages. *Inflammation*. 2010;33(2):101-109. doi:10.1007/s10753-009-9163-x.

123. Rogero MM, Borelli P, Vinolo MAR, Fock RA, de Oliveira Pires IS, Tirapegui J. Dietary glutamine supplementation affects macrophage function, hematopoiesis and nutritional status in early weaned mice. *Clin Nutr*. 2008;27(3):386-397. doi:10.1016/j.clnu.2008.03.004.

124. Oeckinghaus A, Ghosh S. The NF- B Family of Transcription Factors and Its Regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009;1(4):a000034-

a000034. doi:10.1101/cshperspect.a000034.

125. Tamanna N, Mahmood N. Emerging Roles of Branched-Chain Amino Acid Supplementation in Human Diseases. *Int Sch Res Not*. 2014;2014:1-8. doi:10.1155/2014/235619.
126. Angelo LS, Kurzrock R. Vascular endothelial growth factor and its relationship to inflammatory mediators. *Clin Cancer Res*. 2007;13(10):2825-2830. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-2416.
127. Hagiwara A, Nishiyama M, Ishizaki S. Branched-chain amino acids prevent insulin-induced hepatic tumor cell proliferation by inducing apoptosis through mTORC1 and mTORC2-dependent mechanisms. *J Cell Physiol*. 2012;227(5):2097-2105. doi:10.1002/jcp.22941.
128. Säemann MD, Haidinger M, Hecking M, Hörl WH, Weichhart T. The multifunctional role of mTOR in innate immunity: Implications for transplant immunity. *Am J Transplant*. 2009;9(12):2655-2661. doi:10.1111/j.1600-6143.2009.02832.x.
129. Lee DF, Hung MC. All roads lead to mTOR: Integrating inflammation and tumor angiogenesis. *Cell Cycle*. 2007;6(24):3011-3014. doi:10.4161/cc.6.24.5085.
130. Lee DF, Kuo HP, Chen C Te, et al. IKKβ Suppression of TSC1 Links Inflammation and Tumor Angiogenesis via the mTOR Pathway. *Cell*. 2007;130(3):440-455. doi:10.1016/j.cell.2007.05.058.
131. Dan HC, Ebbs A, Pasparakis M, Van Dyke T, Basseres DS, Baldwin AS. Akt-dependent Activation of mTORC1 Complex Involves Phosphorylation of mTOR (Mammalian Target of Rapamycin) by IκB Kinase α (IKKα). *J Biol Chem*. 2014;289(36):25227-25240. doi:10.1074/jbc.M114.554881.
132. Lang CH, Frost RA, Vary TC. Regulation of muscle protein synthesis during sepsis and inflammation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007;293:E453-459. doi:10.1152/ajpendo.00204.2007.
133. Laufenberg LJ, Pruznak AM, Navaratnarajah M, Lang CH. Sepsis-induced changes in amino acid transporters and leucine signaling via mTOR in skeletal muscle. *Amino Acids*. 2014;46(12):2787-2798. doi:10.1007/s00726-014-1836-6.
134. Frost RA, Lang CH. mTor Signaling in Skeletal Muscle During Sepsis and Inflammation: Where Does It All Go Wrong? *Physiology*. 2011;26(2):83-96.

doi:10.1152/physiol.00044.2010.

135. Lang CH, Frost RA. Endotoxin disrupts the leucine-signaling pathway involving phosphorylation of mTOR, 4E-BP1, and S6K1 in skeletal muscle. *J Cell Physiol*. 2005;203(1):144-155. doi:10.1002/jcp.20207.
136. Leite JSM, Raizel R, Hypólito TM, Rosa TDS, Cruzat VF, Tirapegui J. l-glutamine and l-alanine supplementation increase glutamine-glutathione axis and muscle HSP-27 in rats trained using a progressive high-intensity resistance exercise. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2016;41(8):842-849. doi:10.1139/apnm-2016-0049.
137. Calder PC. Branched-Chain Amino Acids : Metabolism , Physiological Function , and Application. 2006;(3):288-293.
138. Dowdy S, Davis PK, Ho A, Dowdy SF. synchronization of mammalian cells Review Biological Methods for Cell-Cycle Synchronization of Mammalian Cells. *Biotechniques*. 2014;30(July 2001):1322-1331.
139. Banfalvi G. Cell cycle synchronization. *Methods Mol Biol*. 2011;761:1-23. doi:10.1007/978-1-61779-182-6.
140. Banfalvi G. Cell cycle synchronization of animal cells and nuclei by centrifugal elutriation. *Nat Protoc*. 2008;3(4):663-673. doi:10.1038/nprot.2008.34.
141. Davis PK, Ho A, Dowdy SF. Cell-Cycle Synchronization of Mammalian Cells. *Biol Methods*. 2001;30(6). doi:10.2144/01306rv01.
142. Ribeiro CA, Sgaravatti ÂM, Rosa RB, et al. Inhibition of brain energy metabolism by the branched-chain amino acids accumulating in maple syrup urine disease. *Neurochem Res*. 2008;33(1):114-124. doi:10.1007/s11064-007-9423-9.
143. Deakin AM, Payne AN, Whittle BJR, Moncada S. The modulation of il-6 and tnf-α release by nitric oxide following stimulation of j774 cells with lps and ifn-γ. *Cytokine*. 1995;7(5):408-416. doi:10.1006/cyto.1995.0056.
144. Fonseca SG, Romão PRT, Figueiredo F, et al. TNF-α mediates the induction of nitric oxide synthase in macrophages but not in neutrophils in experimental cutaneous leishmaniasis. *Eur J Immunol*. 2003;33(8):2297-2306. doi:10.1002/eji.200320335.
145. Bellows CF, Jaffe BM. Glutamine is essential for nitric oxide synthesis by murine macrophages. *J Surg Res*. 1999;86(2):213-219.

doi:10.1006/jsre.1999.5713.

146. Bryk J, Ochoa JB, Correia MIT, Munera-Seeley V, Popovic PJ. Effect of Citrulline and Glutamine on Nitric Oxide Production in RAW. 2008:377-383.
147. Chandra A, Enkhbaatar P, Nakano Y, Traber LD, Traber DL. Sepsis: emerging role of nitric oxide and selectins. *Clinics*. 2006;61(1):71-76. doi:10.1590/s1807-59322006000100012.
148. J.-L. V, H. Z, C. S, J.-C. P. Effects of nitric oxide in septic shock. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161(6):1781-1785. http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed5&NEWS=N&AN=2000227053.
149. Siqueira-batista R, Gomes P, Calixto- L, Vitorino RR. Sepsis : an update. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2011;23(2):207-216.
150. Rogero MM, Calder PC. Obesity, inflammation, toll-like receptor 4 and fatty acids. *Nutrients*. 2018;10(4):1-19. doi:10.3390/nu10040432.
151. Rocha DM, Caldas AP, Oliveira LL, Bressan J, Hermsdorff HH. Saturated fatty acids trigger TLR4-mediated inflammatory response. *Atherosclerosis*. 2016;244:211-215. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2015.11.015.
152. Milanski M, Degasperi G, Coope A, et al. Saturated Fatty Acids Produce an Inflammatory Response Predominantly through the Activation of TLR4 Signaling in Hypothalamus: Implications for the Pathogenesis of Obesity. *J Neurosci*. 2009;29(2):359-370. doi:10.1523/JNEUROSCI.2760-08.2009.
153. Shi H, Yin H, Flier JS, et al. TLR4 links innate immunity and fatty acid – induced insulin resistance Find the latest version : TLR4 links innate immunity and fatty acid – induced insulin resistance. *J Clin Invest*. 2006;116(11):3015-3025. doi:10.1172/JCI28898.TLRs.
154. Ghoshal S, Witta J, Zhong J, de Villiers W, Eckhardt E. Chylomicrons promote intestinal absorption of lipopolysaccharides. *J Lipid Res*. 2008;50(1):90-97. doi:10.1194/jlr.m800156-jlr200.