

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós Graduação em Ciências dos Alimentos

Área de Nutrição Experimental

Efeitos da suplementação crônica com leucina sobre parâmetros metabólicos associados à adiposidade do tecido adiposo branco em ratos com diabetes induzido por estreptozotocina no período neonatal

Vanessa Batista de Sousa Lima

Tese para obtenção do título de DOUTOR

Orientador: Prof Dr Julio Orlando Tirapegui Toledo

São Paulo  
2016

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Programa de Pós Graduação em Ciências dos Alimentos  
Área de Nutrição Experimental

Efeitos da suplementação crônica com leucina sobre parâmetros metabólicos associados à adiposidade do tecido adiposo branco em ratos com diabetes induzido por estreptozotocina no período neonatal

Vanessa Batista de Sousa Lima

Versão corrigida da Tese conforme resolução CoPGr 6018.

O original encontra-se disponível no Serviço de Pós Graduação da FCF/USP.

Tese para obtenção do título de DOUTOR

Orientador: Prof Dr Julio Orlando Tirapegui Toledo

São Paulo  
2016

**Ficha Catalográfica**  
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e  
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

L732e Lima, Vanessa Batista de Sousa  
Efeitos da suplementação crônica com leucina sobre parâmetros metabólicos associados à adiposidade do tecido adiposo branco em ratos com diabetes induzido por estreptozotocina no período neonatal / Vanessa Batista de Sousa Lima. - São Paulo, 2016.  
122p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental

Orientador : Tirapegui Toledo, Julio Orlando

1. Nutrição experimental I. T. II. Tirapegui Toledo, Julio Orlando, orientador.

641.1

CDD

Vanessa Batista de Sousa Lima

Efeitos da suplementação crônica com leucina sobre parâmetros metabólicos associados à adiposidade do tecido adiposo branco em ratos com diabetes induzido por estreptozotocina no período neonatal

Comissão Julgadora  
da  
Tese para obtenção do título de DOUTOR

Prof. Dr. Julio Orlando Tirapegui Toledo  
Orientador/Presidente

---

1º examinador

---

2º examinador

---

3º examinador

---

4º examinador

São Paulo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2016

*A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.*

*(Albert Einstein)*

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais e minha família,  
que me ensinaram que a persistência  
é um dos passos para chegar onde se almeja.*

## AGRADECIMENTOS

A DEUS, pai onipresente e onipotente, que sempre atendeu minhas súplicas em tempos de aflição. Naquele momento só nosso, me trouxe paz e serenidade para que eu pudesse tomar as decisões certas e não me arrependesse delas. ELE me protegeu e me guiou sempre no caminho do bem. Toda honra e toda glória a Ti, Senhor!

Ao professor Julio, por ter me recebido tão bem em seu laboratório e por ter me dado a honra de trabalhar com ele. De orientador, se tornou meu mestre... Com ensinamentos de vida muito enriquecedores. Obrigada professor por ter sempre as palavras certas em nossas conversas “existenciais”. Levarei também o seu exemplo comigo.

Ao Leonardo, por fazer nascer uma ideia de projeto e me permitir desenvolvê-lo durante o meu doutorado. Vamos colher os frutos desse árduo trabalho e mostrar meu reconhecimento pela sua contribuição. Obrigada!

A minha querida e eterna orientadora professora Dilina, que é também uma grande amiga. Professora, quando me lembro do seu nome, me vem uma palavra: GRATIDÃO. Você me pegou pela mão, me pôs do seu lado e me lapidou com uma dedicação de “mãe”. Jamais esquecerei o que fez por mim. Muito obrigada!

Aos meus pais e minhas irmãs, em nome dos quais agradeço toda a minha família. Pessoas imprescindíveis, que me ensinaram valores que carregarei durante toda a minha vida. É imensurável o tamanho da gratidão e respeito que tenho por vocês... Tudo o que eu consegui até hoje não é meu, é uma realização nossa! Meus pais, que sempre respeitaram minhas decisões e me permitiram voar alto em busca de um sonho, em que tive que percorrer um caminho até então desconhecido. Mãe, pai, minhas pupilas... Eu consegui!! E agradeço toda força, carinho, cuidado e amor que tiveram comigo, mesmo de longe. Vocês estavam comigo em pensamento em todos os momentos mais importantes dessa minha trajetória acadêmica e pessoal.

Aos meus amigos e companheiros de trabalho, Kadu e Henrique, por compartilhar experiências, conhecimentos e muitas risadas no biotério. Vocês dois juntos eram “impossíveis” (risos). Fomos um grupo bastante equilibrado e determinado! Muito obrigada!

Aos nossos alunos de IC, Mariana e Igor, que vieram pra somar no grupo... E aumentar mais ainda nossas crises de risos. Vocês foram fundamentais!

Ao Kadu, um amigo e um presente que Deus me deu... Que, desde o início, esteve sempre do meu lado, me protegendo como um anjo da guarda. Kadu me faltam palavras para

agradecer tudo o que fez durante toda essa minha trajetória... Convivo muito com você e conheço o ser humano, amigo e gentil que és. Gratidão! Nosso carinho, respeito e amizade vão muito além dos muros da USP, e quero levar isso pra sempre comigo. Muito obrigada!

À minha amiga Ana Lina Sales que muito gentilmente me ajudou assim que cheguei a São Paulo. Minha amiga, você tirou a insegurança e o medo que eu tinha com o “desconhecido”, e colocou no lugar muito carinho, amizade e segurança (contigo, eu sentia como se me dissesse todo dia: “amiga, estou aqui!”). Muito obrigada!

Aos amigos que ajudaram a minha completa falta de experiência com experimento animal e técnicas moleculares: Lucas, Emídio, João, Daiana, Maysa. Também devo a vocês o que aprendi. Muito obrigada!

Às minhas “roomates” queridas Taíse Ayres, Simone Vieira, Juliana Freitas, Vivian Landi, Evelin Fornari e Thayná Pires... Nossa casa sempre teve um clima muito aconchegante e amistoso. Sem dúvidas, foi uma experiência maravilhosa! Em especial, a Tai, Si e Ju... Que compartilharam a casa e a vida delas comigo. Agradeço o carinho, o afeto, as risadas, os choros, as novelas, os vinhos e fins de semanas inteiros no sofá assistindo Netflix... Momentos como esses ficarão em minha memória para sempre. Meninas, muito obrigada!!

A todos os amigos do laboratório que, direta ou indiretamente, me ensinaram valores que levarei para minha vida inteira. Sou mais forte, graças ao que vi e vivi com vocês. Muito obrigada!

Aos amigos que fiz no bloco 14, Ju (prof Fernando), Roberto, Laura, Edu, May, Raquel, Dado, Fabi, Margot, Ju (prof Silvia), Leila, Priscila... Que compartilharam conhecimentos e bate papos valiosos. Em especial, a Raquel e May, meninas, vocês foram demais!

À Amandica, outro “pedacinho” do Piauí, que me ajudou com sua amizade e carinho. Nossas conversas foram sempre um alívio para mim. Obrigada Flor!

À Mônica, Edilson e Roberta que foram muito atenciosos em esclarecer todas as minhas dúvidas. À Lulu que foi atenciosa e carinhosa comigo... Não vou me esquecer do suco de maracujá que arranjou para aliviar minha tensão pré-qualificação. Pequenos gestos valem mais que mil palavras, obrigada Lulu! À Rose, pelas conversas de corredor.

Aos professores do departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, eu tive uma riquíssima e valiosa experiência em disciplinas e nas bancas em que fui arguida.

À Fapesp e ao CNPq pelo auxílio financeiro e pela bolsa.



## RESUMO

LIMA, V.B.S. **Efeitos da suplementação crônica com leucina sobre parâmetros metabólicos associados à adiposidade do tecido adiposo branco em ratos com diabetes induzido por estreptozotocina no período neonatal.** 2016. 122f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A hiperglicemia crônica no diabetes está relacionada com distúrbios nas vias de sinalização da insulina e do mTOR, e com o desbalanço na secreção de adipocinas pelo tecido adiposo branco (TAB). Em longo prazo, esta disfunção metabólica pode causar uma perda severa de massa adiposa, o que agrava a resistência à insulina (RI). Estudos têm destacado o potencial efeito da suplementação com leucina no tratamento de doenças metabólicas como o diabetes tipo 2 e obesidade. No entanto, os efeitos da leucina sobre a homeostase glicêmica e a sensibilidade à insulina em doenças em que ocorre perda severa de gordura ainda necessitam melhores esclarecimentos. Portanto, foi investigado se a suplementação crônica com leucina pode afetar a adiposidade de ratos diabéticos com perda intensa de TAB, e melhorar a RI e outras desordens metabólicas relacionadas com TAB. Ratos recém-desmamados foram distribuídos em 3 grupos: **i)** Grupo controle (C) – não diabético e recebiam ração controle; **ii)** Grupo diabetes (D) – diabético e recebiam ração controle; **iii)** Grupo diabetes Leucina (DL) – diabético e recebiam ração suplementada com 5% de L-leucina. Após 8 semanas, foram analisados: glicemia e insulinemia de jejum, HOMA<sub>IR</sub>, citocinas pro- e anti-inflamatórias no soro e tecido adiposo branco, expressão de proteínas (mTOR, p-MTOR, p70S6K1, p-p70S6K1, PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$ , ACC1, FAS, AKT, p-AKT) nos tecidos adiposos subcutâneo (SC) e retroperitoneal (RP), bem como a expressão de RNAm da adiponectina e leptina no TAB. *In vivo*, foram realizados testes de tolerância oral à glicose (OGTT) e de sensibilidade à insulina (ITT), glicemia pós prandial e consumo de ração. O tratamento crônico com leucina reverteu a perda de massa adiposa dos coxins subcutâneo e viscerais neste modelo experimental, o que pode ser explicado pelo aumento da expressão da p-p70S6K1, PPAR $\gamma$ , ACC1 e FAS, proteínas que estimulam a adipogênese e lipogênese *de novo* nos adipócitos. Além disso, houve um aumento da expressão de AKT total no coxim SC no grupo DL, mas não foi alterada no coxim RP, indicando que a leucina também pode melhorar a resistência à insulina por ativar a AKT, que é considerada enzima limitante da cascata de fosforilação da insulina. Por outro lado, a leucina melhorou o perfil de adipocinas secretadas pelo coxim RP, pois aumentou a secreção de adiponectina e IL-10. Estas citocinas, direta ou indiretamente, reduzem a RI em tecidos como fígado, TAB e músculo esquelético. Isto sugere que a ação da leucina sobre a sensibilidade à insulina no coxim subcutâneo parece estar mais relacionada com a recuperação da via de sinalização da insulina, ao passo que, no coxim RP está indiretamente relacionada com a melhora do perfil de adipocinas secretadas por este tecido. Estes dados corroboram com os resultados de HOMA<sub>IR</sub>, glicemia de jejum e pós prandial, OGTT e ITT, nos quais foi observada uma significativa melhora do quadro de intolerância à glicose e resistência à insulina em ratos diabéticos tratados com leucina. Em conclusão, a suplementação crônica com leucina aumentou a adiposidade corporal em ratos diabéticos induzido por estreptozotocina no período neonatal, o que foi relacionado com a melhora da intolerância à glicose e da resistência à insulina. Isto demonstra que a recuperação trófica do tecido adiposo branco é fundamental para a melhora dos distúrbios metabólicos relacionados ao metabolismo da glicose neste modelo experimental.

**Palavras-chave:** Leucina, Tecido Adiposo Branco, Adiposidade, Diabetes.

## ABSTRACT

LIMA, VBS. **Effects of chronic supplementation with leucine on metabolic parameters associated with the adiposity of white adipose tissue in rats with diabetes streptozotocin-induced in the neonatal period.** 2016. 122f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

The chronic hyperglycemia in diabetes is associated with disturbances in insulin and in mTOR pathways, and changes in adipokine secretion in white adipose tissue (WAT). Long-term, this metabolic dysfunction can cause a severe loss of fat mass, which increases insulin resistance (IR). Studies have highlighted the effect of leucine supplementation in treatment of metabolic diseases as type 2 diabetes and obesity. However, the effects of leucine on glucose homeostasis and insulin sensitivity in diseases with intense fat loss remain unknown. Therefore, was investigated whether chronic leucine supplementation can affect the adiposity of diabetic rats with severe adipose tissue loss, and to improve the IR and other metabolic disorders associated with WAT. After weaning, rats were distributed in 3 groups: i) control group (C) - no diabetic and received control chow ; ii) diabetes group (D) - diabetic and received control chow; iii) Leucine Diabetes Group (DL) - diabetic and received diet supplemented with 5% L-leucine. After 8 weeks, were analyzed: fasting glycaemia and insulin, HOMA<sub>IR</sub>, antiinflammatory and proinflammatory cytokines in serum and in WAT, protein expression of mTOR, p-MTOR, p70S6K1, p-p70S6K1, PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$ , ACC1, FAS, AKT, p-AKT in subcutaneous (SC) and retroperitoneal adipose tissue, as well as the RNAm expression of adiponectin and leptin in WAT. In vivo, were realized oral glucose tolerance test (OGTT) and insulin sensitivity test (ITT), postprandial glycaemia and chow ingestion. O chronic treatment with leucine recovered the adipose mass in subcutaneous and visceral fat pad in this experimental model, this was explicated by increase of protein expression of p-p70S6K1, PPAR $\gamma$ , ACC1 and FAS that stimulate the adipogenesis and de novo lipogenesis in adipocytes. Moreover, had an increase of protein expression of total AkT in subcutaneous fat pad in group DL, but don't change in RP fat pad, indicating that the leucine can to activate the AKT, which is limiting enzyme of phosphorylation cascade of insulin, and improve the insulin resistance. On the other hand, leucine improved the profile of adipokines secreted in RP fat pad, because increased the secretion of adiponectin and IL-10. This cytokines reduced the insulin resistance in tissues as liver, WAT and skeletal muscle. This suggest that action of leucine on insulin sensitivity in subcutaneous fat pad is more related to recovery of insulin signaling, and in RP fat pad is indirectly related to improve of profile of adipokines secretion in this tissue. This data corroborates with results of HOMA<sub>IR</sub>, postprandial and fasting glycaemia, OGTT and ITT, which showed significant improve of glucose intolerance and insulin resistance in diabetic rats treated with leucine. In conclusion, the chronic leucine supplementation increased adiposity in streptozotocin-induced diabetic rats in neonatal period, which was related to improve of glucose intolerance and insulin resistance. This show that trophic recovery of white adipose tissue is important for improve of metabolic disturbances related to glucose metabolism in this experimental model.

**Keywords:** Leucine, White Adipose Tissue, Adiposity, Diabetes.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Captação de ácidos graxos não esterificados pelos adipócitos.....	22
<b>Figura 2.</b> Regulação da adipogênese e lipogênese por meio da sinalização do mTORC1....	26
<b>Figura 3.</b> A sinalização do mTORC1 influencia as principais fases da adipogênese.....	27
<b>Figura 4.</b> Cronograma de execução dos experimentos <i>in vivo</i> realizados em biotério.....	32
<b>Figura 5.</b> Efeitos da suplementação crônica com leucina sobre o peso corporal e ganho de peso diário dos grupos experimentais.....	59
<b>Figura 6.</b> Efeitos da suplementação crônica com leucina sobre o consumo diário de ração estimado dos grupos experimentais.....	60
<b>Figura 7.</b> Efeitos da suplementação crônica com leucina sobre a eficácia alimentar dos grupos experimentais.....	61
<b>Figura 8A.</b> Efeitos da suplementação crônica com leucina sobre a homeostase glicêmica de ratos diabéticos.....	62
<b>Figura 8B.</b> Efeitos da suplementação crônica com leucina sobre a homeostase glicêmica de ratos diabéticos.....	63
<b>Figura 9.</b> Correlação linear de Pearson entre o peso dos coxins adiposos e a glicemia pós-prandial em animais diabéticos tratados ou não com leucina.....	65
<b>Figura 10.</b> O tratamento crônico com leucina aumenta a expressão das proteínas p-p70S6K1, PPAR $\gamma$ , FAS e ACC1 no coxim adiposo retroperitoneal em ratos diabéticos.....	66
<b>Figura 11.</b> O tratamento crônico com leucina aumenta a expressão das proteínas p-p70S6K1, PPAR $\gamma$ e AKT no coxim adiposo subcutâneo em ratos diabéticos.....	68
<b>Figura 12.</b> Curva glicêmica após sobrecarga oral de glicose (OGTT) de ratos diabéticos tratados ou não com leucina.....	93
<b>Figura 13.</b> Adipocinas secretadas no tecido adiposo retroperitoneal de ratos diabéticos com dieta suplementada ou não com leucina.....	95

**Figura 14.** A suplementação crônica com leucina aumenta a expressão de RNA<sub>m</sub> da adiponectina no tecido adiposo retroperitoneal de ratos diabéticos..... 96

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Sequência dos <i>primers</i> utilizados na reação de PCR em tempo real (qPCR).....	38
<b>Tabela 2.</b> Insulina sérica e peso relativo dos coxins adiposo subcutâneo e viscerais dos grupos experimentais.....	64
<b>Tabela 3.</b> Composição nutricional das dietas, conforme AIN-93M.....	91
<b>Tabela 4.</b> Peso corporal, consumo diário de ração e leucina, glicemia e insulinemia de jejum e índice HOMA <sub>IR</sub> ao final das 12 semanas de vida dos ratos diabéticos.....	92
<b>Tabela 5.</b> Triacilglicerol, Colesterol total, HDL colesterol e citocinas no soro de ratos diabéticos tratados ou não com leucina na 12 <sup>a</sup> semana de vida.....	94

## ABREVIATURAS

**TAB** Tecido Adiposo Branco

**PPAR $\gamma$**  Receptor Gama Ativado por Proliferadores de Peroxissomas

**SREBP-1c** Proteína 1c Ligadora do Elemento Regulado por Esteróis

**C/EBP** Proteínas Ligantes ao Amplificador CCAAT

**TA** Tecido Adiposo

**TNF- $\alpha$**  Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$

**AMP** Adenosina Monofosfato

**AG** Ácidos Graxos

**TAG** Triacilglicerol

**LPL** Lipase de Lipoproteína

**VLDL** Lipoproteínas de Densidade Muito Baixa

**PI3K** Fosfatidilinositol 3 Quinase

**PIP<sub>3</sub>** Fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato

**ACC** acetil-coA carboxilase

**IL-6** interleucina 6

**IL-8** interleucina 8

**DM1** Diabetes *mellitus* tipo 1

**STZ** Estreptozotocina

**AGNE** Ácidos Graxos Não Esterificados

**mTORC1** Complexo 1 da Proteína Alvo da Rapamicina em Mamíferos

**S6K1** Proteína Ribossomal S6 Quinase 1

**4E-BP1** Proteína 1 Ligante do Fator de Iniciação Eucariótico 4E

**ACLY** Acil-coA Liase

**ACC** Acetil-coA Carboxilase

**FAS** Ácido Graxo Sintase

**SCD-1** Estearoil-coA Desaturase-1

**GPAT** Glicerol-3-fosfato Aciltransferase

**ATGL** Lipase de Triacilglicerol

**HSL** Lipase Hormônio Sensível

**PDK1** Proteína Quinase 1 Fosfoinositídeo-Dependente

**PKB** Proteína Quinase B

**PEPCK** Fosfoenolpiruvato Carboxiquinase

**PREF-1** Fator Pré-Adipócito 1

**GAPDH** Gliceraldeído 3-fosfato Desidrogenase

**eIF4E** Fator de Iniciação Eucariótico 4E

**FABP4** Proteína 4 de Ligação ao Ácido Graxo

**AMPK** Proteína quinase de Adenosina Monofosfato

## SUMÁRIO

<b>1.0 INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2.0 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	18
2.1 O diabetes <i>mellitus</i> e a escassez de tecido adiposo branco.....	18
2.2 A dinâmica do tecido adiposo branco: o adipócito, adipogênese e lipogênese.....	20
2.3 O papel da leucina na fisiologia do tecido adiposo branco.....	23
<b>3.0 JUSTIFICATIVA, RELEVÂNCIA E PROPOSTA GERAL DO ESTUDO</b> .....	30
<b>4.0 OBJETIVOS</b> .....	31
4.1 OBJETIVO GERAL.....	31
4.2 OBJETIVOS ESPERÇÍFICOS.....	31
<b>5. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS</b> .....	32
5.1. Animais.....	32
5.2 Grupos Experimentais.....	32
5.3 Indução do diabetes, distribuição dos animais aos respectivos grupos e à ração	33
5.4 Rações.....	33
5.5 Avaliação clínica e sistêmica.....	34
5.5.1 <i>Teste oral de tolerância à glicose (OGTT)</i> .....	35
5.5.2 <i>Teste intraperitoneal de tolerância à insulina (ipITT)</i> .....	35
5.6 Eutanásia dos animais.....	35
5.7 Concentrações séricas de glicose e de insulina de jejum, TAG, HDL e CT, e de hormônios no soro e no tecido adiposo retroperitoneal (TRP).....	36
5.8 Estudos com coxins adiposos subcutâneo e retroperitoneal.....	36
5.8.1 <i>Western Blotting</i> .....	37
5.8.2 <i>Reação em Cadeia de Polimerase em tempo real (<math>q</math>PCR)</i> .....	38
<b>6.0 ANÁLISES ESTATÍSTICAS</b> .....	39



<b>7.0 CAPÍTULO 1/ARTIGO 1.....</b>	<b>40</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>41</b>
<b>1. Introdução.....</b>	<b>42</b>
<b>2. Seção Experimental.....</b>	<b>44</b>
2.1 <i>Animais.....</i>	44
2.2 <i>Dieta e desenho experimental.....</i>	44
2.3 <i>Eutanásia.....</i>	45
2.4 <i>Concentração de insulina no soro.....</i>	46
2.5 <i>Análises de Western Blotting.....</i>	46
2.6 <i>Análise Estatística.....</i>	47
<b>3. Resultados.....</b>	<b>47</b>
<b>4. Discussão.....</b>	<b>50</b>
<b>5. Conclusões.....</b>	<b>53</b>
<b>6. Referências.....</b>	<b>54</b>
<b>Figuras 5 a 11.....</b>	<b>59-69</b>
<b>8.0 CAPÍTULO 2/ARTIGO 2.....</b>	<b>70</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>71</b>
<b>1. Introdução.....</b>	<b>72</b>
<b>2. Métodos.....</b>	<b>74</b>
2.1 <i>Animais.....</i>	74
2.2 <i>Dieta e desenho experimental.....</i>	74
2.3 <i>Eutanásia.....</i>	75
2.4 <i>Concentrações séricas de glicose e de insulina de jejum, TAG, HDL e CT, e de hormônios no soro e no tecido adiposo retroperitoneal (TRP).....</i>	75
2.5 <i>Reação em Cadeia de Polimerase em tempo real (qPCR).....</i>	76
2.6 <i>Análise Estatística.....</i>	76
<b>3. Resultados.....</b>	<b>77</b>
<b>4. Discussão.....</b>	<b>80</b>
<b>5. Referências.....</b>	<b>84</b>
<b>Figuras 12 a 14.....</b>	<b>93-96</b>
<b>9.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>96</b>
<b>10.0 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>97</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>104</b>

## 1.0 INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença crônica que afeta uma população estimada em mais de 600 milhões de pessoas no mundo. No Brasil, a prevalência dessa doença aumentou de 15,8% para 17,9% nos últimos quatro anos. O rápido crescimento do número de indivíduos obesos no mundo tornou a obesidade um dos maiores problemas de saúde pública, por ser fator de risco para a manifestação de outras doenças crônicas, como hipertensão arterial, câncer e diabetes *mellitus*, que possuem impacto negativo na expectativa de vida (KELLY *et al.*, 2008; OUCHI *et al.*, 2011; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014; WHO, 2016).

O excesso de adiposidade corporal possui papel central na disfunção metabólica relacionada à obesidade, incluindo a manifestação da resistência à insulina e do diabetes. O tamanho da massa adiposa é determinado pela adipogênese (hiperplasia de adipócitos), processo regulado por fatores de transcrição como o PPAR $\gamma$ , SREBP-1c e o C/EBP, e pela lipogênese (hipertrofia de adipócitos), sendo esta regulada pela atividade de enzimas da lipogênese *de novo*, da reesterificação de ácidos graxos livres e da lipólise. Paralelo à associação entre o excesso de gordura corporal e o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis, como o diabetes, também tem sido amplamente discutido que reduções extremas na quantidade de gordura corporal podem ser tão prejudiciais quanto seu excesso, por serem determinantes na indução da resistência à insulina secundária à lipotoxicidade, sobretudo no diabetes tipo 1 (MARALDI *et al.*, 2007)

Atualmente, tem havido crescente interesse da comunidade científica em esclarecer aspectos da fisiologia dos adipócitos, destacando o papel do tecido adiposo branco como órgão endócrino e a sua contribuição na etiopatogênese da obesidade. Na perspectiva evolucionária, a funcionalidade dos adipócitos está associada com estratégias do organismo em manter a homeostase metabólica em condições de suprimentos irregulares de nutrientes (deficiência ou excesso), o que foi considerado um fator chave de sobrevivência (GALIC; OAKHILL; STEINBERG, 2010; OUCHI *et al.*, 2011).

Até 1993, o tecido adiposo branco (TAB) era considerado um depósito de armazenamento inerte para o excesso de combustível metabólico. Com a descoberta da leptina, hormônio produzido por este tecido que pode sinalizar o estado das reservas energéticas para outros órgãos, surgiu uma nova perspectiva sobre a biologia deste tecido (ZHANG *et al.*,

1994). Pesquisas sobre o efeito de compostos bioativos secretados pelo TAB, que atingem outros tecidos semelhantemente a hormônios, permitiram a sua classificação como órgão endócrino que regula o metabolismo (GALIC; OAKHILL; STEINBERG, 2010; TORRES-LEAL *et al.*, 2010).

Em humanos, a etiologia da perda severa de adiposidade pode estar associada com alterações na expressão e/ou na atividade de dois fatores de transcrição reguladores da adipogênese, da lipogênese e da sensibilidade à insulina – o receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomas (PPAR $\gamma$ ) e a proteína 1c ligadora do elemento regulado por esteróis (SREBP-1c), sugerindo que o TAB tem papel relevante na promoção de distúrbios metabólicos em pacientes diabéticos (PARK *et al.*, 2008; JENINGA; KALKHOVEN, 2010). Alguns nutrientes, como por exemplo, a leucina pode regular a adiposidade corporal por atuarem como moléculas de sinalização da adipogênese e da lipogênese no TAB, sugerindo que este componente da dieta pode ajudar no controle da disfunção metabólica associada à escassez de gordura corporal no diabetes *mellitus* (TORRES-LEAL *et al.*, 2011; MELNIK, 2012). A relação entre o TAB e a resistência à insulina no diabetes *mellitus* com perda severa de tecido adiposo branco reforça a necessidade de mais pesquisas no sentido de encontrar estratégias mais eficazes no controle dos distúrbios metabólicos associados a esta doença.

Na perspectiva de melhor esclarecer uma possível associação existente entre a leucina e a adiposidade reduzida no diabetes, torna-se fundamental avaliar o papel deste aminoácido como molécula de sinalização da adipogênese e da lipogênese no TAB e, portanto, como possível agente para a prevenção e/ou tratamento da reduzida adiposidade corporal e da resistência à insulina no diabetes.

## 2.0 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 O diabetes *mellitus* e a escassez de tecido adiposo branco

O diabetes *mellitus* é uma doença caracterizada por uma hiperglicemia crônica, resultante da deficiência na secreção de insulina que é secundária à destruição das células  $\beta$ -pancreáticas e/ou da resistência a este hormônio. Esta patologia compõe quatro grupos clínicos de desordens metabólicas relacionadas à hiperglicemia: DM1 – causada por uma falência pancreática primária; DM2 – na qual a resistência à insulina (RI) é um fator desencadeante importante; diabetes secundária a causas específicas, por exemplo, defeitos genéticos na função da célula  $\beta$ -pancreática ou na ação da insulina e doenças do pâncreas; e diabetes gestacional (ADA, 2016).

O DM1 é uma doença caracterizada por intensa destruição das células  $\beta$  do pâncreas, que é mediada pelas células T do sistema imune, o que reduz drasticamente a secreção de insulina (PARK *et al.*, 2008). O uso de modelos experimentais de diabetes induzido por estreptozotocina (STZ) tem sido amplamente explorado para esclarecer aspectos da complexa fisiopatologia do diabetes. A injeção de STZ em ratos no período neonatal provoca destruição progressiva e parcial das células  $\beta$  do pâncreas, causando hiperglicemia e hiperinsulinemia transitórias, no início da doença (TAKADA *et al.*, 2007), e redução da concentração de insulina plasmática e hiperglicemia moderadas na fase adulta, características semelhantes ao curso natural do diabetes em humanos (TAKADA *et al.*, 2008; de OLIVEIRA *et al.*, 2012).

O modelo de diabetes induzido pela STZ em ratos no período neonatal também produz resistência periférica à insulina no fígado, músculo e tecido adiposo branco. No estudo de Takada *et al.* (2007), o acompanhamento semanal de ratos diabéticos induzido por STZ até 12ª semana de vida mostrou um quadro clínico típico de diabetes descompensado. Além da deficiência na secreção de insulina, o número de receptores deste hormônio nos adipócitos, a captação de glicose e o tamanho destas células estavam reduzidos, o que compromete a capacidade do TAB em oxidar glicose e sintetizar lipídeos, revelando um quadro claro de resistência à insulina. Dessa forma, os autores concluíram que a perda extrema de massa adiposa branca compromete o bom funcionamento da via de sinalização da insulina nestes animais diabéticos, aspectos semelhantes ao diabetes em humanos.

A escassez de tecido adiposo branco evidenciado no modelo experimental de diabetes proposto por Takada *et al.* (2007) foi fator determinante para o quadro de resistência à insulina. Sabe-se que a deficiência do sinal anabólico da insulina e/ou distúrbios pós-receptores na cascata de sinalização da insulina também prejudica a capacidade do TAB de armazenar triacilglicerol, sintetizar a gota lipídica e estimular a adipogênese nos adipócitos, pois ocorre um prejuízo na expressão de PPAR $\gamma$  e SREBP-1c. Da mesma forma, a perda localizada ou generalizada de TAB promove sérias disfunções metabólicas que favorecem o desenvolvimento de diabetes e de complicações hepáticas e cardiovasculares (CAPEAU *et al.*, 2010; GARG, 2011; VIGOUROUX *et al.*, 2011). Portanto, não se sabe ao certo o que é causa e efeito nesta relação entre o diabetes e a disfunção endócrina do TAB.

Prejuízos na expressão ou na atividade de enzimas responsáveis pelo transporte e armazenamento de ácidos graxos e pela formação da gota lipídica no interior dos adipócitos reduz a capacidade do TAB de secretar adiponectina e leptina e aumentam as concentrações sanguíneas de ácidos graxos não esterificados (AGNE), o que favorece a manifestação do estresse oxidativo, inflamação decorrente da elevada infiltração de macrófagos e da liberação de citocinas pró-inflamatórias. Nestas condições, a elevada lipólise no TAB promove a distribuição ectópica de triacilglicerol e de AGNE para tecidos periféricos, como o músculo esquelético, vasos sanguíneos, coração, fígado e pâncreas, que incorporam o excesso de AGNE circulantes, onde é desencadeado um processo inflamatório, fenômeno conhecido por lipotoxicidade (HUANG-DORAN *et al.*, 2010; VIRTUE; VIDAL-PUIG, 2010).

Com a lipotoxicidade decorrente da extrema lipólise do TAB surgem distúrbios na homeostase à glicose e resistência à insulina em tecidos como o fígado, TAB e músculo esquelético. Estas disfunções produzem uma hiperinsulinemia grave, no início do diabetes, e insulinopenia severa na fase mais tardia. Neste contexto, a resistência à insulina também favorece o aumento da gliconeogênese e da lipogênese hepáticas, culminando em esteatose hepática e hipertrigliceridemia graves (PARK *et al.*, 2008; SEMPLE *et al.*, 2009; GARG, 2011; VIGOUROUX *et al.*, 2011). Além disso, Haque *et al.* (2002) evidenciaram que indivíduos com perda severa de gordura apresentaram reduzidas concentrações sanguíneas de leptina e adiponectina, adipocinas secretadas pelo TAB que favorecem o aumento da sensibilidade à insulina.

Qualquer alteração na adiposidade do tecido adiposo branco, seja seu excesso ou a sua ausência parcial ou total, modifica a capacidade dos adipócitos atuarem como células secretoras

de múltiplas proteínas biologicamente ativas, entre as quais estão a leptina, a adiponectina e as citocinas pro-inflamatórias, tais como as interleucinas 6 e 8 (IL-6 e IL-8) e o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Sabe-se que na obesidade, o excesso de gordura corporal aumenta a secreção de TNF- $\alpha$  que induz um processo inflamatório que conjuntamente com o estresse oxidativo prejudicam a ação da insulina. Da mesma forma, a perda intensa de TAB contribui para a instalação da resistência à insulina (TORRES-LEAL *et al.*, 2010; GARG, 2011; CAMPAÑA, 2013). Dessa forma, é fácil entender que manter uma adequada regulação da adipogênese e da lipogênese no TAB, processos que controlam a formação de adipócitos maduros e a biossíntese de lipídeos na célula adiposa, é essencial para garantir a boa funcionalidade deste tecido como órgão endócrino.

## 2.2 A dinâmica do tecido adiposo branco: o adipócito, adipogênese e lipogênese

O tecido adiposo (TA) desempenha importante papel na homeostase energética, no metabolismo lipídico e na ação da insulina. Além de ser o maior reservatório energético do organismo, este tecido atua como órgão endócrino por regular a secreção de citocinas como a leptina, adiponectina, TNF- $\alpha$ , entre outras. O TA é formado por adipócitos, pré-adipócitos, células endoteliais, células do estroma vascular, fibroblastos, leucócitos, macrófagos e células-tronco mesenquimais, sendo classificado em tecido adiposo **branco**, especializado no armazenamento de lipídeos; o **marrom**, especializado na termogênese, e é encontrado no dorso inferior do pescoço, na clavícula, ao longo da espinha dorsal e do tórax; e o **bege**, encontrado no interior do TAB, e induz a termogênese em resposta ao estímulo do AMP cíclico (CYPESS *et al.*, 2009; WU *et al.*, 2012).

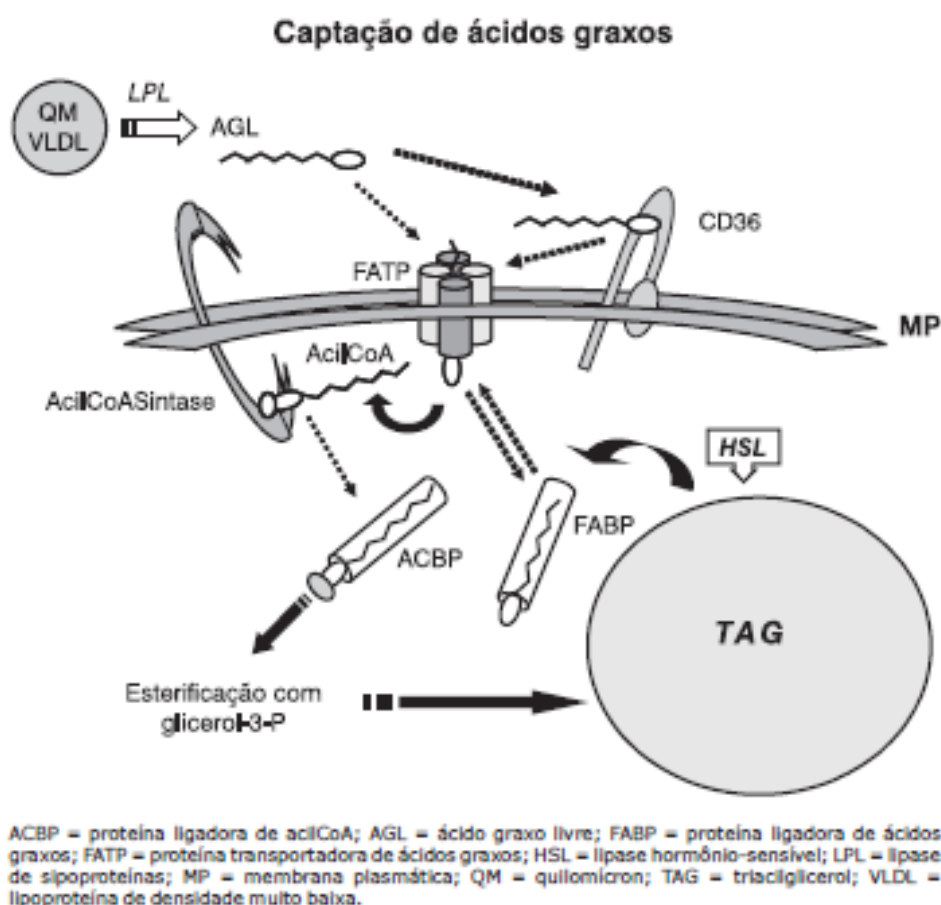
No TAB, o tamanho da massa adiposa é determinado pelo número de adipócitos que depende da formação de adipócitos maduros (adipogênese), e pelo acúmulo de lipídeos no interior dos adipócitos (lipogênese *de novo* e reesterificação de ácidos graxos). A adipogênese é um processo no qual pré-adipócitos de origem mesenquimal se diferenciam em adipócitos maduros por meio de estágios precisamente controlados por fatores de transcrição adipogênicos, incluindo o PPAR $\gamma$ , a SREBP-1c e as proteínas ligantes ao amplificador CCAAT (C/EBP - $\beta$ , - $\delta$  e - $\alpha$ ), que desempenham papel chave na complexa cascata transcricional da adipogênese (WHITE; STEPHENS, 2010).

Os C/EBP contêm um domínio *zipper* de leucina necessário para a sua dimerização, sendo que as isoformas do C/EBP ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\delta$ ) são altamente expressas em diferentes fases da adipogênese. Na fase inicial deste processo, a resposta à insulina favorece um rápido e transitório aumento na expressão dos C/EBP- $\beta$  e - $\delta$  em pré-adipócitos os quais, por sua vez, induzem a expressão do C/EBP- $\alpha$  e do PPAR $\gamma$ . Estes últimos fatores de transcrição se ligam à região promotora no núcleo e ativam genes específicos no TAB, levando a ativação da cascata da adipogênese. Esta inter-relação entre C/EBP $\alpha$  e PPAR $\gamma$  é fundamental para o controle transcricional da diferenciação dos pré-adipócitos em adipócitos maduros, apesar de que o PPAR $\gamma$  estimula a adipogênese na ausência de C/EBP $\alpha$  (ROSEN *et al.*, 2002; WHITE; STEPHENS, 2010).

Após a ativação dos eventos iniciais da adipogênese, os adipócitos reiniciam o ciclo celular, sofrem divisão celular regulada (expansão clonal), saem então do ciclo celular e entram na diferenciação terminal. Nesta última fase, o PPAR $\gamma$  estimula a expressão do C/EBP $\alpha$  que, por *feedback* positivo, mantêm a expressão do primeiro. Portanto, o PPAR $\gamma$  possui um papel crítico na regulação da adipogênese, enquanto que o C/EBP $\alpha$  induz a diferenciação dos pré-adipócitos, pelo menos indireta e parcialmente, por meio da sua ação na expressão do PPAR $\gamma$  (GESTA; TSENG; KAHN, 2007; WHITE; STEPHENS, 2010). Além disso, o PPAR $\gamma$  atua sinergicamente com C/EBP $\alpha$  para manter a adequada funcionalidade do adipócito, incluindo a captação de glicose dependente de insulina, a lipogênese *de novo*, captação e reesterificação de ácidos graxos, lipólise, síntese e secreção de adipocinas (FESTUCCIA *et al.*, 2009; CHOI *et al.*, 2010).

Outro fator de transcrição importante para a funcionalidade do TAB é o SREBP-1c, porém, o seu papel na adipogênese ainda não está completamente esclarecido. Este fator de transcrição modulado pela insulina é altamente expresso no tecido adiposo branco, e é fundamental para a formação dos adipócitos maduros (regula os estágios finais da adipogênese). Esta proteína induz a expressão do PPAR $\gamma$  e de um ligante endógeno deste fator de transcrição, além de vários outros genes críticos na biossíntese de lipídeos. A expressão do SREBP-1c é regulada pelos fatores de transcrição C/EBP- $\beta$ , C/EBP- $\delta$ , e C/EBP $\alpha$  durante a adipogênese (PAYNE *et al.*, 2009).

Sobre a lipogênese, no estado pós-prandial, os adipócitos apresentam grande capacidade de estocar triacilglicerol em seu citoplasma por meio da captação de ácidos graxos provenientes da dieta ou da lipogênese *de novo* (**Figura 1**). A esterificação dos ácidos graxos (AG) provenientes da dieta em triacilglicerol (TAG) inicia-se com a ação da lipase de lipoproteína (LPL) que hidrolisa lipídeos dos quilomícrons e das lipoproteínas de densidade muito baixas (VLDL) circulantes, liberando AG que penetram no adipócito por difusão facilitada por transportadores (CD36, FATP, entre outros) onde se esterificam com o glicerol-3-fosfato sintetizado a partir de glicose ou outros substratos não glicídicos (lactato, piruvato e aminoácidos), formando TAG que é armazenado no interior da gota lipídica no adipócito (CAMPAÑA, 2013).



**Figura 1:** Captação de ácidos graxos não esterificados pelos adipócitos (FONSECA-ALANIZ *et al.*, 2007).

A síntese *de novo* de ácidos graxos no interior dos adipócitos é regulada pela insulina, hormônio que induz a ativação da via PI3K/PIP<sub>3</sub>/AKT. Uma vez ativada, a AKT estimula a captação de glicose, a glicólise e a expressão de genes envolvidos na síntese de lipídeos. Na lipogênese *de novo*, moléculas de acetil-coA, derivadas da glicose ou do catabolismo de



aminoácidos, são utilizadas para formar ácidos graxos por meio da ação da enzima acetil-coA carboxilase (ACC). Esta enzima converte estas moléculas de acetil-coA em malonil-coA. Esta molécula, então, entra na reação catalisada pela enzima ácido graxo sintase (FAS), culminando na formação de acil-coA. Este é acoplado à molécula de glicerol-3-fosfato para formar triacilglicerol. Evidências também apontam que a ativação da AKT também ativa o fator de transcrição nuclear SREBP1c que estimula a expressão de genes lipogênicos envolvidos na síntese de colesterol, ácidos graxos, triacilglicerol e fosfolípidos (LAPLANTE; SABATINI, 2009; RICOULT e MANNING, 2013; PORSTMANN *et al.*, 2009).

Diante do exposto até aqui, é fácil perceber que possuir um TAB “saudável” e funcional é necessário para manter uma adequada homeostase metabólica. Isto é observado tanto na obesidade quanto em doenças associadas à lipodistrofia, situações em que o excesso e a escassez de TAB causam uma severa resistência à insulina, dislipidemia e esteatose hepática. Considerando, portanto, que o TAB é um órgão endócrino regulador da homeostase metabólica e que a escassez deste tecido altera a sua funcionalidade, tem sido importante determinar o papel do TAB na severidade dos distúrbios metabólicos relacionados a RI no diabetes e, dessa forma, desenvolver estratégias terapêuticas que visem amenizar os sintomas desta doença, destacando o papel da suplementação de aminoácidos, especificamente a leucina, na regulação da adiposidade corporal e da sensibilidade à insulina.

### **2.3 O papel da leucina na fisiologia do tecido adiposo branco**

Os aminoácidos, como a glutamina e a leucina, são moléculas que atuam tanto na sinalização celular quanto como precursores para a síntese de hormônios e de substâncias nitrogenadas de baixo peso molecular. Estes aminoácidos são também importantes reguladores da cascata de fosforilação de proteínas e da expressão de genes em níveis transcricional, traducional e pós-traducional. Nos últimos anos, o papel dos aminoácidos de cadeia ramificada, leucina, valina e isoleucina, na regulação do metabolismo, do crescimento e da imunidade celular tem recebido muita atenção. Em especial, a leucina, um aminoácido essencial que é descrito como um nutriente sinalizador de ação direta em adipócitos (LYNCH *et al.*, 2002; WU, 2009).

A leucina é um aminoácido de cadeia ramificada proveniente de cerca de 20% do total de proteínas da dieta, sendo que a sua ação como molécula de sinalização é dependente do sensor de leucina no meio intracelular, que foi descoberto como leucil-RNAsintetase (HAN *et al.*, 2012), além da sua concentração no interior dos tecidos que é regulada pelas enzimas mitocondriais aminotransferase de cadeia ramificada, presente no músculo esquelético e no tecido adiposo, e desidrogenase de  $\alpha$ -cetoácido de cadeia ramificada, encontrada em maiores concentrações no fígado e no tecido adiposo. A primeira transfere o grupo amino da leucina para o  $\alpha$ -cetogluturato, para formar glutamato e seu correspondente  $\alpha$ -cetoácido ( $\alpha$ -cetoisocaproato), a segunda é uma enzima limitante que regula a oxidação completa do  $\alpha$ -cetoisocaproato a acetil-coA e a acetoacetato (ADAMS, 2011).

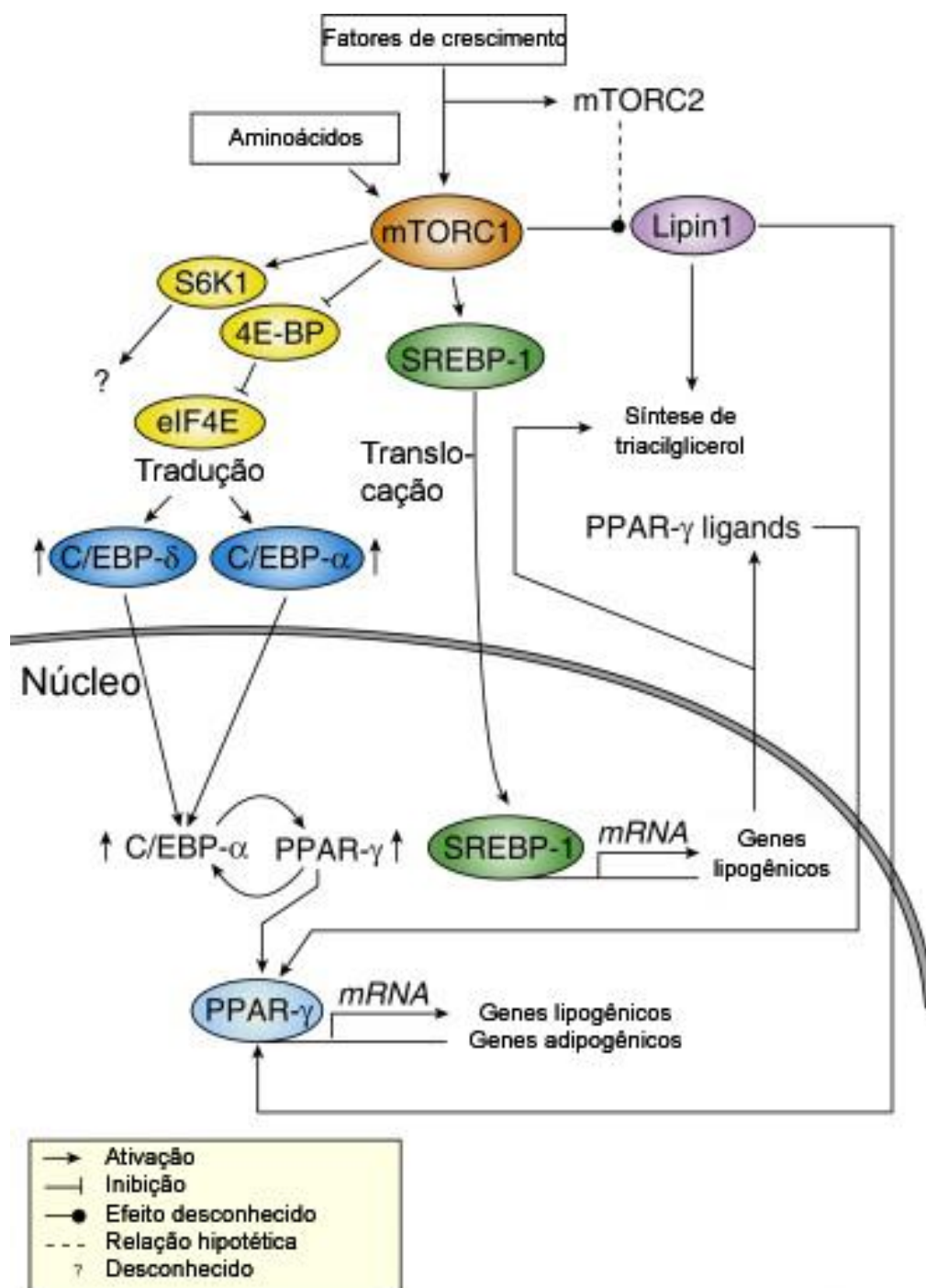
No TAB, os produtos da degradação da leucina, acetil-CoA e acetoacetato, podem ser oxidados para a síntese de energia, durante o jejum, ou serem precursores para a síntese de ácidos graxos de cadeia longa e colesterol no estado pós-prandial. Este tecido é bastante ativo na utilização dos aminoácidos de cadeia ramificada, sendo que a concentração intracelular de leucina nos adipócitos é quatro vezes maior que no músculo esquelético, enquanto, no tecido muscular, 25 a 50% da leucina estão no meio extracelular (MINEMURA; LACY; CROFFORD, 1970; MELNIK, 2012).

Como nutriente sinalizador de ação direta nos adipócitos, a leucina é considerada o regulador mais potente da síntese proteica, por induzir a ativação do complexo 1 da proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTORC1), uma proteína quinase sensível a nutrientes. A sinalização da via do mTORC1 também é essencial na diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos maduros (adipogênese), na hipertrofia do TAB, na secreção de leptina, e na síntese e secreção da adiponectina. Assim, a leucina também possui papel importante no metabolismo do TAB e na homeostase energética (BLÜMER *et al.*, 2008; MELNIK, 2012).

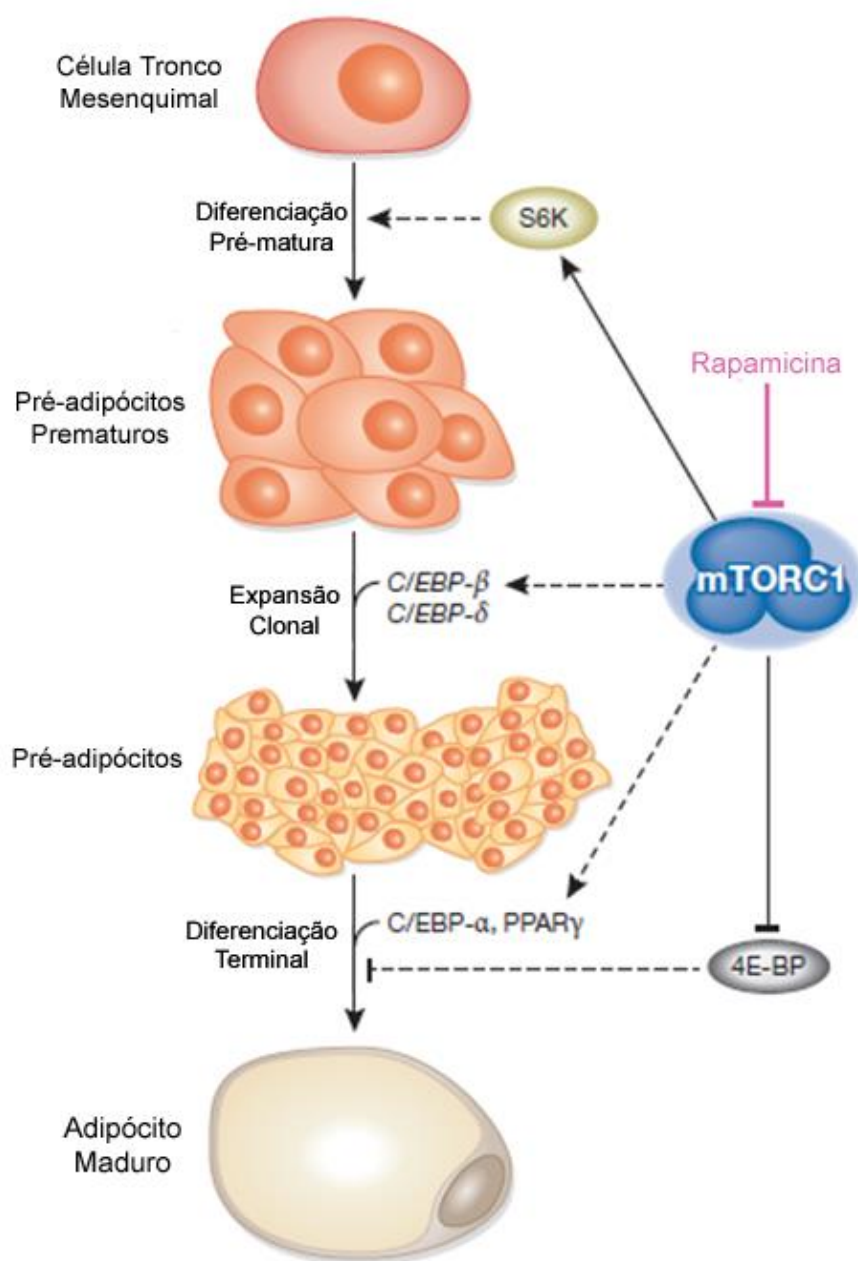
Os mecanismos pelos quais a leucina participa diretamente da ativação da via do mTORC1 envolvem o transporte deste aminoácido para o interior das células, que requer o efluxo de glutamina via transportador SLC7A5. O influxo de leucina estimula o recrutamento do mTORC1 inativo para a membrana dos lisossomos, onde esta proteína se liga à Rag GTPases, ativando-as, que, em seguida, interagem com raptor (proteína regulatória associada ao mTOR). A formação do complexo mTORC1/raptor/Rag GTPases estimula a translocação do mTORC1 para o interior dos lisossomos que contêm um *pool* de Rheb-GTP, outra família

de GTPases, onde a interação do mTORC1 com o seu coativador Rheb promove a ativação do mTORC1 (NICKLIN *et al.*, 2009; SANCAK *et al.*, 2010).

O mTORC1, quando ativado pela leucina, favorece a fosforilação dos substratos p70S6K1 (proteína ribossomal S6 quinase 1), ativando-o, e do 4E-BP1 (proteína 1 ligante do fator de iniciação eucariótico 4E), inibindo-o. Por meio da ação destes substratos, o mTORC1 regula o metabolismo, o crescimento e a proliferação celulares, por induzir diversos processos anabólicos, incluindo a síntese de proteínas, organelas e lipídeos. No TAB, evidências sugerem que a ativação da via de sinalização do mTORC1 pela leucina estimula a hipertrofia e a hiperplasia deste tecido, por influenciar diretamente a captação e/ou biossíntese de lipídeos (lipogênese) e a adipogênese nos adipócitos (CARNEVALLI *et al.*, 2010; TORRES-LEAL *et al.*, 2011; ZEANANDIN *et al.*, 2012). Os mecanismos moleculares pelos quais o mTORC1 regula a adipogênese e lipogênese serão descritos a seguir (**Figuras 2 e 3**).



**Figura 2.** Regulação da adipogênese e lipogênese por meio da sinalização do mTORC1. Adaptado de Laplante & Sabatini (2009).



**Figura 3.** A sinalização do mTORC1 influencia as principais fases da adipogênese. Adaptado de Ricoult & Manning (2013).

Nos adipócitos, a ativação do mTORC1 pela leucina aumenta a clivagem e a translocação do SREBP-1c ativo para o núcleo, onde estimula a expressão de genes da lipogênese *de novo*, como o da enzima acil-coA liase (ACLY), acetil-coA carboxilase (ACC), ácido graxo sintase (FAS), estearoil-coA desaturase-1 (SCD-1), glicerol-3-fosfato aciltransferase (GPAT), responsáveis pela síntese de ácidos graxos, triacilglicerol e de fosfolipídeos. O SREBP1c é o principal efetor transcricional do mTORC1, sendo que a ativação deste fator é S6K1-dependente. O mTORC1 também regula indiretamente a

atividade deste fator, pois fosforila a enzima ácido fosfatídico fosfatase (lipina 1), o que eleva a concentração de SREBP-1c ativos no núcleo e a expressão de genes alvo da SREBP1; no entanto, o mecanismo envolvido neste processo ainda não está totalmente esclarecido (PORSTMANN *et al.*, 2009; PETERSON *et al.*, 2011).

Além da ação da leucina na lipogênese, este aminoácido também influencia a lipólise no TAB, no qual a completa hidrólise de triacilglicerol a glicerol e ácidos graxos é regulada pela atividade coordenada das lipases de triacilglicerol, diacilglicerol e monoacilglicerol. A lipase de triacilglicerol (ATGL) é considerada uma enzima limitante da lipólise nos adipócitos e possui papel essencial no controle do tamanho destas células (ZECHNER *et al.*, 2009). Em um estudo de Chakrabarti *et al.* (2010) com adipócitos 3T3-L1, foi demonstrado que a ativação da via do mTORC1 inibe a atividade e a expressão do gene que codifica a ATGL e a lipase hormônio sensível (HSL), impedindo a lipólise de triacilglicerol e diacilglicerol.

Nos adipócitos, o aumento da lipogênese *de novo* e a inibição da lipólise induzida pelo mTORC1, também está associado com o aumento na expressão do fator de transcrição PPAR $\gamma$  e de seu coativador PPAR $\gamma$ 2 (expresso exclusivamente no TAB), cuja ativação estimula a captação, síntese e esterificação de ácidos graxos, e o armazenamento de triacilglicerol na célula adiposa recém formada, bem como regula a hidrólise de TAG e a sensibilidade à insulina (LAPLANTE e SABATINI, 2009; CHAKRABARTI *et al.*, 2010).

A ativação do mTORC1 também influencia diretamente a fase terminal da diferenciação dos pré-adipócitos em adipócitos maduros (adipogênese), processo cuidadosamente coordenado pelo PPAR $\gamma$  e pelo C/EBP $\alpha$ . O mTORC1 aumenta a expressão dos genes do PPAR $\gamma$  e do C/EBP $\alpha$  e estimula a adipogênese/biossíntese de lipídeos, sendo estes efeitos causados pela inibição do C/EBP1 e/ou pela ativação direta do PPAR $\gamma$  pelo mTORC1, por mecanismos ainda não elucidados (ZHANG *et al.*, 2009; RICOULT; MANNING, 2013). Estudos *in vitro* mostraram que a inibição do mTORC1, causada pela rapamicina, reduziu a expressão gênica do C/EBP $\alpha$  e do PPAR $\gamma$ , inibiu a atividade deste último e prejudicou a expressão de vários genes lipogênicos em pré-adipócitos (KIM; CHEN, 2004; CHO *et al.*, 2004).

Outros estudos mostram que o mTORC1 também influencia o primeiro passo da adipogênese - a formação de pré-adipócitos imaturos a partir da de células tronco mesenquimais - por meio da sua ação sobre a atividade do S6K1 (UM *et al.*, 2004;

CARNEVALLI *et al.*, 2010). No entanto, o mecanismo molecular pelo qual a S6K1 controla a adipogênese ainda não está totalmente esclarecido.

O mTORC1 também regula a adipogênese por meio de mecanismos complementares, como por exemplo, o seu efeito sobre a ativação do SREBP1 no núcleo dos adipócitos e a fosforilação da lipina. A clivagem do SREBP1c pelo mTORC1 contribui para a indução da adipogênese e lipogênese por promover a síntese de ligantes endógenos do PPAR $\gamma$ . Outro mecanismo envolve a ação do mTORC1 na atividade da lipina 1. Esta enzima atua como coativador do PPAR $\gamma$ , e indiretamente mantêm a expressão do C/EBP $\alpha$ , que ajuda a manter as características lipogênicas dos adipócitos maduros (KOH *et al.*, 2008; LAPLANTE; SABATINI, 2009).

Pesquisas também têm destacado o efeito da leucina como nutriente regulador da função endócrina do adipócito, principalmente quanto à secreção de adipocinas, como a leptina e a adiponectina, substâncias biologicamente ativas que aumentam a sensibilidade à insulina e melhoram a tolerância à glicose. Além disso, a adiponectina é considerada a principal adipocina anti-inflamatória secretada pelo adipócito. Experimentos *in vitro* têm demonstrado que a leucina estimula o aumento da síntese e da secreção de adiponectina nos adipócitos, de maneira mTORC1-dependente (LYNCH *et al.*, 2006; BLÜMER *et al.*, 2008; TORRES-LEAL *et al.*, 2011).

Outro efeito atribuído à leucina está associado à via de sinalização da insulina nos adipócitos. Nos estudos de Hinault *et al.* (2004 e 2006) com adipócitos tratados com *wortmannin* (inibidor da fosfatidil inositol 3 quinase, PI3K), que bloqueia o transporte de glicose induzido pela insulina, foi demonstrado que a leucina aumentou a captação de glicose pelos adipócitos relacionada com o aumento na lipogênese no TAB. Os autores sugeriram que este aminoácido recuperou a via de sinalização de insulina, por estimular a PDK1 (proteína quinase 1 fosfoinositídeo-dependente) que ativa a PKB (proteína quinase B, também conhecida como AKT), quando a via da PI3K está inibida.

### 3.0 JUSTIFICATIVA, RELEVÂNCIA E PROPOSTA GERAL DO ESTUDO

Atualmente, existe crescente interesse em esclarecer melhor o envolvimento do TAB na fisiopatologia do diabetes *mellitus*, visando buscar possíveis estratégias terapêuticas que favoreçam o controle glicêmico e insulínico nesta doença. No modelo experimental de diabetes induzido por STZ no período neonatal proposto por Takada *et al.* (2007), além da hiperglicemia crônica, observou-se importante redução da adiposidade corporal que desencadeou uma resistência à insulina em ratos diabéticos, o que foi considerado um ponto crucial para a disfunção metabólica e diabetogênica nesta doença. Por outro lado, a recuperação trófica da massa adiposa branca, seja pelo tratamento com insulina ou com pioglitazona foi efetiva em reverter consideravelmente a resistência à insulina e as anormalidades metabólicas deste modelo (TAKADA *et al.*, 2008). Nessa perspectiva, a redução extrema da adiposidade corporal que acompanha o diabetes, bem como a sua recuperação, reforçam o papel do TAB como órgão endócrino que pode influenciar a resposta à insulina e o controle glicêmico no indivíduo diabético.

Embora recentemente tenham sido descritas algumas ações da leucina influenciando as respostas metabólicas adipogênicas e lipogênicas do TAB, sobretudo com relação à ação da insulina, há grande escassez de informações sobre os efeitos da suplementação crônica com leucina em ratos diabéticos com perda extrema de tecido adiposo branco. Considerando, portanto, que algumas respostas do TAB à insulina são influenciadas pela leucina; e na perspectiva de melhor esclarecer uma possível associação existente entre a leucina e a adiposidade reduzida no diabetes e, dessa forma, contribuir na busca de estratégias terapêuticas e/ou preventivas para esta disfunção metabólica, torna-se fundamental avaliar as repercussões deste tratamento sobre a expressão de proteínas envolvidas na regulação da lipogênese e da adipogênese nos adipócitos, bem como os efeitos da recuperação trófica do TAB sobre a homeostase glicêmica no diabetes.



## 4.0 OBJETIVOS

### 4.1 GERAL

Investigar os efeitos da suplementação crônica com leucina sobre a adiposidade do tecido adiposo branco, bem como a repercussão metabólica desta modulação em ratos com diabetes induzido por estreptozotocina no período neonatal.

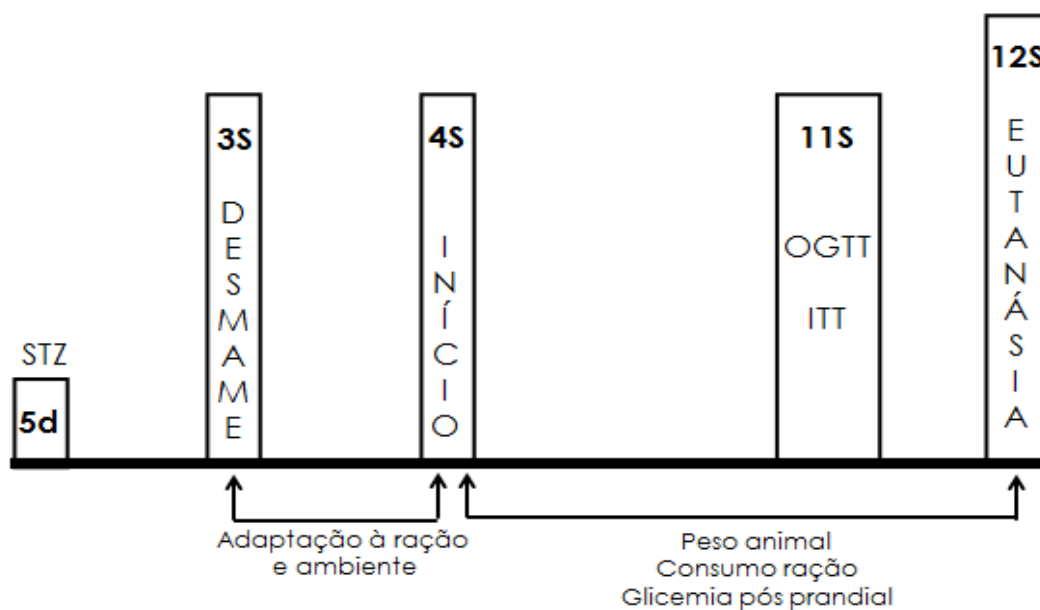
### 4.2 ESPECÍFICOS

- Investigar a presença da hiperglicemia, hipoinsulinemia e da resistência à insulina neste modelo experimental de diabetes;
- Verificar a hiperfagia diabética presente em animais diabéticos;
- Verificar a perda de massa adiposa em animais diabéticos que não receberam qualquer tipo de tratamento;
- Avaliar o efeito da suplementação crônica com leucina sobre o tamanho da massa adiposa nos coxins subcutâneo e visceral dos grupos experimentais, e estabelecer possíveis mecanismos moleculares por meio da análise da expressão proteica (frações totais e/ou fosforiladas) da mTOR, p70S6K, PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$ , ACC1 e FAS;
- Avaliar o efeito da suplementação com leucina sobre a hiperfagia diabética e a concentração de citocinas no tecido adiposo branco e no soro de animais diabéticos;
- Avaliar a repercussão metabólica relacionada à intolerância à glicose e à resistência à insulina em ratos diabéticos tratados com leucina.

## 5.0 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

### 5.1 Animais

Neste estudo, utilizou-se 48 ratos machos da linhagem *Wistar* que foram acompanhados do nascimento até completarem 12 semanas de vida em biotério de experimentação (**Figura 4**). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, sob condições de temperatura ambiental controlada de 23°C, ciclo de iluminação claro/escuro de 12/12 h (período claro iniciando às 14h00min), com água e ração *ad libitum* (padrão AIN-93M). Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Protocolo CEUA/FCF/380).



**Figura 4.** Cronograma de execução dos experimentos *in vivo* realizados em biotério.

### 5.2 Grupos experimentais

Ratos *Wistar*, machos, desmamados, foram distribuídos em três grupos: **i)** Grupo C (n=12) – não diabético com ração controle; **ii)** Grupo D (n=12) – diabético, ração controle; **iii)** Grupo DL (n=12) – diabético, ração suplementada com 5% de L-leucina. Após o período de 12 semanas de vida, os animais foram eutanasiados.

### 5.3 Indução do diabetes, distribuição dos animais aos respectivos grupos e à ração

A indução do diabetes foi realizada no quinto dia de vida dos animais (período neonatal). Após 8 horas de jejum (período em que os filhotes permaneceram separados de suas mães), os animais receberam uma injeção intraperitoneal de estreptozotocina (STZ) - 120mg/kg peso corporal (p.c.) - diluída em tampão citrato de sódio (10 mmol/L, pH 4,5) (TAKADA et al., 2007 e 2008). Animais do grupo controle também recebeu uma injeção intraperitoneal contendo apenas tampão citrato. Em seguida, todos os animais foram mantidos com suas respectivas mães até completarem 3 semanas de vida (desmame). No desmame, os animais foram distribuídos em seus respectivos grupos, e tiveram 1 semana de adaptação à ração e às gaiolas. Todos os ratos que pertenciam ao grupo diabético apresentaram uma glicemia igual ou superior a 150 mg/dL, semelhante ao estudo de Takada et al. 2007, e foram incluídos no estudo. Os ratos do grupo DL receberam ração suplementada com 5% de L-leucina, e os animais dos grupos C e D receberam ração controle (TORRES-LEAL *et al.*, 2011).

É importante destacar que outro grupo de animais diabéticos (n = 12) recebeu ração suplementada com uma mistura de aminoácidos não essenciais (alanina, ácido aspártico, glicina, prolina e serina) para manter o balanço isonitrogenado entre as rações. No entanto, os dados deste grupo (grupo DA) não foram considerados neste estudo, visto que os aminoácidos que compõem a ração AANE são exclusivamente neoglicogênicos, ou seja, estimulam a síntese hepática de glicose. Este fato agravou acentuadamente o quadro clínico da doença nestes animais, isto é, o consumo diário de ração foi quase duas vezes maior que o do grupo D (polifagia) e houve uma piora importante da hiperglicemia crônica (**Figura 15, Anexos, página 106**).

### 5.4 Rações

As rações foram preparadas, em forma de *pellets*, nas dependências do Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, de acordo com as recomendações do *American*

*Institute of Nutrition* (REEVES, 1993). Semelhante ao estudo de Lewis et al. (2003), as dietas dos animais foram preparadas com base na ração de manutenção AIN-93M. Aqueles autores demonstraram em seu estudo que ratos alimentados com ração AIN-93M desde o desmame até 36 semanas de idade apresentaram curvas de crescimento e de peso corporal normal, o que levou os autores a concluir que a sua formulação possui nutrientes em quantidades adequadas ao requerimento nutricional dos animais em crescimento.

**Ração controle** – Cada quilograma da ração AIN-93M possui 620,692g de amido, 100g de sacarose, 50g de celulose, 140 de caseína, 1,8g L-cistina, 40g de óleo de soja, 35g de mistura de minerais, 10g de mistura de vitaminas, 2,5g de bitartarato de colina e 0,008g de terc-butil-hidroquinona.

**Ração suplementada com leucina** – partindo da formulação da dieta AIN-93M, foi adicionada 5% de L-Leucina (50g/1000g), ou seja, 50g de amido foram substituídos por L-Leucina. Esta dose se encontra dentro do maior nível de ingestão em que não alterou a concentração plasmática de ureia, marcador de toxicidade renal devido ao excesso de nitrogênio, após 13 semanas em ratos (TSUBUKU *et al.*, 2004). Além disso, Matsuzaki *et al.* (2005) não encontraram qualquer alteração no ganho de peso corporal, na ingestão alimentar, na atividade de biomarcadores de toxicidade hepática e renal como as enzimas aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, creatina fosfoquinase e fosfatase alcalina em ratos saudáveis suplementados com 5% de leucina.

## 5.5 Avaliação clínica e sistêmica

A partir da 4ª semana de vida dos animais, a evolução clínica dos animais foi avaliada mediante acompanhamento do peso corporal e do consumo alimentar, sendo realizada 2 vezes/semana com uso de uma balança semianalítica. O consumo alimentar foi estimado mediante o cálculo da diferença entre a quantidade de ração disponibilizada anteriormente e a sobra, e o resultado desta diferença foi dividido por 7 para obter o consumo diário de ração. Para estimar o ganho de peso corporal diário, também foi feita a diferença entre o peso corporal anterior e o atual, dividido por 7. Além disso, a glicemia pós prandial dos animais foi avaliada 2 vezes/semana. Para isto, 2 horas após o acender das luzes, uma amostra de sangue da cauda do animal foi coletada com auxílio de aparelho de glicosímetro (Accu-check

performa, Roche®, SP, Brasil). Na 11ª semana de vida dos animais, foram realizados os testes de tolerância oral à glicose (OGTT) e curva de tolerância à insulina (ITT), descritos a seguir.

#### 5.5.1 Teste oral de tolerância à glicose (OGTT)

Para a determinação da curva glicêmica após sobrecarga de glicose oral, os animais após jejum prévio de 8 horas, receberam uma dose da solução de glicose a 50% (75mg/100g p.c.), por gavagem. Realizou-se a análise da glicemia capilar caudal, por meio de glicosímetro (Accu-check performa, Roche®, SP, Brasil), em diferentes momentos: 0 (basal), 5, 15, 30, 60 e 90 minutos após a administração de glicose. Para garantirmos que o período de jejum entre os animais fossem similares, no dia anterior ao teste, as rações dos respectivos animais foram retiradas por 5 horas; em seguida, os ratos voltaram a ter acesso *ad libitum* à ração por mais 5 horas. Somente após período, a ração foi totalmente retirada por 8 horas antes do início do teste e, nesse processo, os animais foram colocados em gaiolas limpas para garantir que não houvesse quaisquer resquícios de ração.

#### 5.5.2 Teste intraperitoneal de tolerância à insulina (ipITT)

Para a determinação da curva glicêmica, após jejum prévio de 8 horas, foi injetada uma dose de insulina (75 mU/100g p.c.) na região intraperitoneal. Foi analisada a glicemia capilar caudal, por meio de glicosímetro nos momentos: 0 (basal), 3, 6, 10, 15, 30, 45 e 60 minutos após a carga de insulina. Para a realização do teste foi adotado o mesmo procedimento para o jejum dos animais, descrito anteriormente (**item 5.5.1**).

### 5.6 Eutanásia dos animais

Ao completarem a 12ª semana de vida, os animais foram anestesiados após 6 horas de jejum e eutanasiados. Com a finalidade de minimizar as diferenças no intervalo de jejum entre os animais, no dia anterior à eutanásia, foi retirada a ração dos respectivos animais por 5 horas; em seguida, os ratos voltaram a ter acesso *ad libitum* à ração por mais 5 horas. Somente após período, a ração foi totalmente retirada por 6 horas antes do início da eutanásia e, nesse processo, os animais foram colocados em gaiolas limpas para garantir que não houvesse quaisquer resquícios de ração. A ordem dos animais foi rotativa, ou seja, um animal de cada

grupo era eutanasiado até que se repetisse o primeiro grupo. Com isso, os grupos apresentaram, em média, o mesmo período de jejum.

Imediatamente após a eutanásia dos animais, foi realizada uma laparotomia para a exposição dos coxins adiposos [TAB subcutâneo - SC (região inguinal) e visceral (retroperitoneal - RP, epididimal - EP, mesentérico - MS)], os quais foram rapidamente pesados em balança analítica com precisão de 0,0001g e, posteriormente, armazenados em freezer – 80°C. O peso dos tecidos adiposos foi determinado pela razão entre o peso total do tecido e o peso do animal, e expresso em g/100g do animal. Amostras de sangue foram coletadas em tubos sem anticoagulante e o soro, obtido por centrifugação, foi armazenado em freezer – 80°C em microtubos para análises das concentrações séricas de glicose, insulina, HDL-colesterol, Colesterol total, triacilglicerol e de citocinas como a leptina, adiponectina, TNF-  $\alpha$ , IL-6 e IL-10.

### **5.7 Concentrações séricas de glicose e de insulina de jejum, TAG, HDL e CT, e de hormônios no soro e no tecido adiposo retroperitoneal (TRP)**

As concentrações de glicose, triacilglicerol, HDL-colesterol e colesterol total no soro foram determinados por método enzimático-colorimétrico, utilizando-se kits da LABTEST, por meio do aparelho LABMAX. As análises de insulina no soro, e de adiponectina, leptina, TNF-alfa, IL-6, IL-10 e IL-1beta no soro e no TRP foram realizadas utilizando-se kit's MILLIPLEX<sup>®</sup> MAP com *beads* magnéticas (RMHMAG-84K, RECYTMAG-65K, RADPNMAG-81K) (<sup>®</sup>MILLIPORE). O índice HOMA<sub>IR</sub> (*homeostasis model of assessment-insulin resistance*) foi calculado como um indicador de resistência à insulina:  $HOMA = [(insulinemia\ de\ jejum\ (mU/L) \times glicemia\ de\ jejum\ (mmol/L)]/22,5$ .

Para as análises no TRP, 200mg de tecido foi homogeneizado em 800 $\mu$ L de tampão PBS contendo inibidores de protease e fosfatase, em seguida, 25 $\mu$ L do extrato de TRP foi analisado conforme protocolo descrito em cada kit Milliplex MAP. Os resultados das análises de adipocinas (leptina, adiponectina, TNF-alfa, IL-6, IL-10 e IL-1beta) realizadas no TRP foram expressos em pg/mg de proteína ou ng/mg de proteína. Para isso, 25 $\mu$ L do extrato de TRP foi utilizado para quantificar o conteúdo total de proteína, segundo protocolo descrito no kit de quantificação de proteína por BCA (Pierce; <sup>®</sup>Thermo Scientific).

## 5.8 Estudos com coxins adiposos subcutâneo e retroperitoneal

### 5.8.1 Western Blotting

Para as análises de *Western Blotting*, 300mg de cada coxim foram homogeneizados em 600 $\mu$ L de tampão RIPA contendo inibidores de protease e fosfatases. Em seguida, 10 $\mu$ L do extrato de cada tecido adiposo foi utilizado para quantificar o conteúdo total de proteína, segundo protocolo descrito no kit de quantificação de proteína por BCA (Pierce; <sup>®</sup>Thermo Scientific). Para o ensaio, 10 $\mu$ L do homogenato de tecido foram diluídos em 190 $\mu$ L de água deionizada com um fator de diluição 1:20 (20x). Os reagentes de detecção foram diluídos na proporção 1:50. Em seguida, 10 $\mu$ L da amostra diluída reagiu com 200 $\mu$ L da solução contendo os reagentes de detecção, cuja leitura foi realizada por espectrofotômetro a 562 nm.

Amostras contendo proteínas (50 $\mu$ g tecido adiposo SC e 60 $\mu$ g tecido adiposo RP) foram aquecidas por 5 minutos a 100°C, em tampão contendo 240mM-Tris (pH 6,8), 40% glicerol, 0,8% SDS, 200mM- $\beta$ -mercaptoetanol e 0,02% de azul de bromofenol. Logo em seguida, resfriadas em gelo e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Após a completa corrida das proteínas no gel, elas foram transferidas para membrana de nitrocelulose em tampão de transferência (3mM glicina, 48nM Tris base, 0,037% SDS, pH 8,3). As membranas de nitrocelulose foram incubadas em solução de bloqueio 0,5% de albumina sérica (BSA) (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) diluída em PBS com *Tween* (PBST), em seguida, foram lavadas e incubadas *overnight* a 4°C com anticorpos primários específicos (Cell Signaling Technology<sup>®</sup>), na proporção de 1:1000 - mTOR, p-mTOR (Ser2448), p70S6K1, p-p70S6K1 (Thr389), PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$ , ACC1, FAS, AKT, p-AKT (Thr308). Após 3 lavagens com PBST, as membranas foram incubadas durante 1 hora com anticorpo secundário *anti-rabbit* IgG com peroxidase diluído 1:5000 em PBST e 2% de BSA. Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpo monoclonal *anti- $\beta$ -actin* peroxidase (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>), diluído na proporção 1:25.000, que foi utilizado como normalizador. As imagens (bandas) foram visualizadas no aparelho Image-Quant 400 (GE Healthcare). A proteína total foi calculada por meio da densidade de cada banda e normalizada pela densidade da  $\beta$  actina, em *software* específico.

### 5.8.2 Reação em Cadeia de Polimerase em tempo real (*q*PCR)

O RNA foi extraído do tecido adiposo utilizando o reagente Trizol (®Invitrogen), seguindo instruções do fabricante. As amostras contendo o RNA foram dissolvidas em água DEPC e suas concentrações foram determinadas por meio do espectrofotômetro (Nanodrop) nos comprimentos de onda de 260nm (RNA) e 280 (proteína). O grau de pureza da amostra foi avaliado por meio da relação das leituras 260/280, sendo considerados valores ideais entre 1,8 e 2,0. Uma alíquota do RNA foi submetida à eletroforese em gel de agarose a 1% para visualização da integridade do RNA, observando as subunidades do RNA ribossômico, 18S e 28S, e também possíveis contaminações com DNA.

Em seguida, o DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 2µg de RNA total, com auxílio do kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (®Applied Biosystems). Este kit usa *random primer* para iniciar a síntese de cDNA, em termociclador, nas seguintes condições: ciclos a 25°C (10 minutos), a 37°C (120 minutos), a 85°C (5 minutos) e a 4°C (3 minutos). Foi utilizado 2µL de cDNA, SYBR Green master mix e primers (®Applied Biosystems) para as análises de *q*PCR (sequência de primers – Tabela 1). As reações de PCR em tempo real foram realizadas em triplicata em placas específicas de 96 poços no equipamento StepOnePlus Real-Time PCR System, utilizando o sistema para detecção de produtos de amplificação SBYR Green Mastermix (®Applied Biosystems). A quantificação relativa de cada RNA mensageiro (RNAm) foi calculada pelo método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , utilizando a expressão do gene da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) como normalizador. Os dados foram reportados como *folds*, cujos valores foram comparados àqueles do grupo controle.

**Tabela 1.** Sequência dos primers utilizados na reação de PCR em tempo real (*q*PCR)

Gene de interesse	Sequência	
	<i>Sense Primer</i> (5´-3´)	<i>Antisense Primer</i> (5´-3´)
Leptina	TCCCTCTGACACATCCCCTA	GGTGGCTGGTTTGTCTGT
Adiponectina	GTCCCCTTCCCCATACTT	GAATCATTATGACGGCAGCA



## 6.0 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados de cada parâmetro foram expressos como média  $\pm$  erro-padrão. Inicialmente, os dados foram avaliados quanto à normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e à homogeneidade das variâncias (Testes de Cochran C, Hartley, Bartlett). Em seguida, foi feita a análise de variância (ANOVA), *one-way* ou *two-way*, com pós-teste de Tukey para comparações entre as médias. A relação entre glicemia pós prandial e a adiposidade subcutânea e visceral dos animais diabéticos foi avaliada por meio da Correlação Linear de Pearson. Foi utilizado o *software GraphPad Prism* versão 5.0 (*GraphPad Software, Inc*) e adotado o valor de  $p \leq 0,05$ .

## 7.0 CAPÍTULO 1/ARTIGO 1

### *Suplementação crônica com leucina aumenta a adiposidade corporal em modelo experimental de diabetes associado à perda intensa de tecido adiposo branco*

Vanessa Batista de Sousa Lima<sup>1</sup>, Carlos Eduardo Carvalho Martins<sup>1</sup>, Francisco Leonardo Torres-leal<sup>2</sup>, Julio Tirapegui<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>*Departament of Food Science and Experimental Nutrition. Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil*

<sup>2</sup>*Departament of Biophysics and Physiology. Center of Sciences of Health. Federal University of Piauí, Piauí, Brazil*

\*Correspondence to: Vanessa Batista de Sousa Lima. Department of Food Science and Experimental Nutrition, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, 580, bloco14, São Paulo 05508-900, Brazil. E-mail: vanessal@usp.br

Artigo a ser enviado à revista *Nutrients*

## RESUMO

A resistência à insulina (RI) e a hiperglicemia crônica no diabetes pode reduzir o tamanho e a funcionalidade do tecido adiposo branco (TAB). Como ativador da proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), a leucina pode regular a adiposidade, o balanço energético e a homeostase glicêmica. Portanto, foi investigado se a suplementação crônica com leucina pode afetar a adiposidade e melhorar a RI em ratos diabéticos com perda intensa de TAB. Após o desmame, os animais foram distribuídos nos grupos: C – não diabético; D – diabético; e DL – diabético que recebiam ração suplementada com 5% de L-leucina por 8 semanas. O tratamento crônico com leucina reverteu a perda de massa adiposa dos coxins subcutâneo e viscerais neste modelo experimental, que pode ser explicado pelo aumento da expressão da p-p70S6K1, PPAR $\gamma$ , ACC1 e FAS, proteínas que estimulam a adipogênese e lipogênese *de novo* nos adipócitos. Além disso, houve um aumento da expressão de AKT total no coxim SC no grupo DL, mas não foi alterada no coxim RP, indicando que a leucina também pode melhorar a resistência à insulina por ativar a AKT. A glicemia pós prandial diminuiu e a sensibilidade à insulina aumentou, avaliada pela constante de desaparecimento da glicose ( $K_{ITT}$ ), em ratos diabéticos tratados com leucina. Em conclusão, a suplementação crônica com leucina aumentou a adiposidade de ratos diabéticos, que foi relacionado com a melhora da intolerância à glicose e da resistência à insulina.

**Palavras-chave:** diabetes; tecido adiposo; adiposidade; resistência à insulina; leucina; intolerância à glicose.

## 1. Introdução

O diabetes mellitus (DM) é caracterizado por uma hiperglicemia crônica resultante da deficiência absoluta ou relativa na secreção de insulina e/ou resistência periférica à ação da insulina [1]. Em ratos adultos, o modelo de diabetes induzido por estreptozotocina (STZ) é classicamente caracterizado como DM tipo 1, no qual altas doses de STZ causam uma deficiência absoluta de insulina. Em ratos neonatos, dependendo da dose de STZ e do dia escolhido para injeção da droga, são observados uma intolerância à glicose, hiperglicemia e hipoinsulinemia moderadas na fase adulta, sendo considerado um modelo animal de diabetes tipo 2 [2].

No modelo experimental de diabetes induzido por estreptozotocina no período neonatal proposto por Takada et al. [3,4], além da intolerância à glicose, da baixa reserva pancreática de insulina e hipoinsulinemia moderada, os animais desenvolveram uma resistência à insulina (RI) que foi relacionada à perda intensa de tecido adiposo branco. Além do reduzido tamanho dos adipócitos, o TAB perde a sua capacidade de sintetizar e armazenar lipídeos (lipogênese), sendo acompanhada por intensa lipólise, aumento da concentração de ácidos graxos não esterificados no sangue, deposição ectópica de triacilglicerol no fígado e músculo esquelético, o que causa resistência periférica à insulina [4]. Mais tarde, estudos mostraram que recuperar o tamanho da massa adiposa e a funcionalidade do TAB melhorou pronunciadamente a intolerância à glicose e a sensibilidade à insulina neste modelo de diabetes [4,5].

O tecido adiposo branco (TAB) possui um papel crucial no metabolismo energético, sensibilidade à insulina, pressão sanguínea, imunidade e no metabolismo lipídico, por meio da secreção de adipocinas – peptídeos produzidos pelos adipócitos que atuam como hormônios com atividade autócrina e endócrina. Assim, tanto o excesso (obesidade) quanto a perda intensa de TAB causam sérias complicações metabólicas como resistência à insulina, hipertrigliceridemia, esteatose hepática e diabetes [6,7]. Baseado nestes aspectos fica fácil perceber que manter um TAB “saudável” e com suas funções como reservatório energético e órgão endócrino preservadas é importante para manter uma adequada homeostase metabólica.

A leucina é o mais potente regulador da sinalização do complexo 1 da proteína alvo de rapamicina em mamíferos (mTORC1) que tem como alvos as proteínas p70S6K1 e 4-EBP1.

Assim, este aminoácido pode regular vários aspectos do metabolismo como a sensibilidade à insulina, o balanço energético, a síntese e secreção de citocinas e adipocinas, a adiposidade e a síntese proteica no TAB, músculo esquelético, fígado e pâncreas [8-11]. No TAB, a leucina direta ou indiretamente estimula a hipertrofia e a hiperplasia deste tecido, por influenciar diretamente a captação e/ou biossíntese de lipídeos (lipogênese) e a diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos maduros (adipogênese), além de regular a secreção de leptina, e a síntese e secreção de adiponectina [12-14]. Assim, a leucina também possui papel importante no metabolismo do TAB e na homeostase metabólica.

Com a ativação do mTORC1, ocorre a translocação e ativação de fatores de transcrição nucleares – o receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomas (PPAR $\gamma$ ), a proteína 1c ligadora do elemento regulado por esteróis (SREBP-1c) e as proteínas ligantes ao amplificador CCAAT (C/EBP $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\delta$ ) – que regulam a expressão de proteínas que controlam a adipogênese e a lipogênese nos adipócitos [15]. O PPAR $\gamma$  é predominantemente expresso no TAB, é o principal coordenador da hiperplasia e hipertrofia das células adiposas e atua também na sensibilidade à insulina, pois aumenta a captação de glicose por este tecido. O PPAR $\gamma$  atua sinergicamente com C/EBP $\alpha$  para manter a adequada funcionalidade do adipócito, incluindo a captação de glicose dependente de insulina, a lipogênese *de novo*, captação e reesterificação de ácidos graxos, lipólise, síntese e secreção de adipocinas [16,17].

Além da adiposidade, a ingestão crônica de leucina regula a homeostase glicêmica, por mecanismos dependentes ou independentes de alterações na composição corporal [8,18-20]. A leucina é insulínica, reduz a gliconeogênese e melhora a esteatose hepáticas, recupera a atividade da AKT nos adipócitos (enzima limitante da cascata de sinalização de insulina) e aumenta a secreção de adiponectina e, dessa forma, aumenta a sensibilidade à insulina em tecidos periféricos como fígado, músculo esquelético e TAB e influencia a homeostase à glicose [8,18-23]. Por outro lado, foi evidenciado em ratos obesos e diabéticos que o efeito agudo da suplementação com leucina causa resistência à insulina no músculo esquelético, pois ocorre aumento da fosforilação do substrato 1 do receptor de insulina (ISR-1) em resíduos de serina, que inibe a transdução do sinal deste hormônio [24,25].

Considerando, portanto, a importância do tecido adiposo branco e de suas adipocinas na regulação da homeostase metabólica, bem como o efeito direto ou indireto da leucina na regulação da lipogênese, adipogênese e sensibilidade à insulina, o objetivo do estudo foi

investigar se a suplementação crônica com leucina pode afetar a adiposidade corporal e melhorar a sensibilidade à insulina em modelo experimental de diabetes com perda intensa de TAB.

## 2. Seção Experimental

### 2.1. Animais

36 ratos da linhagem *Wistar* machos foram obtidos no Biotério de Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e mantidos em gaiolas individuais, temperatura ambiente  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  e umidade relativa do ar  $55 \pm 10\%$ , ciclo de iluminação claro/escuro de 12/12 h (período claro iniciando às 14h00min), com água e ração *ad libitum*. Estes ratos ainda recém-nascidos (5 dias de vida) foram separados de suas respectivas mães por 8h (jejum) e distribuídos em 2 grupos: grupo diabético (n=24) que recebeu uma injeção intraperitoneal (ip) de STZ [120 mg/kg de peso corporal] diluído em tampão citrato [10mM de citrato de Na (pH 4,5)] e um grupo não diabético (n=12) que recebeu somente uma injeção (ip) do tampão citrato com volume equivalente, que foi considerado o grupo controle (grupo C). Ao final da terceira semana de vida (desmame), todos os ratos que pertenciam ao grupo diabético apresentaram uma glicemia igual ou superior a 150 mg/dL, e foram incluídos no estudo. Em seguida, estes animais foram distribuídos aleatoriamente entre o grupo D (n=12) que receberam a ração AIN-93M (dieta controle), e o grupo DL (n=12) que receberam a ração AIN-93M suplementada com 5% de L-leucina durante 8 semanas.

### 2.2. Dieta e desenho experimental

As dietas experimentais foram preparadas de acordo com as recomendações do *American Institute of Nutrition* (AIN-93M) [26]. Para a ração suplementada com 5% de L-leucina, 50g de amido de milho/kg de ração foram substituídos por 50g de L-leucina. Outros estudos já utilizaram esta dose e não foi reportado nenhum efeito toxico hepático e renal em ratos [27-29]. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Protocolo CEUA/FCF/380).

A partir da 4ª semana de vida dos animais, o peso corporal, o consumo alimentar e a glicemia pós prandial foram avaliados semanalmente até completarem 12 semanas de vida. O ganho de peso diário foi obtido pela diferença entre o peso atual e aquele medido na semana anterior dividido por 7. O cálculo do coeficiente de eficácia alimentar foi obtido a partir da divisão entre o consumo diário de ração e o ganho de peso diário dos animais. Quanto menor for o coeficiente de eficácia alimentar, menos comida o animal precisou ingerir para ganhar peso corporal, indicando que este animal foi mais eficiente metabolicamente [30]. A concentração de glicose sanguínea pós-prandial foi obtida no período pós-absortivo, ou seja, 2 horas após início do ciclo claro dos ratos.

Na 11ª semana de vida dos animais, foi realizado um teste de sensibilidade à insulina (ITT), após 8 horas de jejum. Cada animal recebeu uma injeção com insulina (75mU/100g p.c.) na região intraperitoneal. Em seguida, com auxílio de um glicosímetro, foi analisada a glicemia capilar caudal nos momentos: 0 (basal), 3, 6, 10, 15, 30, 45 e 60 minutos após a carga de insulina.

### 2.3. Eutanásia

Ao final da 12ª semana de vida, todos os animais foram eutanasiados após 6 horas de jejum. Imediatamente após a eutanásia dos animais, amostras de sangue foram coletadas em tubos sem anticoagulante e o soro, obtido por centrifugação, foi armazenado em freezer – 80°C em microtubos para análise da concentração sérica de insulina. Além disso, foi realizada uma laparotomia para a exposição do tecido adiposo subcutâneo (região inguinal) e dos tecidos epididimal, retroperitoneal e mesentérico (viscerais), que foram removidos e pesados para determinar a adiposidade dos grupos experimentais. O peso destes tecidos adiposos foi obtido pela razão entre o peso total do tecido e o peso do animal, e expresso em g/100g do animal. Amostras do coxim subcutâneo e do retroperitoneal foram utilizadas para análises da expressão de proteínas que regulam a adipogênese e lipogênese *de novo* e a sensibilidade à insulina, por meio do *Western Blotting*.

#### 2.4. Concentração de insulina no soro

A concentração de glicose no soro foi determinada por método enzimático-colorimétrico, utilizando-se kits da LABTEST, por meio do aparelho LABMAX. A análise de insulina no soro foi realizada com o kit RMHMAG-84K MILLIPLEX<sup>®</sup> MAP com *beads* magnéticas (<sup>®</sup>MILLIPORE).

#### 2.5. Análises Western Blotting

Para as análises de *Western Blotting*, 300mg de cada coxim (subcutâneo e retroperitoneal) foram homogeneizados em 600µL de tampão RIPA contendo inibidores de protease e fosfatases. Em seguida, 10µL do extrato de cada tecido adiposo foi utilizado para quantificar o conteúdo total de proteína, segundo protocolo descrito no kit de quantificação de proteína por BCA (Pierce; <sup>®</sup>Thermo Scientific).

O extrato contendo 60µg de proteínas de cada coxim adiposo foi aquecido, por 5 minutos a 100°C, em tampão contendo 240mM-Tris (pH 6,8), 40% glicerol, 0,8% SDS, 200mM-β-mercaptoetanol e 0,02% de azul de bromofenol. Logo em seguida, os extratos foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e transferidos para membrana de nitrocelulose (GE Healthcare<sup>®</sup>).

As membranas de nitrocelulose foram incubadas em solução de bloqueio 0,5% de albumina sérica (BSA) (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) diluída em PBS com *Tween* (PBST), em seguida, foram lavadas e incubadas *overnight* a 4°C com anticorpos primários específicos (Cell Signaling Technology<sup>®</sup>), na proporção de 1:1000 - mTOR, p-mTOR (Ser2448), p70S6K1, p-p70S6K1 (Thr389), PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$ , ACC1, FAS, AKT, p-AKT (Thr308). Após 3 lavagens com PBST, as membranas foram incubadas durante 1hora com anticorpo secundário *anti-rabbit* IgG com peroxidase diluído 1:5000 em PBST e 2% de BSA. Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpo monoclonal *anti-β-actin* peroxidase (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>), diluído na proporção 1:25.000, que foi utilizado como normalizador. As imagens (bandas) foram visualizadas no aparelho Image-Quant 400 (GE Healthcare). A proteína total foi calculada por meio da densidade de cada banda e normalizada pela densidade da β actina, em *software* específico.



## 2.6. Análise Estatística

Os resultados de cada parâmetro foram expressos como média  $\pm$  erro-padrão. Inicialmente, os dados foram avaliados quanto à normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e à homogeneidade das variâncias (testes de Bartlett). Em seguida, foi feita a análise de variância (ANOVA) *one-way* ou *two-way*, com pós-teste de Tukey para comparações entre as médias. As relações entre glicemia pós prandial e as adiposidades subcutânea e visceral dos animais diabéticos foram avaliadas por meio da Correlação Linear de Pearson. Foi utilizado o *software GraphPad Prism* versão 5.0 (*GraphPad Software, Inc*) e adotado o valor de  $p \leq 0,05$ .

## 3. Resultados

A Figura 5 mostra que, a partir da 6<sup>a</sup> semana, houve uma redução no ritmo de ganho de peso diário nos animais diabéticos não tratados em comparação com o grupo C ( $p < 0,05$ ), o que contribuiu para que o peso corporal destes animais fosse significativamente menor que o do grupo C ( $p < 0,05$ ). Por volta da oitava semana de vida, o consumo diário de ração aumentou substancialmente no grupo D em relação ao grupo C ( $p < 0,05$ ), que se manteve elevado até o final do experimento (Figura 6). Esta hiperfagia diabética não preveniu a queda do peso corporal dos animais diabéticos não tratados, como confirma a Figura 5. Entre os grupos estudados, o grupo D foi menos eficiente em converter a ração consumida em peso corporal, ou seja, estes animais precisaram ingerir muito mais ração para ganhar peso (Figura 7).

Na oitava semana de vida, o ritmo de ganho de peso dos animais tratados com leucina foi similar ao do grupo C e significativamente maior comparado ao grupo D ( $p < 0,01$ ), no entanto, a suplementação crônica com leucina não alterou o peso corporal dos animais diabéticos (Figura 5). A partir da 9<sup>a</sup> semana até o final do experimento, o peso corporal do grupo DL foi menor comparado com o grupo C ( $p < 0,05$ ), sem haver diferença com o grupo D ( $p > 0,05$ ). A figura 6 mostra que os animais do grupo DL apresentaram menor consumo diário de ração comparado com o grupo D ( $p < 0,05$ ), apesar disso, estes animais foram mais eficientes em converter a ração consumida em peso corporal comparado com o grupo D (Figura 7).

Ainda sobre o consumo diário de ração, é possível observar que a hiperfagia diabética foi completamente normalizada nos animais diabéticos tratados com leucina. A análise da AUC da Figura 6 mostra que estes animais tiveram uma menor ingestão diária de ração em relação com o grupo D ( $p < 0,01$ ), sem haver diferença estatística com o grupo controle. Apesar do menor consumo de ração nos ratos do grupo DL, a ingestão diária de leucina se manteve elevada neste grupo comparado com o grupo D [DL =  $1,332 \pm 0,026$  g/dia; D =  $0,3485 \pm 0,007$  g/dia;  $p < 0,01$ ], o que equivale a um consumo de leucina 3,8 vezes maior no grupo DL em relação ao grupo D.

Como esperado, os animais do grupo D mostraram um aumento progressivo da glicemia pós prandial e uma menor resposta à ação da insulina exógena visto no teste de ITT comparado com o grupo C ( $p < 0,05$ ), indicando que estes animais apresentavam prejuízos na tolerância à glicose e na sensibilidade à insulina. Neste estudo, o tratamento crônico com leucina reduziu a hiperglicemia pós-prandial dos animais diabéticos, sem haver diferença estatística com o grupo C (Figuras 8A e 8B). Além disso, a constante de desaparecimento da glicose após uma sobrecarga de insulina ( $K_{ITT}$ ) do grupo DL foi maior que a do grupo D ( $p < 0,01$ ) e, foi similar àquela do grupo C, o que indica que a ingestão crônica de leucina também corrigiu a resistência à insulina em ratos diabéticos (Figura 8A). Estes resultados ocorreram mesmo na ausência de efeito da leucina sobre a hipoinsulinemia encontrada neste modelo experimental [(DL =  $1117,0 \pm 279,9$ ; D =  $1255,0 \pm 158,6$ ;  $p > 0,05$ )] (Tabela 2).

A tabela 2 também mostra que o grupo D apresentou uma reduzida massa adiposa corporal, principalmente de coxins adiposos viscerais. Neste estudo, os pesos dos coxins adiposos subcutâneo (SC) e viscerais (retroperitoneal, epididimal e mesentérico) foram menores no grupo D em relação ao grupo C ( $p < 0,01$ ). Esta perda de tecido adiposo branco contribuiu para o aumento da intolerância à glicose neste modelo experimental. A adiposidade visceral dos animais diabéticos não tratados apresentou uma correlação negativa com a glicemia pós prandial [(visceral ( $r = -0,8322$ ,  $p = 0,0104$ ))], sugerindo que quanto menor foi a massa adiposa no coxim visceral, maior foi o valor da glicemia pós-prandial (Figura 9B).

Com exceção do coxim adiposo epididimal, os pesos relativos dos coxins subcutâneo e viscerais foram maiores no grupo DL comparados com os do grupo D ( $p < 0,05$ ), e similares àqueles dos animais do grupo C, ou seja, a ingestão crônica de leucina reverteu a perda de massa adiposa dos ratos diabéticos (Tabela 2). A adiposidade corporal no grupo DL não teve correlação com a quantidade de ração consumida (coxim subcutâneo:  $r = -0,2861$ ,  $p = 0,3673$ ;

coxins viscerais:  $r = -0,3048$ ,  $p = 0,3354$ ). Além disso, este aumento da massa adiposa diminuiu a intolerância à glicose nos animais diabéticos tratados com leucina. As adiposidades subcutânea e visceral destes animais tiveram uma correlação negativa com glicemia pós-prandial [( $r = -0,5787$ ,  $p = 0,0487$ ), ( $r = -0,7137$ ,  $p = 0,0091$ ), respectivamente], sugerindo que quanto maior foi a massa adiposa nestes coxins, menores foram os valores da glicemia pós-prandial (Figuras 9C e 9D).

Em nível molecular, quando comparados com o grupo C, os animais do grupo D apresentaram um declínio na fosforilação/ativação da p70S6K1 e da proteína quinase B (AKT), e na expressão da proteína ácido graxo sintase (FAS) no coxim adiposo retroperitoneal (Figura 10). No coxim subcutâneo, houve uma redução na fosforilação da p70S6K1 e na expressão das proteínas acetil coA carboxilase (ACC1) e AKT nos animais diabéticos não tratados em relação ao grupo C (Figura 11). Estes dados revelam que animais diabéticos não tratados apresentam prejuízos na via de sinalização do mTORC1/p70S6K1, na lipogênese e na sensibilidade à insulina. Não houve diferença estatística na expressão e/ou fosforilação das proteínas mTOR, C/EBP $\alpha$  e/ou PPAR $\gamma$  nos coxins avaliados entre os grupos D e C (Figuras 10 e 11).

No coxim retroperitoneal dos animais diabéticos, a suplementação crônica com leucina aumentou a fosforilação da p70S6K1 e a expressão das proteínas FAS, ACC1 e PPAR $\gamma$ , mas não reverteu a diminuição da fosforilação da AKT dos animais diabéticos (Figura 10). No coxim subcutâneo, a leucina aumentou a fosforilação da p70S6K1 e a expressão das proteínas PPAR $\gamma$  e AKT, mas não alterou a de ACC1, que estava reduzida nos animais diabéticos (Figura 11). Uma vez que o PPAR $\gamma$  também possui papel na sensibilidade à insulina, estes resultados sugerem que, no coxim adiposo subcutâneo, o efeito da leucina sobre a via de sinalização da insulina se sobrepõe ao seu efeito sobre a lipogênese. Já no coxim visceral, o efeito da leucina está mais relacionado com a expansão do tecido adiposo por meio do aumento da biossíntese de lipídeos (lipogênese *de novo*). Neste estudo, o tratamento crônico com leucina não afetou a expressão da proteína C/EBP $\alpha$  e/ou fosforilação do mTOR nos coxins adiposos estudados neste modelo experimental (Figuras 10 e 11).

#### 4. Discussão

Neste estudo foi investigado se a suplementação crônica com leucina pode afetar a adiposidade corporal e melhorar a sensibilidade à insulina em modelo experimental de diabetes associado a uma perda intensa de TAB. A manifestação da polifagia, hiperglicemia crônica, perda de peso corporal, hipoinsulinemia e resistência à insulina relacionada à perda de tecido adiposo branco caracterizam o diabetes mellitus neste modelo experimental [3-5]. Neste estudo, o tratamento crônico com leucina aumentou a adiposidade do tecido adiposo branco e reverteu a resistência à insulina nos animais diabéticos, contribuindo para a melhora da intolerância à glicose neste modelo experimental.

A reduzida adiposidade corporal neste modelo de diabetes é resultado da baixa concentração de insulina plasmática e da resistência a este hormônio que prejudicam a lipogênese e favorecem a lipólise do TAB [3-5]. Neste estudo, além destes fatores, a lipogênese estava prejudicada porque a ativação da p70s6K1 e a expressão de enzimas que participam da lipogênese *de novo* como a FAS e a ACC1 nos animais do grupo D estavam reduzidas em comparação com as dos animais não diabéticos, o que comprometeu a hipertrofia do TAB.

A perda intensa de TAB neste estudo contribuiu para o agravamento do quadro diabetogênico neste modelo experimental. Neste estudo, Foi verificado que quanto menor a massa do coxim adiposo visceral, maior foi o grau de intolerância à glicose nestes animais, resultado semelhante ao encontrado por Takada et al. [3]. No estudo de Takada et al. [4], o uso de pioglitazona, potente agonista de PPAR $\gamma$ , aumentou a massa adiposa branca, reduziu a hiperglicemia e a resistência à insulina no TAB neste modelo experimental. Estes dados indicam que manter TAB “saudável”, em termos de tamanho e de função, melhora a condição clínica dos animais diabéticos.

A suplementação crônica com leucina aumentou a massa adiposa dos coxins subcutâneo e viscerais neste modelo experimental de diabetes, sem alterar o peso corporal e melhorar a hipoinsulinemia dos animais diabéticos. Outros estudos também relataram que a ingestão crônica de leucina aumentou a adiposidade em animais obesos e/ou insulinoresistentes [10,14,18,19,31]. Por outro lado, em outros estudos experimentais, a leucina diminuiu a adiposidade corporal e, assim, melhorou a sensibilidade à insulina em ratos obesos [8,19-21]. Embora os efeitos da leucina sobre a massa adiposa sejam ainda

controversos, é possível que a leucina estimule a hipertrofia do TAB em animais já obesos ou resistentes à insulina, portanto, a condição metabólica anterior à suplementação determina o seu potencial lipogênico.

A leucina, independentemente da quantidade de ração ingerida, reverteu a perda de massa do tecido adiposo branco em animais diabéticos. A adiposidade corporal do grupo DL não teve correlação com o consumo diário de ração. Ainda que os animais diabéticos tratados com leucina tenham consumido menos ração que os animais diabéticos não tratados, a massa adiposa dos coxins subcutâneo e viscerais nos animais do grupo DL foi maior que a do grupo D, sem haver diferença com o grupo controle.

Neste estudo, a expansão do coxim adiposo subcutâneo (SC) e do retroperitoneal (RP) nos animais diabéticos tratados com leucina foi atribuída ao aumento da fosforilação e/ou da expressão das proteínas p70S6K1, PPAR $\gamma$ , FAS e/ou ACC1, que regulam a lipogênese *de novo* e a reesterificação de ácidos graxos no interior dos adipócitos. Zeanandin et al. [14] também mostraram que a suplementação crônica com leucina aumentou em 45% a massa do coxim adiposo perirenal em ratos idosos e, estes efeitos foram atribuídos ao aumento da fosforilação do mTORC1 e da expressão do gene que codifica o PPAR $\gamma$  no tecido adiposo branco. Esta evidência indica que a ativação do mTORC1 influencia diretamente processos lipogênicos em adipócitos, sendo considerada uma importante via de sinalização intracelular [13].

A ativação do mTORC1 também influencia a fase terminal da diferenciação dos pré-adipócitos em adipócitos maduros (adipogênese), processo cuidadosamente coordenado pelo PPAR $\gamma$  e pelo C/EBP $\alpha$ . A atividade destes fatores de transcrição nucleares é estimulada pela ação direta ou indireta do mTORC1 na ativação do PPAR $\gamma$  [15,32]. A suplementação crônica com leucina não alterou a expressão da proteína C/EBP $\alpha$  no coxim retroperitoneal neste modelo experimental, mas aumentou a expressão da proteína PPAR $\gamma$  nos coxins subcutâneo e retroperitoneal. Isto possivelmente ocorreu por uma ação indireta do mTORC1, intermediada pela ativação da proteína p70S6K1 que estava elevada em ambos os coxins dos animais do grupo DL.

Uma vez ativado no núcleo dos adipócitos, o PPAR $\gamma$  induz a expressão de genes que codificam enzimas lipogênicas, entre elas a FAS e a ACC1, que convertem moléculas de acetil-coA em malonil-coA, e malonil em ácido graxo, respectivamente [15,32]. Neste estudo, a

elevada expressão da proteína PPAR $\gamma$  no TAB de animais diabéticos tratados com leucina promoveu um aumento na expressão das proteínas FAS e ACC1, enzimas que estimulam a biossíntese de lipídeos (lipogênese *de novo*) no interior dos adipócitos. Estes fatores podem explicar o aumento da adiposidade dos coxins SC e RP nos animais do grupo DL. Em paralelo, estudos *in vitro* mostraram que a inibição do mTORC1, causada pela rapamicina, reduziu a expressão do gene do C/EBP $\alpha$  e do PPAR $\gamma$ , inibiu a atividade deste último e prejudicou a expressão de vários genes lipogênicos em pré-adipócitos [16,33].

Além de ser essencial para a hiperplasia e hipertrofia do TAB, o PPAR $\gamma$  atua sinergicamente com C/EBP $\alpha$  para manter a adequada funcionalidade do adipócito, incluindo a captação de glicose dependente de insulina e a síntese e secreção de adipocinas [34,35]. Portanto, o aumento da expressão da proteína PPAR $\gamma$  induzida pela fosforilação da p70S6K1 em ratos diabéticos tratados com leucina pode ter contribuído não só com a expansão “saudável” do tecido adiposo branco nestes animais, mas também com a recuperação da funcionalidade deste tecido como órgão sensível à ação da insulina e, assim, regular a homeostase glicêmica. Neste estudo, a adiposidade subcutânea e visceral no grupo DL teve uma correlação negativa com a glicemia pós prandial, ou seja, o maior conteúdo de massa adiposa nestes coxins esteve relacionado com uma menor intolerância à glicose nestes animais.

O tratamento crônico com leucina reduziu a hiperglicemia pós-prandial e a resistência à insulina dos ratos diabéticos, sem alterar a hipoinsulinemia observada nestes animais. Além da expansão do TAB aumentar a capacidade deste tecido em captar mais glicose, a expressão da proteína que é limitante da cascata de sinalização da insulina, a AKT, aumentou no coxim adiposo SC dos animais diabéticos tratados com leucina. Estes fatores podem explicar a recuperação da sensibilidade à insulina neste tecido, o que contribuiu para o aumento da captação de glicose dependente de insulina e melhora da homeostase glicêmica neste modelo experimental. Hinault et al. [36] também evidenciaram que a leucina recuperou a via de sinalização da insulina em adipócitos isolados de ratos db/db, pois estimulou a fosforilação da AKT, mesmo quando a fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) estava inibida. Outros estudos também mostraram que a suplementação crônica com leucina aumenta a expressão da proteína e/ou fosforilação da AKT no tecido adiposo branco de animais obesos [8,18].

Além disso, é possível que o efeito da leucina como secretagogo de insulina no período pós prandial também tenha contribuído para a redução da hiperglicemia pós prandial neste modelo experimental [19,37,38]. Por outro lado, a leucina não recuperou a fosforilação

da AKT enzima no coxim RP, possivelmente porque o papel do TAB subcutâneo está mais relacionado com a sensibilidade à insulina do que o coxim visceral [39]. A ingestão crônica de leucina reverteu o quadro de resistência à ação deste hormônio no TAB induzida pela AKT em animais diabéticos, mas não melhorou a reduzida concentração sérica de insulina.

Neste modelo de diabetes, a estreptozotocina no período neonatal causa uma destruição parcial das células do pâncreas endócrino e, na fase adulta, estas células entram em exaustão e ocorre uma queda na reserva pancreática de insulina e na sua concentração plasmática [4,5]. Neste estudo, a melhora da resistência à insulina no TAB de animais diabéticos tratados com leucina não impediu que as células  $\beta$  do pâncreas entrassem em exaustão, o que possivelmente prejudicou a ação insulínica da leucina. Por outro lado, alguns estudos já demonstraram que a leucina estimula a síntese proteica em células pancreáticas e apresenta propriedades insulínica, o que eleva a secreção de insulina [19,37,38,40].

## **5. Conclusões**

A suplementação crônica com leucina reverteu a perda da massa adiposa nos coxins adiposos subcutâneo e viscerais e, em paralelo, aumentou a sensibilidade à insulina e melhorou a intolerância à glicose em animais diabéticos. A intensa redução de tecido adiposo branco neste modelo experimental possui um papel crítico na resistência à insulina desenvolvida por estes animais na fase adulta, sendo que a recuperação da massa adiposa branca corrigiu consideravelmente os distúrbios metabólicos relacionados ao metabolismo da glicose nesta doença e melhorou a condição clínica dos animais.

## **Agradecimentos**

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento à pesquisa.

## **Contribuição dos autores**

Elaboraram o desenho experimental: VBSL e FLTL. Executaram o experimento: VBSL e CECM. Analisaram os dados: VBSL. Escreveram o manuscrito: VBSL, CECM, FLT-L e JT.

## Conflito de interesse

Os autores declaram não haver conflito de interesse.

## Referências

1. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care* **2016**, *39*, S13-S22.
2. Arulmozhi,SK.; Veerranjaneyulu, A.; Bodnahkar, SL. Neonatal streptozotocin-induced rat modelo f type 2 diabetes mellitus: a glance. *Indian. J. Pharmacol.* **2004**, *36*, 217-221.
3. Takada, J.; Machado, MA.; Peres, SB.; Brito, LC.; Borges-Silva, CN.; Costa, CE.; Fonseca-Alaniz, MH.; Andreotti, S.; Lima FB. Neonatal streptozotocin-induced diabetes mellitus: a model of insulin resistance associated with loss of adipose mass. *Metabolism* **2007**, *56*, 977-984.
4. Takada, J.; Fonseca-Alaniz, MH.; De Campos, TB.; Andreotti, S.; Campaña, AB.; Okamoto, M.; Borges-Silva, CD.; Machado, UF.; Lima, FB. Metabolic recovery of adipose tissue is associated with improvement in insulin resistance in a model of experimental diabetes. *J. Endocrinol.* **2008**, *198*, 51-60.
5. de Oliveira, AC.; Andreotti, S.; Farias, TODA.; Torres-Leal, FL.; de Proença, AR.; Campaña, AB.; de Souza, AH.; Sertié, RA.; Carpinelli, AR.; Cipolla-Neto, J.; Lima, FB. Metabolic disorders and adipose tissue insulin responsiveness in neonatally STZ-induced diabetic rats are improved by long-term melatonin treatment. *Endocrinology* **2012**, *153*, 2178-2188.
6. Herrero, L.; Shapiro, H.; Nayer, A.; Lee, J.; Shoelson, SE. Inflammation and adipose tissue macrophages in lipodystrophic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 240-245.
7. Stern, JH.; Rutkowski, JM.; Scherer, PE. Adiponectin, leptin, and fatty acids in the maintenance of metabolic homeostasis through adipose tissue crosstalk. *Cell. Metab.* **2016**, *23*, 770-784.
8. Macotela, Y.; Emanuelli, B.; Bång, AM.; Espinoza, DO.; Boucher, J.; Beebe, K.; Gall, W.; Kahn, CR. Dietary leucine-an environmental modifier of insulin resistance acting on multiple levels of metabolism. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e21187.



9. Lynch, CJ.; Gern, B.; Lloyd, C.; Hutson, SM.; Eicher, R.; Vary, TC. Leucine in food mediates some of the postprandial rise in plasma leptin concentrations. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2006**, *291*, E621–E630.
10. Zampieri, TT.; Torres-Leal, FL.; Campaña, AB.; Lima FB.; Donato JJr. L-leucine supplementation worsens the adiposity of already obese rats by promoting a hypothalamic pattern of gene expression that favors fat accumulation. *Nutrients* **2014**, *6*, 1364-1373.
11. Pedroso, JA.; Zampieri, TT.; Donato JJr. Reviewing the effects of L-leucine supplementation in the regulation of food intake, energy balance and glucose homeostasis. *Nutrients* **2015**, *7*, 3914-3937.
12. Carnevalli, LS.; Masuda, K.; Frigerio, F.; Le-Bacquer, O.; Um, S.H.; Gandin, V.; Topisirovic, I.; Sonenberg, N.; Thomas, G.; Kozma, S.C. S6K1 plays a critical role in early adipocyte differentiation. *Dev. Cell.* **2010**, *18*, 763-774.
13. Chakrabarti, P.; English, T.; Shi, J.; Smas, CM.; Kandror, KV. Mammalian target of rapamycin complex 1 suppresses lipolysis, stimulates lipogenesis, and promotes fat storage. *Diabetes* **2010**, *59*, 775–781.
14. Zeanandin, G.; Balage, M.; Schneider, SM.; Dupont, J.; Hebuterne, X.; Mothe-Satney, I.; Dardevet D. Differential effect of long-term leucine supplementation on skeletal muscle and adipose tissue in old rats: an insulin signaling pathway approach. *Age* **2012**, *34*, 371-387.
15. Ricoult, SJH.; Manning, B. The multifaceted role of mTORC1 in the control of lipid metabolism. *EMBO Rep.* **2013**, *14*, 242-251.
16. Kim, JE.; Chen, J. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity by mammalian target of rapamycin and amino acids in adipogenesis. *Diabetes* **2004**, *53*, 2748-2756.
17. Festuccia, WT.; Blanchard, PG.; Turcotte, V.; Laplante, M.; Sariahmetoglu, M.; Brindley, D.N.; Deshaies, Y. Depot-specific effects of the PPARgamma agonist rosiglitazone on adipose tissue glucose uptake and metabolism. *J. Lipid. Res.* **2009**, *50*, 1185-1194.
18. Li, X.; Wang, X.; Liu, R.; Ma, Y.; Guo, H.; Hao, L.; Yao, P.; Liu, L.; Sun, X.; He, K.; Cao, W.; Yang, X. Chronic leucine supplementation increases body weight and insulin sensitivity in rats on high-fat diet likely by promoting insulin signaling in insulin-target tissues. *Mol. Nutr. Food Res.* **2013**, *57*, 1067–1079.

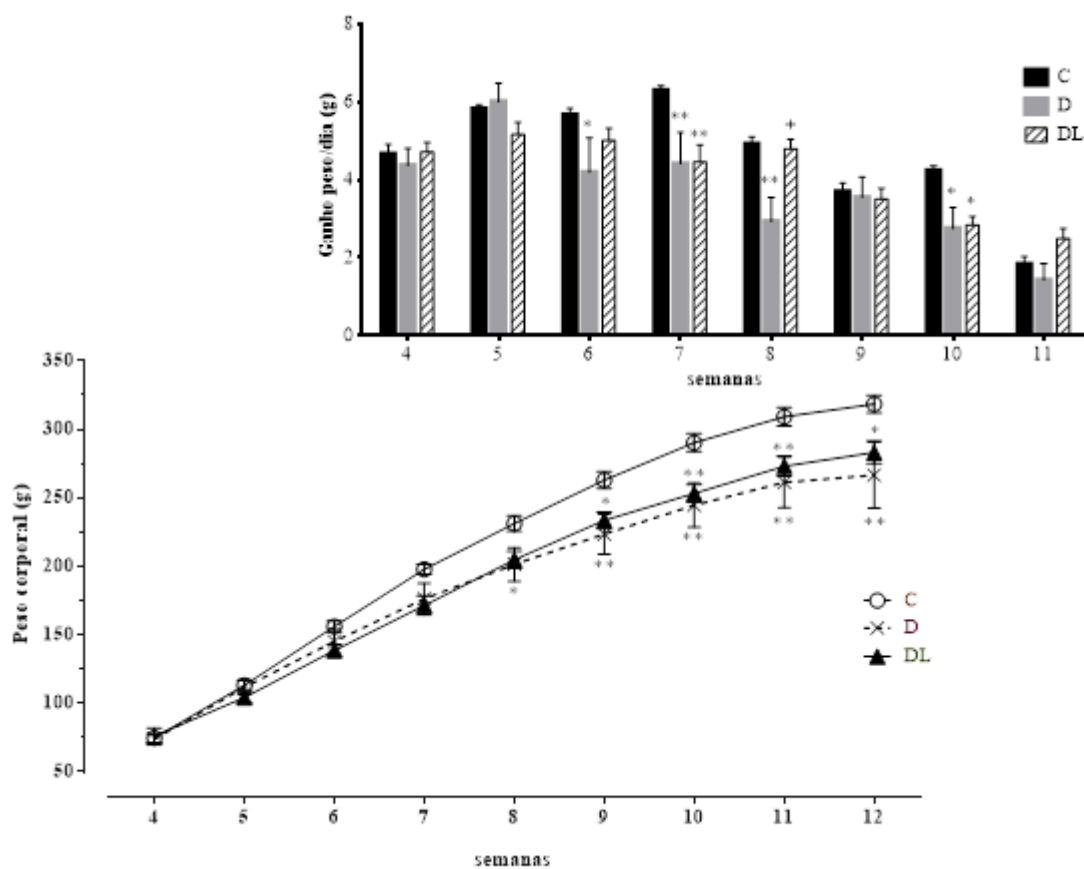
19. Binder, E.; Bermudez-Silva, FJ.; Andre, C.; Elie, M.; Romero-Zerbo, SY.; Leste-Lasserre, T.; Belluomo, I.; Duchampt, A.; Clark, S.; Aubert, A.; Mezzullo, M.; Fanelli, F.; Pagotto, U.; Layé, S.; Mithieux, G.; Cota, D. Leucine supplementation protects from insulin resistance by regulating adiposity levels. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e74705.
20. Eller, LK.; Saha, DC.; Shearer, J.; Reimer, RA. Dietary leucine improves whole-body insulin sensitivity independent of body fat in diet-induced obese sprague-dawley rats. *J. Nutr. Biochem.* **2013**, *24*, 1285–1294.
21. Zhang, Y.; Guo, K.; Leblanc, RE.; Loh, D.; Schwartz, GJ.; Yu, YH. Increasing dietary leucine intake reduces diet-induced obesity and improves glucose and cholesterol metabolism in mice via multimechanisms. *Diabetes* **2007**, *56*, 1647–1654.
23. Li, H.; Xu, M.; Lee, J.; He, C.; Xie, Z. Leucine supplementation increases sirt1 expression and prevents mitochondrial dysfunction and metabolic disorders in high-fat diet-induced obese mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab* **2012**, *303*, E1234–E1244.
24. Balage, M.; Dupont, J.; Mothe-Satney, I.; Tesseraud, S.; Mosoni, L.; Dardevet, D. Leucine supplementation in rats induced a delay in muscle ir/pi3k signaling pathway associated with overall impaired glucose tolerance. *J. Nutr. Biochem.* **2011**, *22*, 219–226.
25. Zhang, J.; Gao, Z.; Yin, J.; Quon, M.J.; Ye, J. S6k directly phosphorylates irs-1 on ser-270 to promote insulin resistance in response to tnf-(alpha) signaling through ikk2. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 35375–35382.
26. Reeves, PG.; Rossow, KL.; Lindlauf, J. Development and testing of the AIN-93 purified diets for rodents: results on growth, kidney calcification and bone mineralization in rats and mice. *J. Nutr.* **1993**, *123*, 1923-1931.
27. Matsuzaki, K.; Kato, H.; Sakai, R.; Toue, S.; Amao, M.; Kimura, T. Transcriptomics and metabolomics of dietary leucine excess. *J. Nutr.* **2005**, *135*, 1571S-1575S.
28. Pedroso, JA.; Nishimura, LS.; de Matos-Neto, EM.; Donato, JJr.; Tirapegui J. Leucine improves protein nutrition status and regulates hepatic lipid metabolism in calorie-restricted rat. *Cell. Biochem. Funct.* **2013**, *32*, 326-332.
29. Tsubuku, S.; Hatayama, K.; Katsumata, T.; Nishimura, N.; Mawatari, K.; Smriga, M.; Kimura, T. Thirteen-week oral toxicity study of branched-chain amino acids in rats. *Int. J. Toxicol.* **2004**, *23*, 119-126.

30. Yasumoto, Y.; Hashimoto, C.; Nakao, R.; Yamazaki, H.; Hiroyama, H.; Nemoto, T.; Yamamoto, S.; Sakurai, M.; Oike, H.; Wada, N.; Yoshida-Noro, C.; Oishi, K. Short-term feeding at the wrong time is sufficient to desynchronize peripheral clocks and induce obesity with hyperphagia, physical inactivity and metabolic disorders in mice. *Metabolism* **2016**, *65*, 714,727.
31. Torres-Leal, FL.; Fonseca-Alaniz, MH.; Teodoro, GFR.; Capitani, MD.; Vianna, D.; Pantaleão, LC.; Matos-Neto, EM.; Rogero, MM.; Donato, JJr.; Tirapegui, J. Leucine supplementation improves adiponectin and total cholesterol concentrations despite the lack of changes in adiposity or glucose homeostasis in rats previously exposed to a high-fat diet. *Nutr. Metab.(lond)* **2011**, *8*, 62-72.
32. Zhang, HH.; Huang, J.; Düvel, K.; Boback, B.; Wu, S.; Squillace, RM.; Wu, CL.; Manning, BD. Insulin stimulates adipogenesis through the Akt-TSC2-mTORC1 pathway. *PLoS One* **2009**, *4*, e6189.
33. Cho, HJ.; Park, J.; Lee, HW.; Lee, YS.; Kim, JB. Regulation of adipocyte differentiation and insulin action with rapamycin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *321*, 942-948.
34. Festuccia, WT.; Blanchard, PG.; Turcotte, V.; Laplante, M.; Sariahmetoglu, M.; Brindley, DN.; Deshaies, Y. Depot-specific effects of the PPARgamma agonist rosiglitazone on adipose tissue glucose uptake and metabolism. *J. Lipid. Res.* **2009**, *50*, 1185-1194.
35. Choi, JH.; Banks, AS.; Estall, JL.; Kajimura, S.; Boström, P.; Laznik, D.; Ruas, JL.; Chalmers, MJ.; Kamenecka, TM.; Blüher, M.; Griffin, PR.; Spiegelman, BM. Anti-diabetic drugs inhibit obesity-linked phosphorylation of PPARgamma by Cdk5. *Nature* **2010**, *466*, 451-456.
36. Hinault, C.; Mothe-Satney, I.; Gautier, N.; Lawrence Jr, JC.; Van Obberghen, E. Amino acids and leucine allow insulin activation of the PKB/mTOR pathway in normal adipocytes treated with wortmannin and in adipocytes from *db/db* mice. *FASEB J.* **2004**, *18*, 1894-1896.
37. Van Loon, LJ.; Kruijshoop, M.; Verhagen, H.; Saris, WH.; Wagenmakers, AJ. Ingestion of protein hydrolysate and amino acid-carbohydrate mixtures increases postexercise plasma insulin responses in men. *J. Nutr.* **2000**, *130*, 2508–2513.
38. Filiputti, E.; Rafacho, A.; Araujo, EP.; Silveira, LR.; Trevisan, A.; Batista, TM.; Curi, R.; Velloso, LA.; Quesada, I.; Boschero, AC.; Carneiro, EM. Augmentation of insulin secretion by leucine supplementation in malnourished rats: Possible involvement of the

phosphatidylinositol 3-phosphate kinase/mammalian target protein of rapamycin pathway. *Metabolism* **2010**, *59*, 635–644.

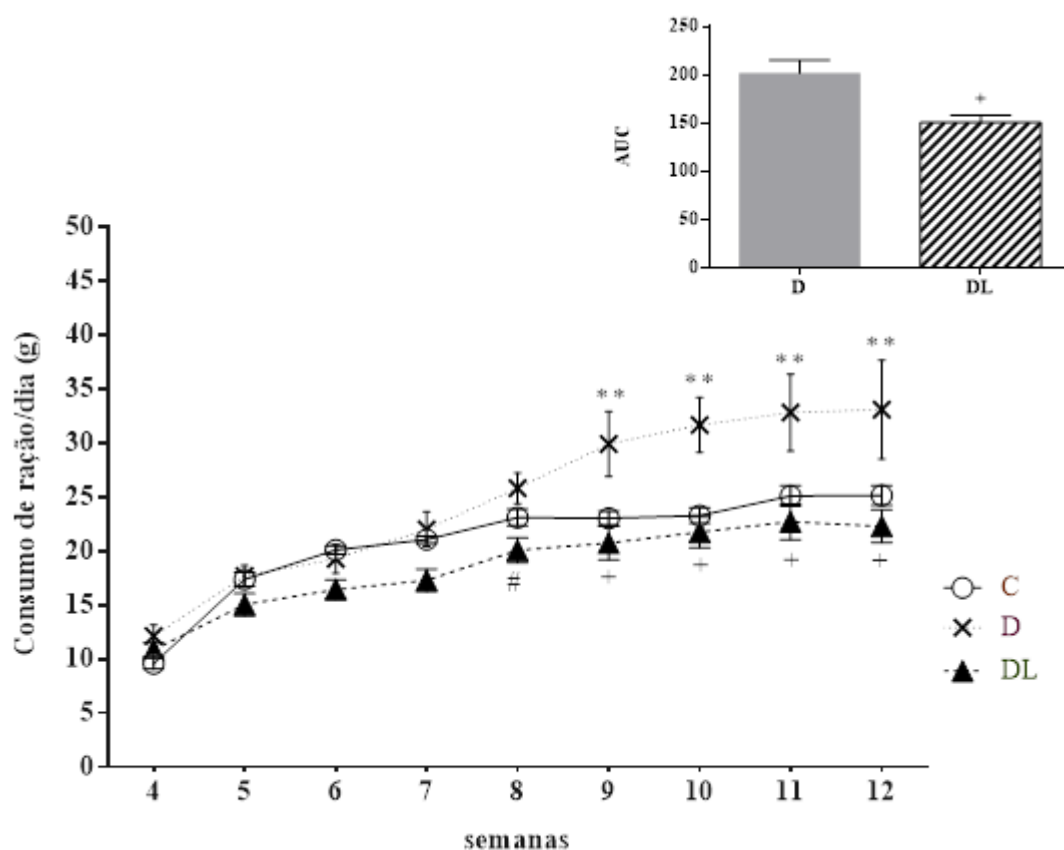
39. Tran, TT.; Yamamoto, Y.; Gesta, S.; Kahn, CR. Beneficial effects of subcutaneous fat transplantation on metabolism. *Cell. Metab.* **2008**, *7*, 410–420.

40. Sans, MD.; Tashiro, M.; Vogel, NL.; Kimball, SR.; D'alecy, LG.; Williams, JA. Leucine activates pancreatic translational machinery in rats and mice through mtor independently of cck and insulin. *J. Nutr.* **2006**, *136*, 1792–1799.



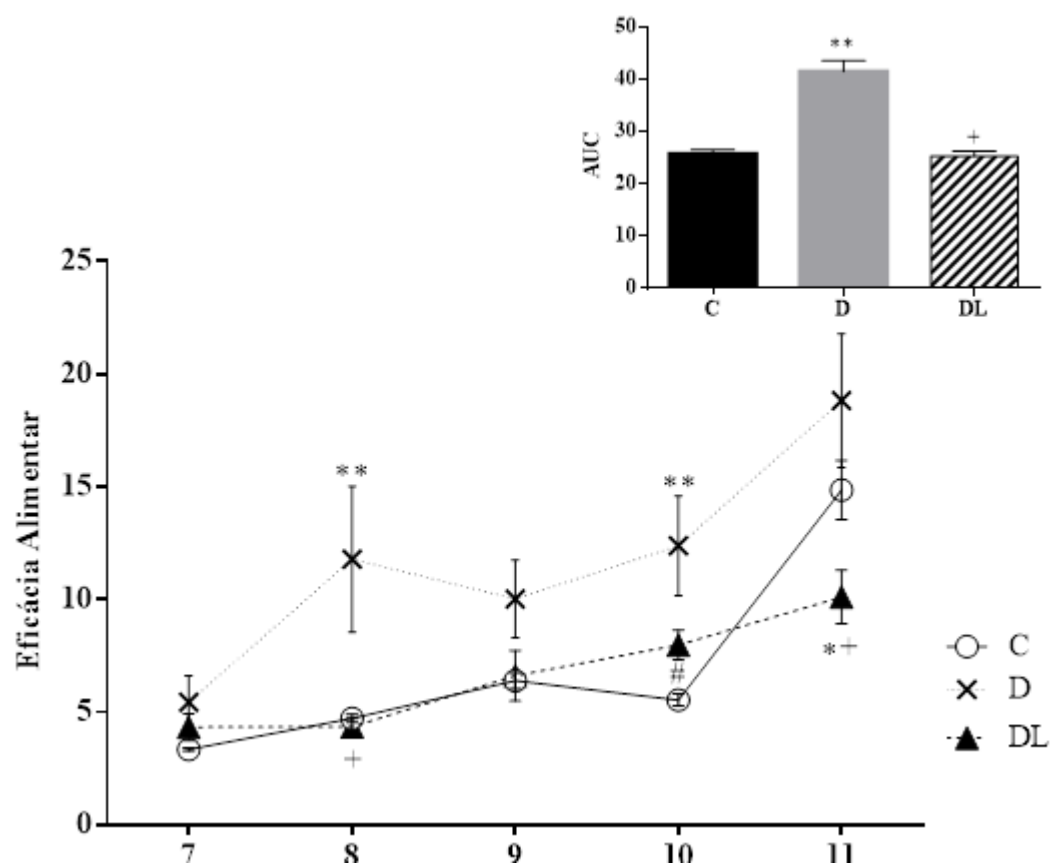
**Figura 5.** Efeitos da suplementação crônica com leucina sobre o peso corporal e ganho de peso diário dos grupos experimentais. Legenda: C- controle; D – diabético não tratado; DL – diabético tratado com leucina; AUC – área sob a curva. Dados estão expressos em média  $\pm$  erro padrão ( $n \geq 10$ ). Para análise da área sob a curva (AUC) foi utilizada ANOVA *one-way* com pós-teste de Tukey; para a curva de acompanhamento semanal foi utilizada ANOVA *two-way* (tratamento x tempo) com pós-teste de Tukey.

\* vs. grupo C ( $p < 0,05$ ), \*\* vs. grupo C ( $p < 0,01$ ), # vs. grupo D ( $p < 0,05$ ), + vs. Grupo D ( $p < 0,01$ )



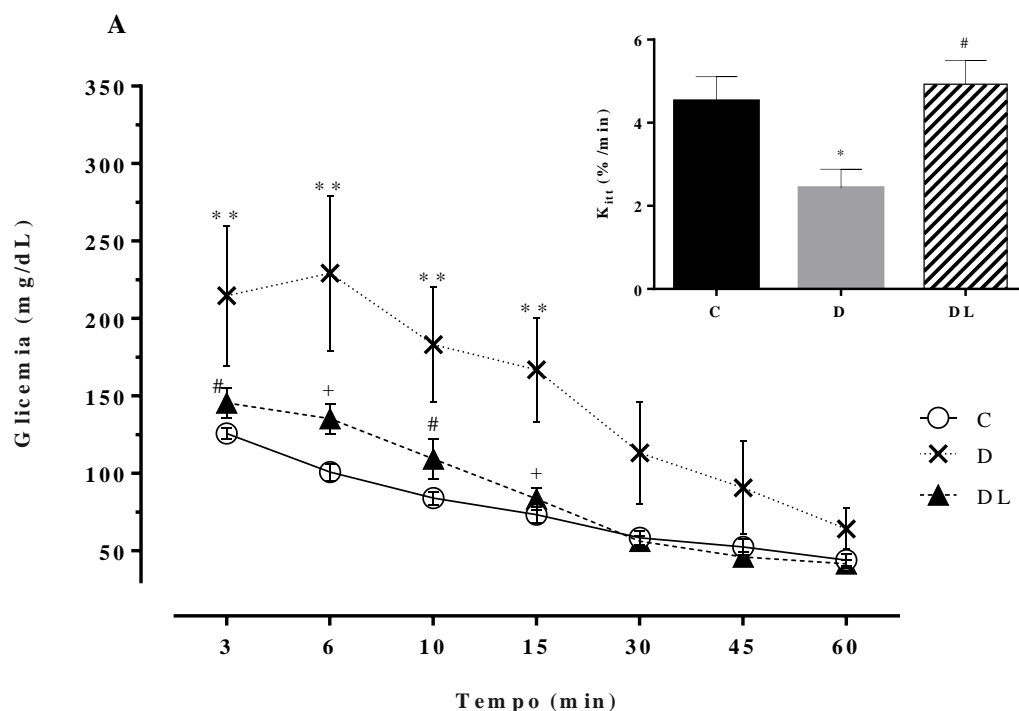
**Figura 6.** Efeitos da suplementação crônica com leucina sobre consumo diário de ração estimado dos grupos experimentais. Legenda: C- controle; D – diabético não tratado; DL – diabético tratado com leucina; AUC – área sob a curva. Dados estão expressos em média  $\pm$  erro padrão ( $n \geq 10$ ). Para análise da área sob a curva (AUC) foi utilizado o teste *t* pareado; para a curva de acompanhamento semanal foi utilizada ANOVA *two-way* (tratamento x tempo) com pós-teste de Tukey.

\* vs. grupo C ( $p < 0,05$ ), \*\* vs. grupo C ( $p < 0,01$ ), # vs. grupo D ( $p < 0,05$ ), + vs. Grupo D ( $p < 0,01$ )



**Figura 7.** Efeitos da suplementação crônica com leucina sobre a eficácia alimentar dos grupos experimentais. Legenda: C- controle; D – diabético não tratado; DL – diabético tratado com leucina; AUC – área sob a curva. Dados estão expressos em média  $\pm$  erro padrão ( $n \geq 10$ ). Para análise da área sob a curva (AUC) foi utilizada ANOVA *one-way* com pós-teste de Tukey; para a curva de acompanhamento semanal foi utilizada ANOVA *two-way* (tratamento x tempo) com pós-teste de Tukey.

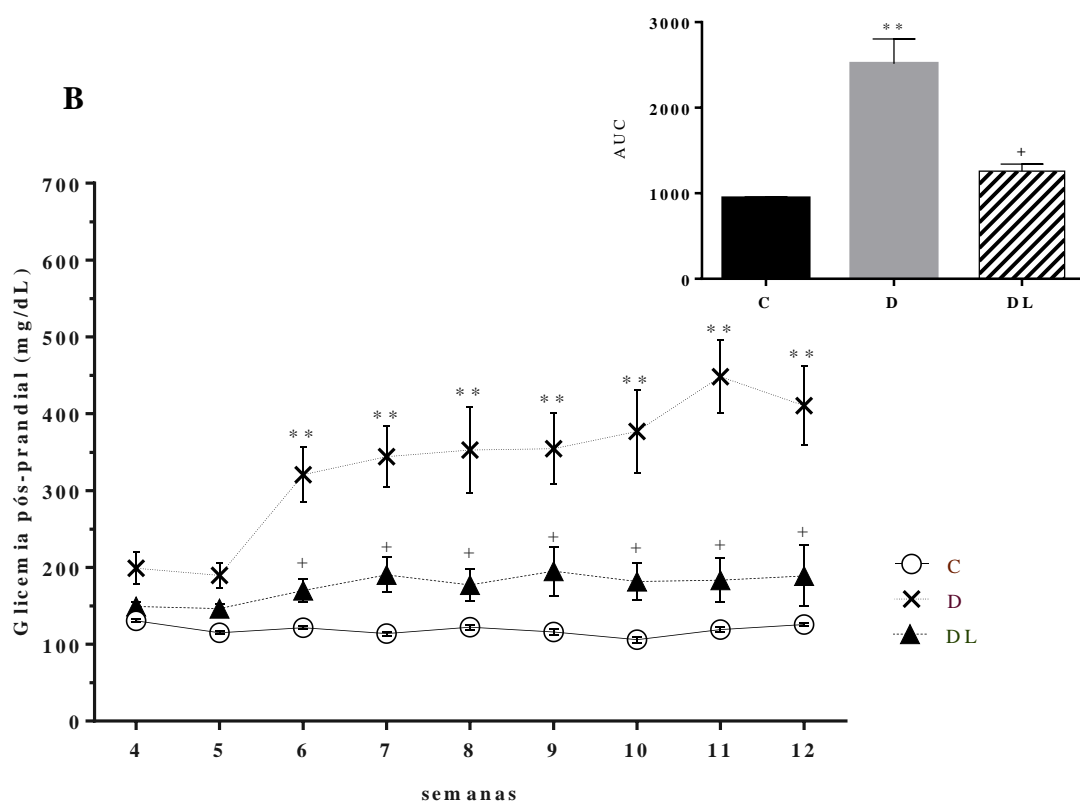
\* vs. grupo C ( $p < 0,05$ ), \*\* vs. grupo C ( $p < 0,01$ ), # vs. grupo D ( $p < 0,05$ ), + vs. Grupo D ( $p < 0,01$ )



**Figura 8.** Efeitos da suplementação crônica com leucina sobre a homeostase glicêmica de ratos diabéticos. A) Curva glicêmica durante teste de sensibilidade à insulina ( $K_{itt}$ ); acompanhamento semanal da glicemia pós prandial. Legenda: C- controle; D – diabético não tratado; DL – diabético tratado com leucina; AUC – área sob a curva;  $K_{itt}$  – constante de desaparecimento da glicose após injeção de insulina. Dados estão expressos em média  $\pm$  erro padrão ( $n \geq 10$ ). ANOVA *one-way* seguido de teste de Tukey (AUC e  $K_{ITT}$ ); ou ANOVA *two-way* (tratamento x tempo) com pós-teste de Tukey.

\* vs. grupo C ( $p < 0,05$ ), \*\* vs. grupo C ( $p < 0,01$ ), # vs. grupo D ( $p < 0,05$ ), + vs. Grupo D ( $p < 0,01$ ).





**Figura 8 (cont.).** Efeitos da suplementação crônica com leucina sobre a homeostase glicêmica de ratos diabéticos. A) Curva glicêmica durante teste de sensibilidade à insulina ( $K_{itt}$ ); B) acompanhamento semanal da glicemia pós prandial. Legenda: C- controle; D – diabético não tratado; DL – diabético tratado com leucina; AUC – área sob a curva;  $K_{itt}$  – constante de desaparecimento da glicose após injeção de insulina. Dados estão expressos em média  $\pm$  erro padrão ( $n \geq 10$ ). ANOVA *one-way* seguido de teste de Tukey (AUC e  $K_{ITT}$ ); ou ANOVA *two-way* (tratamento x tempo) com pós-teste de Tukey.

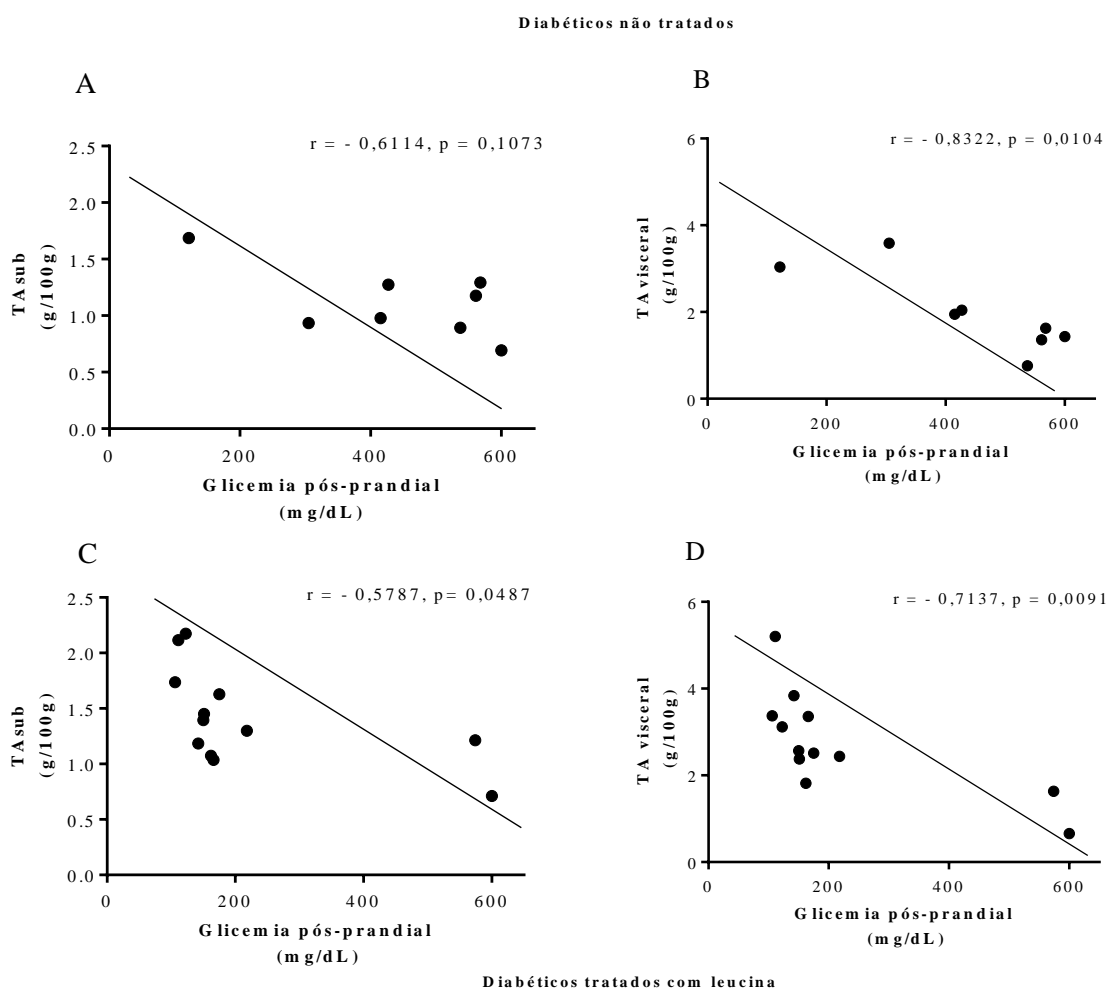
\* vs. grupo C ( $p < 0,05$ ), \*\* vs. grupo C ( $p < 0,01$ ), # vs. grupo D ( $p < 0,05$ ), + vs. Grupo D ( $p < 0,01$ ).

**Tabela 2.** Insulina sérica e peso relativo dos coxins adiposo subcutâneo e viscerais dos grupos experimentais.

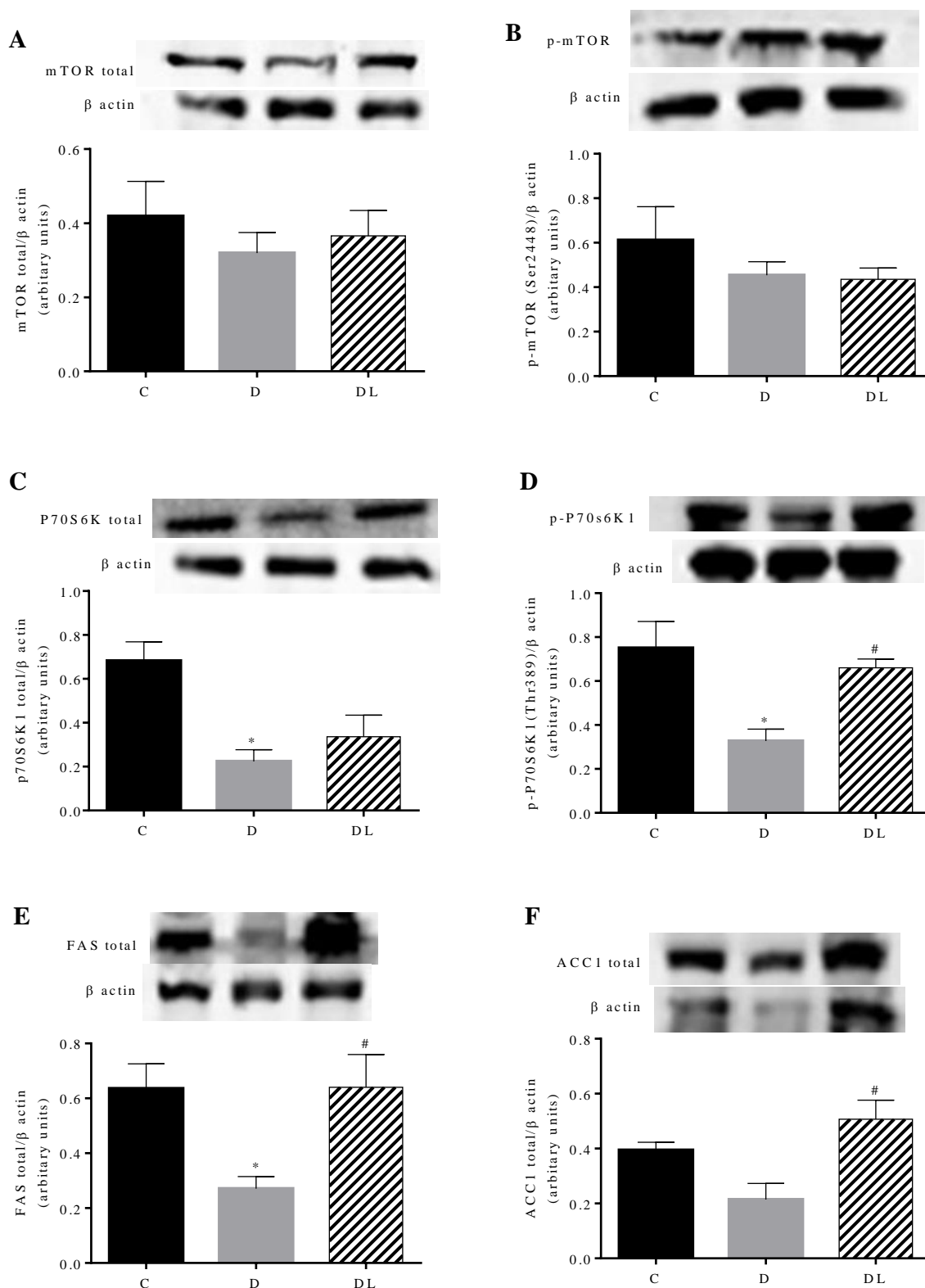
	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>DL</b>
<b>Insulina (pg/mL)</b>	2301,00 ± 411,90	1255,00 ± 158,60 <sup>*</sup>	1117,00 ± 279,90 <sup>*</sup>
<b>TA subcutâneo (g/100g)</b>	1,80 ± 0,08	1,08 ± 0,10 <sup>**</sup>	1,48 ± 0,12 <sup>#</sup>
<b>TA retroperitoneal (g/100g)</b>	1,53 ± 0,08	0,75 ± 0,08 <sup>**</sup>	1,20 ± 0,14 <sup>#</sup>
<b>TA epididimal (g/100g)</b>	1,39 ± 0,08	0,73 ± 0,10 <sup>**</sup>	0,91 ± 0,11 <sup>**</sup>
<b>TA mesentérico (g/100g)</b>	0,76 ± 0,06	0,42 ± 0,07 <sup>**</sup>	0,73 ± 0,07 <sup>+</sup>
<b>Adiposidade visceral (g/100g) (Σ coxins viscerais)</b>	3,64 ± 0,19	1,87 ± 0,31 <sup>**</sup>	2,93 ± 0,30 <sup>#</sup>

Legenda: C- controle; D – diabético não tratado; DL – diabético tratado com leucina. Dados expressos em média ± erro padrão (n ≥ 10). ANOVA *One-way* com pós-teste de Tukey.

<sup>\*</sup> vs. grupo C (p < 0,05), <sup>\*\*</sup> vs. grupo C (p < 0,01), <sup>#</sup> vs. grupo D (p < 0,05), <sup>+</sup> vs. Grupo D (p < 0,01)

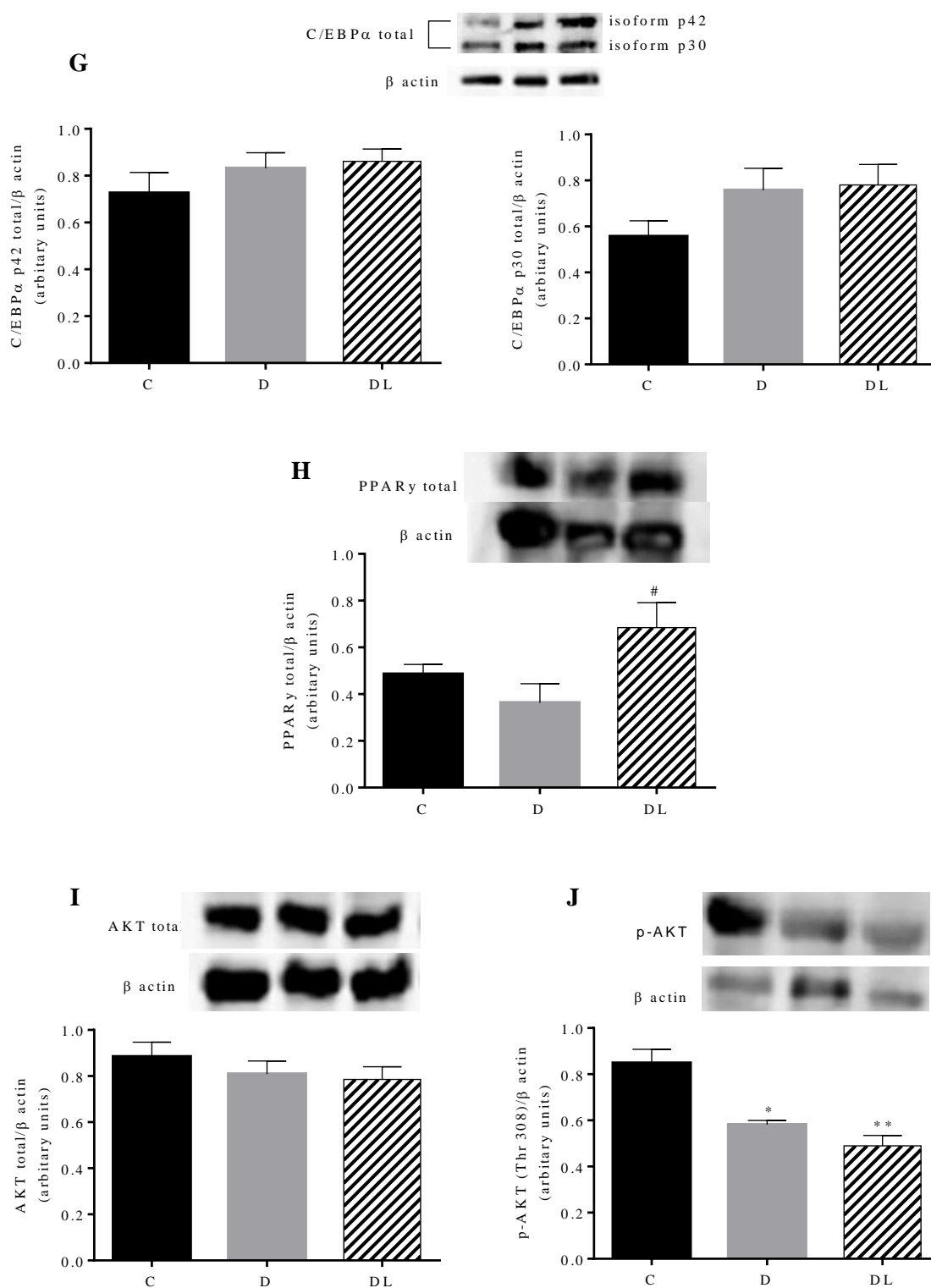


**Figura 9.** Correlação entre o peso dos coxins adiposos e a glicemia pós-prandial em animais diabéticos tratados ou não com leucina. Em animais diabéticos não tratados: **A)** Relação entre peso relativo do coxim subcutâneo e a glicemia pós prandial; **B)** Relação entre peso relativo dos coxins viscerais e a glicemia pós prandial. Em ratos tratados com leucina: **C)** Relação entre peso relativo do coxim subcutâneo e a glicemia pós prandial; **D)** Relação entre peso relativo dos coxins viscerais e a glicemia pós prandial. Legenda: TAsub – tecido adiposo subcutâneo; TAvisceral – tecido adiposo visceral.



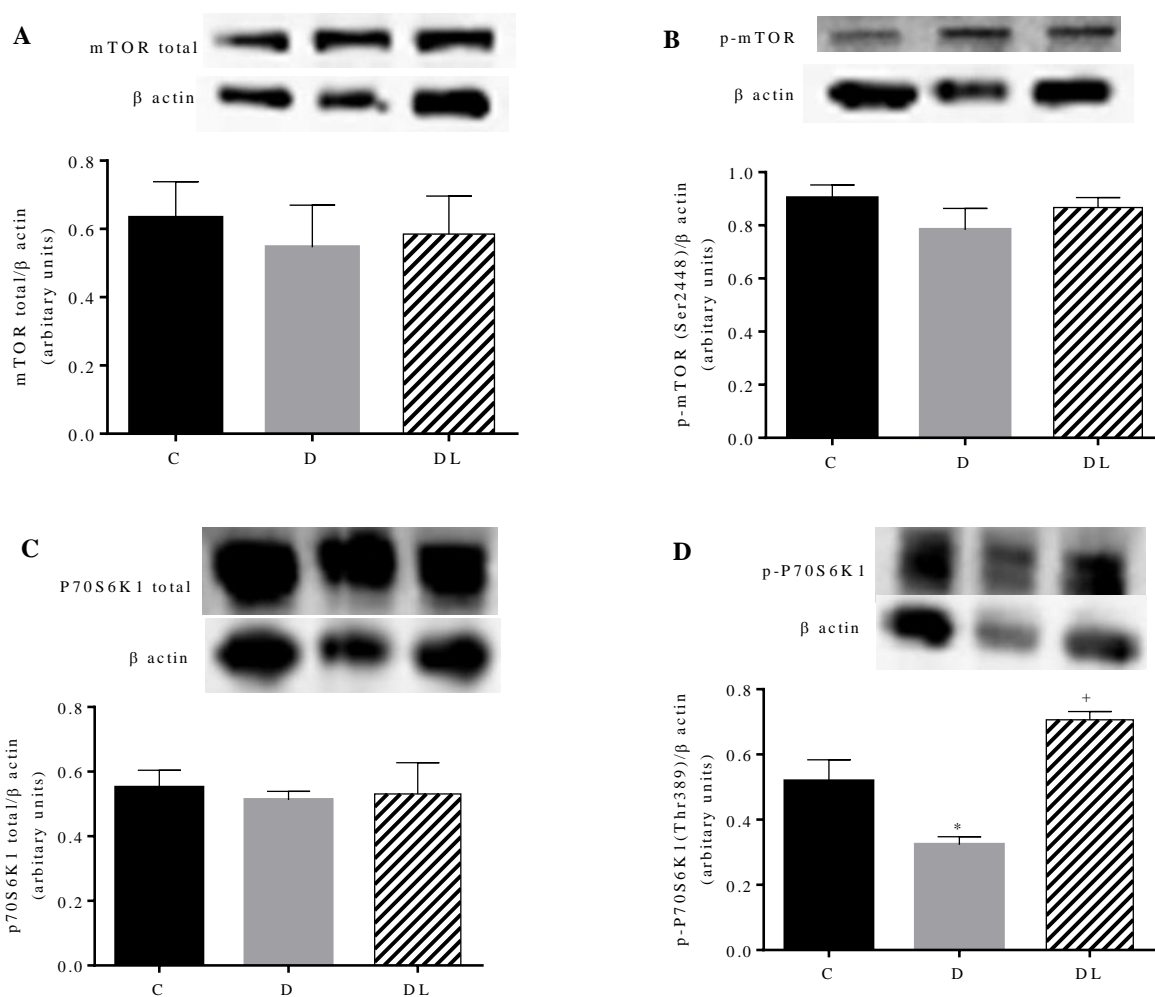
**Figura 10.** O tratamento crônico com leucina aumenta a expressão das proteínas p-p70S6K1, PPAR $\gamma$ , FAS e ACC1 totais no coxim adiposo retroperitoneal em ratos diabéticos. Legenda: C- controle; D – diabético não tratado; DL – diabético tratado com leucina. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão (n=6). ANOVA *One-way* com pós-teste de Tukey.

\* vs. grupo C ( $p < 0,05$ ), \*\* vs. grupo C ( $p < 0,01$ ), <sup>#</sup> vs. grupo D ( $p < 0,05$ ), <sup>+</sup> vs. Grupo D ( $p < 0,01$ )



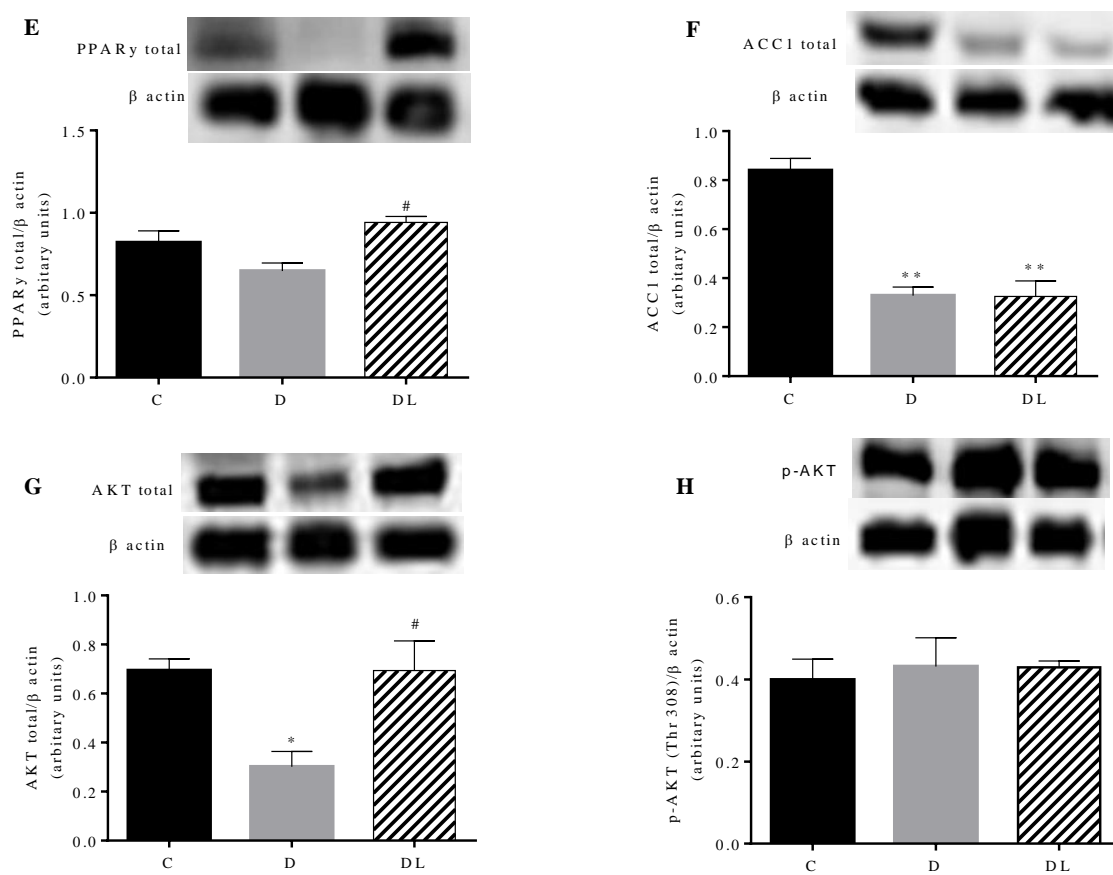
**Figura 10** (cont.). O tratamento crônico com leucina aumenta a expressão das proteínas p-p70S6K1, PPAR $\gamma$ , FAS e ACC1 totais no coxim adiposo retroperitoneal em ratos diabéticos. Legenda: C- controle; D – diabético não tratado; DL – diabético tratado com leucina. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão (n=6). ANOVA *One-way* com pós-teste de Tukey.

\* vs. grupo C (p < 0,05), \*\* vs. grupo C (p < 0,01), # vs. grupo D (p < 0,05), + vs. Grupo D (p < 0,01)



**Figura 11.** O tratamento crônico com leucina aumenta a expressão das proteínas p-p70S6K1, PPAR $\gamma$  e AKT totais no coxim adiposo subcutâneo em ratos diabéticos. Legenda: C- controle; D – diabético não tratado; DL – diabético tratado com leucina. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão (n=6). ANOVA *One-way* com pós-teste de Tukey.

\* vs. grupo C (p < 0,05), \*\* vs. grupo C (p < 0,01), # vs. grupo D (p < 0,05), <sup>+</sup> vs. Grupo D (p < 0,01)



**Figura 11** (cont.). O tratamento crônico com leucina aumenta a expressão das proteínas p-p70S6K1, PPAR $\gamma$  e AKT totais no coxim adiposo subcutâneo em ratos diabéticos. Legenda: C- controle; D – diabético não tratado; DL – diabético tratado com leucina. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão (n=6). ANOVA *One-way* com pós-teste de Tukey.

\* vs. grupo C (p < 0,05), \*\* vs. grupo C (p < 0,01), # vs. grupo D (p < 0,05), + vs. Grupo D (p < 0,01)

## 8.0 CAPÍTULO 2/ARTIGO2

*Suplementação crônica com leucina aumenta adipocinas anti-inflamatórias, adiponectina e IL-10, e melhora a resistência à insulina em ratos com diabetes induzido por STZ no período neonatal*

**Short title:** leucine increase anti-inflammatory adipokines in insulin-resistant diabetic rats

Vanessa Batista de Sousa Lima<sup>1</sup>, Carlos Eduardo Carvalho Martins<sup>1</sup>, Henrique Quintas Teixeira Ribeiro<sup>1</sup>, Francisco Leonardo Torres-leal<sup>2</sup>, Julio Tirapegui<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>*Department of Food Science and Experimental Nutrition. Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil*

<sup>2</sup>*Department of Biophysics and Physiology. Center of Sciences of Health. Federal University of Piauí, Piauí, Brazil*

\*Correspondence to: Vanessa Batista de Sousa Lima, Department of Food Science and Experimental Nutrition, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, 580, bloco14, São Paulo 05508-900, Brazil. E-mail: [vanessal@usp.br](mailto:vanessal@usp.br)

Artigo a ser enviado à revista Cell Biochemistry and Function



## Resumo

A hiperglicemia no diabetes causa uma inflamação crônica de baixo grau no tecido adiposo branco (TAB) que agrava a resistência à insulina (RI). A leucina reduz a inflamação no TAB, melhora a esteatose hepática, o metabolismo lipídico, a homeostase glicêmica e a sensibilidade à insulina no fígado, músculo esquelético e TAB. Neste estudo, foi investigado o efeito da suplementação crônica com leucina sobre marcadores pro- e anti-inflamatórios, e a repercussão metabólica desta modulação sobre a RI em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (STZ) no período neonatal. Após o desmame, os animais foram distribuídos nos grupos: C - não diabético; D - diabético; e DL - diabético que receberam dieta suplementada com 5% de leucina durante 8 semanas. A leucina reduziu a hiperglicemia, polifagia, hipertrigliceridemia e a RI, como demonstrado pelo índice  $HOMA_{IR}$  e pelo teste de tolerância oral à glicose em ratos diabéticos. As concentrações de adiponectina e IL-10 no soro e no TAB foram maiores no grupo DL comparadas com o grupo D; e a secreção de leptina no TAB foi menor no grupo DL. A expressão de RNAm de adiponectina no TAB foi maior no grupo DL *versus* grupo D. Em conclusão, a suplementação crônica com leucina melhorou a intolerância à glicose e a resistência à insulina em ratos diabéticos, cujos efeitos podem ser, em parte, explicados pelas ações anti-inflamatórias da adiponectina e da IL-10 e pelo papel da adiponectina na sensibilidade à insulina.

**Significância do estudo:** Este estudo é relevante por ser fundamentado em um modelo experimental de diabetes com hipoinsulinemia e resistência à insulina relacionada à reduzida massa adiposa, no qual foi demonstrado que um simples aminoácido pode modificar a RI e alterar a homeostase glicêmica por agir sobre o tecido adiposo branco e regular vários aspectos do metabolismo da glicose e de lipídios.

**Palavras-chave:** leucina, diabetes, resistência à insulina, inflamação, citocinas anti-inflamatórias, adiponectina, leptina.

## 1.Introdução

A hiperglicemia crônica no diabetes *mellitus* (DM) é uma consequência da reduzida secreção de insulina devido à destruição das células  $\beta$ -pancreáticas e/ou da resistência a este hormônio<sup>1</sup>. Modelos experimentais de DM induzido por estreptozotocina (STZ) têm sido úteis para estudar a complexa fisiopatologia desta doença. Doses elevadas de STZ em ratos adultos causam uma severa deficiência na secreção de insulina e DM tipo 1. Em ratos neonatos, a STZ produz uma destruição parcial das células  $\beta$  do pâncreas, e apenas na fase adulta é que se manifesta uma intolerância à glicose e hiperglicemia moderada (120 a 360 mg/dL), que são decorrentes da redução de cerca de 50% da reserva pancreática de insulina (hipoinsulinemia moderada) e da resistência à insulina em tecidos periféricos como fígado, músculo e tecido adiposo branco (TAB). Neste modelo experimental há ainda uma redução da massa adiposa com prejuízo na funcionalidade do TAB<sup>2-4</sup>.

Com a descoberta da leptina, da adiponectina e mais de 600 moléculas secretadas nos adipócitos (adipocinas), o tecido adiposo branco (TAB) se destacou como órgão endócrino regulador da homeostase metabólica<sup>5-7</sup>. As adipocinas funcionam como “mensageiras” na comunicação entre a célula adiposa e tecidos periféricos. Desta forma, estas moléculas influenciam vários aspectos do metabolismo, regulando desde mecanismos centrais relacionados ao gasto energético e à saciedade até a secreção de hormônios glicoregulatórios no pâncreas endócrino e a função imune<sup>8</sup>. Assim, é fácil perceber que possuir um TAB “saúdável” e funcional é necessário para manter uma adequada homeostase metabólica. Isto é exemplificado na obesidade ou em humanos e ratos com perda acentuada de massa adiposa (lipodistrofia), situações nas quais tanto o excesso quanto a escassez de TAB causam uma severa resistência à insulina, dislipidemia e esteatose hepática<sup>9,10</sup>.

Entre as adipocinas, destacam-se o fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8), leptina, IL-10 e a adiponectina, que são produzidas pelo próprio adipócito e por células imunes encontradas no estroma vascular do tecido adiposo. A desregulação do balanço entre estas citocinas pro- e anti-inflamatórias produz uma resposta inflamatória local ou sistêmica. Na obesidade, a ativação da cascata do NF $\kappa$ B induz a síntese de citocinas proinflamatórias pelos adipócitos e por células imunes presentes no TAB. Em contrapartida, a síntese de adiponectina no TAB, que é anti-inflamatória, diminui. Nestas

condições, leucócitos presentes no interior do tecido adiposo deflagram uma resposta inflamatória sistêmica, crônica e de baixo grau<sup>11,12</sup>.

A inflamação crônica de baixo grau e a infiltração de macrófagos no interior do tecido adiposo contribui para o desenvolvimento da resistência à insulina na obesidade, porém a contribuição desta disfunção metabólica na resistência à insulina encontrada em condições de escassez do tecido adiposo tem sido pouco estudada. No estudo de Herrero et al<sup>9</sup>, a presença de elevadas concentrações séricas de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas (TNF $\alpha$ , IL-6, MCP-1) e reduzidas de IL-10 (anti-inflamatória), além de uma infiltração generalizada de macrófagos no TAB indicam uma resposta inflamatória sistêmica que se origina no tecido adiposo de ratos com lipodistrofia. Outros estudos também encontraram elevada expressão de citocinas pró-inflamatórias e aumento no número de macrófagos no tecido adiposo subcutâneo de indivíduos com lipodistrofia induzida pelo HIV<sup>13,14</sup>.

Pesquisas sobre estratégias terapêuticas que visem atenuar a inflamação, aumentar a sensibilidade à insulina e a captação de glicose em tecidos periféricos podem ser promissoras para a melhora da homeostase glicêmica no diabetes associado ou não à perda da massa adiposa. Neste contexto, alguns estudos tem destacado o potencial efeito da suplementação com leucina no tratamento de doenças metabólicas como o diabetes tipo 2 e obesidade. A leucina não é sintetizada pelo organismo e, portanto, deve ser obtida por meio da dieta. A nível molecular, ela ativa o complexo 1 da proteína alvo de rapamicina em mamíferos (mTORC1) e, assim, pode regular vários aspectos do metabolismo em diferentes tecidos como TAB, músculo esquelético, fígado, rins e pâncreas<sup>15,16</sup>. A leucina reduz a intolerância à glicose em animais obesos, por mecanismos dependentes ou independentes de alterações na composição corporal<sup>17-22</sup>.

A ingestão crônica de leucina também pode melhorar a condição inflamatória em animais obesos. Combinado ou não com outros compostos (resveratrol ou metformina), este aminoácido reduz citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP-1 e proteína C reativa) e aumenta a concentração de adiponectina no soro e tecido adiposo de ratos obesos, melhorando a resistência à insulina em outros tecidos e a homeostase glicêmica<sup>21,23-26</sup>. Ainda não se sabe o exato mecanismo pelo qual a leucina regula o processo inflamatório, mas parece ser dependente da ativação do mTOR que inibe a via do NF $\kappa$ B. Baseado nestes aspectos, o objetivo do estudo foi avaliar o efeito da suplementação crônica com leucina sobre marcadores pro- e anti-inflamatórios no soro e tecido adiposo branco, bem como a

repercussão desta modulação sobre a resistência à insulina e outros distúrbios metabólicos em ratos diabéticos induzidos por STZ no período neonatal.

## 2. Métodos

### 2.1 Animais

36 ratos da linhagem *Wistar* machos foram obtidos no Biotério de Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e mantidos em gaiolas individuais, temperatura ambiente  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  e umidade relativa do ar  $55 \pm 10\%$ , ciclo de iluminação claro/escuro de 12/12 h (período claro iniciando às 14h00min), com água e ração *ad libitum*. Estes ratos ainda recém-nascidos (5 dias de vida) foram separados de suas respectivas mães por 8h (jejum) e distribuídos em 2 grupos: grupo diabético (n=24) que recebeu uma injeção intraperitoneal (ip) de STZ [120 mg/kg de peso corporal] diluído em tampão citrato [10mM de citrato de Na (pH 4,5)] e um grupo não diabético (n=12) que recebeu somente uma injeção (ip) do tampão citrato com volume equivalente, que foi considerado o grupo controle (**grupo C**). Ao final da terceira semana de vida (desmame), todos os ratos que pertenciam ao grupo diabético apresentaram uma glicemia igual ou superior a 150 mg/dL, e foram incluídos no estudo. Em seguida, estes animais foram distribuídos aleatoriamente entre o **grupo D** (n=12) que receberam a ração AIN-93M (dieta controle), e o **grupo DL** (n=12) que receberam a ração AIN-93M suplementada com 5% de L-leucina durante 8 semanas.

### 2.2 Dieta e desenho experimental

As dietas experimentais foram preparadas de acordo com as recomendações do *American Institute of Nutrition* (AIN-93M)<sup>27</sup> (Tabela 3). Para a ração suplementada com 5% de L-leucina, 50g de amido de milho/kg de ração foram substituídos por 50g de L-leucina. Outros estudos já utilizaram esta dose e não foi reportado nenhum efeito toxico hepático e renal em ratos<sup>29-31</sup>. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Protocolo CEUA/FCF/380).

A partir da 4<sup>a</sup> semana de vida dos animais, o peso corporal e o consumo alimentar foram avaliados semanalmente até completarem 12 semanas de vida. Na 11<sup>a</sup> semana de vida dos animais, foi realizado um teste de tolerância oral à glicose (OGTT), após 8 horas de jejum. Para isso, cada animal recebeu, por gavagem, uma dose da solução de glicose a 50% (75mg/100g p.c.). Amostras de sangue capilar caudal foram obtidas nos tempos 0 (basal), 5, 15, 30, 60 e 90 minutos após a administração da solução para análise da glicemia por meio do glicosímetro (Accu-check performa, Roche®, SP, Brasil).

### 2.3 Eutanásia

Ao final da 12<sup>a</sup> semana de vida, todos os animais foram eutanasiados após 6 horas de jejum. Imediatamente após a eutanásia dos animais, amostras de sangue foram coletadas em tubos sem anticoagulante e o soro, obtido por centrifugação, foi armazenado em freezer – 80°C em microtubos para análises das concentrações séricas de glicose, insulina, HDL-colesterol, Colesterol total, triacilglicerol e de hormônios como a leptina, adiponectina, TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10. Além disso, foi realizada uma laparotomia para a exposição do tecido adiposo subcutâneo (região inguinal) e dos tecidos epididimal, retroperitoneal e mesentérico (viscerais), que foram removidos e pesados para determinar a adiposidade dos grupos experimentais. O peso destes tecidos adiposos foi obtido pela razão entre o peso total do tecido e o peso do animal, e expresso em g/100g do animal. O tecido adiposo retroperitoneal foi utilizado para análises de adipocinas e de PCR em tempo real.

### 2.4 Concentrações séricas de glicose e de insulina de jejum, TAG, HDL e CT, e de hormônios no soro e no tecido adiposo retroperitoneal (TRP)

As concentrações de glicose, triacilglicerol, HDL-colesterol e colesterol total no soro foram determinados por método enzimático-colorimétrico, utilizando-se kits da LABTEST, por meio do aparelho LABMAX. As análises de insulina no soro, e de adiponectina, leptina, TNF-alfa, IL-6, IL-10 e IL-1beta no soro e no TRP foram realizadas utilizando-se kit's MILLIPLEX<sup>®</sup> MAP com *beads* magnéticas (RMHMAG-84K, RECYTMAG-65K, RADPNMAG-81K) (MILLIPORE). O índice HOMA<sub>IR</sub> (*homeostasis model of assessment-insulin resistance*) foi calculado como um indicador de resistência à insulina:  $HOMA = [(\text{insulinemia de jejum (mU/L)} \times \text{glicemia de jejum (mmol/L)})/22,5$ .

Para as análises no TRP, 200mg de tecido foi homogeneizado em 800µl de tampão PBS contendo inibidores de protease e fosfatase, em seguida, 25µL do extrato de TRP foi analisado conforme protocolo descrito em cada kit Milliplex MAP. Os resultados das análises de adipocinas (leptina, adiponectina, TNF-alfa, IL-6, IL-10 e IL-1beta) realizadas no TRP foram expressos em pg/mg de proteína ou ng/mg de proteína. Para isso, 25µL do extrato de TRP foi utilizado para quantificar o conteúdo total de proteína, segundo protocolo descrito no kit de quantificação de proteína por BCA (Pierce; <sup>®</sup>Thermo Scientific).

### 2.5 Reação em Cadeia de Polimerase em tempo real (*qPCR*)

O RNA foi extraído do tecido adiposo utilizando o reagente Trizol (<sup>®</sup>Invitrogen). Em seguida, o DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 2µg de RNA total, com auxílio do kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (<sup>®</sup>Applied Biosystems). Este kit usa *random primer* para iniciar a síntese de cDNA, em termociclador, nas seguintes condições: ciclos a 25°C (10 minutos), a 37°C (120 minutos), a 85°C (5 minutos) e a 4°C (3 minutos). Foi utilizado 2µL de cDNA, SYBR Green master mix e primers (<sup>®</sup>Applied Biosystems) para as análises de *qPCR*. Foi utilizado *primers* específicos: LEPTINA *sense primer* 5'-TCCCTCTGACACATCCCCTA-3', *antisense primer* 5'-GGTGGCTGGTTTGTCTGT-3'; ADIPONECTINA *sense primer* 5'-GTCCCCTTCCCCATACTT-3', *antisense primer* 5'-GAATCATTATGACGGCAGCA-3'. A quantificação relativa de cada RNA mensageiro (RNAm) foi calculada pelo método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , utilizando a expressão do gene da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) como normalizador. Os dados foram reportados como *folds*, cujos valores foram comparados àqueles do grupo controle. Os ensaios foram realizados com auxílio do aparelho StepOnePlus Real-Time PCR System (<sup>®</sup>Applied Biosystems).

### 2.6 Análise Estatística

Os resultados de cada parâmetro foram expressos como média  $\pm$  erro-padrão. Inicialmente, os dados foram avaliados quanto à homogeneidade das variâncias (testes de Bartlett). Em seguida, foi feita a análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey para

comparações entre as médias. Foi utilizado o *software GraphPad Prism* versão 5.0 (*GraphPad Software, Inc*) e adotado o valor de  $p \leq 0,05$ .

### 3. Resultados

*A suplementação crônica com leucina melhora a intolerância à glicose, sem alterar o peso corporal em animais diabéticos.*

Em animais diabéticos não tratados, o peso corporal foi significativamente reduzido, enquanto que o consumo de ração foi maior, em comparação ao grupo controle ( $p < 0,05$ , Tabela 4). Os animais do grupo D também apresentaram menores concentrações séricas de insulina, bem como elevada glicemia de jejum quando comparadas ao grupo C ( $p < 0,05$ , Tabela 4). Além disso, estes animais demonstraram maior índice de  $HOMA_{IR}$  em relação ao grupo controle, indicando que estes animais também apresentavam um prejuízo na sensibilidade periférica à ação da insulina.

A Tabela 4 mostra também que o consumo alimentar dos animais diabéticos tratados com leucina foi 30% menor em relação ao grupo diabético não tratado [ $D = 33,56 \pm 3,69$ ;  $DL = 23,67 \pm 1,58$  ( $p < 0,01$ )], sem haver diferença significativa com o grupo controle, ou seja, a suplementação crônica com leucina normalizou a polifagia diabética. Além disso, o tratamento crônico com leucina não alterou o peso corporal dos animais diabéticos, mas aumentou a massa adiposa destes animais. A adiposidade foi maior no grupo DL comparada com a do grupo D ( $p < 0,05$ ), cujo valor foi similar àquela dos animais controle (Tabela 4). Ainda que o grupo DL apresentasse menor consumo de ração em relação ao grupo D, isto não acentuou a perda de peso corporal do animal diabético. E, mesmo com um menor consumo de ração (g/dia), a ingestão diária de leucina nos animais do grupo DL foi superior a do grupo D [ $D = 0,34 \pm 0,03$ ;  $DL = 1,42 \pm 0,08$  ( $p < 0,01$ )].

Como dito anteriormente, os animais do grupo D apresentaram elevadas concentrações séricas de glicose de jejum associada à resistência periférica à ação da insulina (avaliada pelo índice  $HOMA_{IR}$ ) e uma hipoinsulinemia moderada. O grupo DL mostrou menor glicemia de jejum quando comparada ao grupo D, porém maior que o grupo C ( $p < 0,05$ ), ou seja, a suplementação crônica com leucina melhorou parcialmente a hiperglicemia dos animais diabéticos, sem alterar a hipoinsulinemia observada neste modelo experimental.

O grupo DL apresentou menor índice  $HOMA_{IR}$  em relação ao grupo D ( $p < 0,05$ ), sem haver diferença estatística com o grupo C, ou seja, o tratamento crônico com leucina conseguiu reverter o quadro da resistência à insulina destes animais (Tabela 4). Corroborando com este dado, a razão adiponectina/leptina, que é indicador de sensibilidade à insulina, estava reduzida no grupo D em relação ao grupo C [ $C = 312,9 \pm 36,96$ ;  $D = 100,2 \pm 21,57$ , ( $p < 0,05$ )] e, aumentou no grupo DL comparado com o grupo D [ $D = 100,2 \pm 21,57$ ;  $DL = 494,6 \pm 87,94$  ( $p < 0,01$ )]. A razão adiponectina/leptina no grupo DL atingiu valores similares ao dos animais não diabéticos, demonstrando que ratos diabéticos tratados com leucina também melhoraram a sensibilidade à insulina, quando avaliada por este parâmetro (Tabela 4).

A área sob a curva (AUC) e a curva glicêmica obtida durante o teste de sobrecarga oral de glicose do grupo D foram superiores àquelas do grupo C em todos os tempos avaliados ( $p < 0,01$ ), o que confirma que estes animais apresentaram distúrbios na homeostase glicêmica. Esta intolerância à glicose foi parcialmente controlada no grupo DL, ou seja, a AUC destes animais foi 17% menor do que a do grupo D, porém maior que a do grupo C ( $p < 0,05$ ) (Figura 12). O conjunto de dados apresentados na tabela 4 e Figura 12 demonstra que a suplementação crônica com leucina melhora a homeostase glicêmica em ratos diabéticos, sem alterar o peso corporal destes animais. Além disso, estes resultados reforçam a hipótese de que a intolerância à glicose observada neste modelo experimental é parcialmente explicada pelo prejuízo na resposta periférica à ação da insulina.

#### *Leucina aumenta as concentrações séricas de triacilglicerol, de adiponectina e de IL-10 em ratos diabéticos*

Neste estudo, os animais diabéticos não tratados apresentaram elevadas concentrações séricas de triacilglicerol e de colesterol total (CT) quando comparadas ao grupo C ( $p < 0,05$ ), mas não houve diferença estatística no HDL colesterol no soro entre os grupos estudados (Tabela 5). A ingestão crônica de leucina reduziu a concentração plasmática de triacilglicerol de animais diabéticos para valores similares àqueles do grupo controle (Tabela 5), ou seja, esta disfunção metabólica foi normalizada em animais diabéticos suplementados com leucina. Além disso, a leucina melhorou a hipercolesterolemia sérica dos animais diabéticos, já que não houve diferença estatística entre os grupos C e DL [ $C = 63,08 \pm 2,54$ ;  $DL = 63,50 \pm 3,40$  ( $p > 0,05$ )].



Uma vez que a hiperglicemia no diabetes está associada a um quadro de inflamação crônica de baixo grau<sup>32-34</sup>, foram analisadas as concentrações séricas de pro- e anti-inflamatórias: leptina, adiponectina, IL-6, IL-10 e TNF $\alpha$ . Neste estudo, os animais diabéticos não tratados tiveram baixas concentrações séricas de leptina e de IL-6 (proinflamatórias), bem como de adiponectina e de IL-10 (anti-inflamatórias) comparadas ao grupo C (Tabela 5;  $p > 0,05$ ). Além disso, não houve diferença estatística na concentração sérica de TNF $\alpha$  entre os grupos estudados, ou seja, não foi detectado um quadro inflamatório sistêmico nos animais diabéticos não tratados. No entanto, o fato destes animais apresentarem reduzida atividade anti-inflamatória pode comprometer a função do sistema imunológico.

Neste estudo, a suplementação crônica com leucina melhorou parcialmente a hipoleptinemia dos ratos diabéticos, visto que não houve diferença estatística entre os grupos C e DL [C =  $11.291,0 \pm 947,0$ ; DL =  $8.123,0 \pm 1146,0$ ]. Por outro lado, a concentração sérica de adiponectina foi superior no grupo DL em relação ao grupo D, sem haver diferença estatística com o grupo C, ou seja, a leucina corrigiu a hipoadiponectinemia dos animais diabéticos. Este mesmo efeito foi observado com a concentração de IL-10 no soro, uma vez que o tratamento com leucina aumentou a concentração desta citocina anti-inflamatória no soro de ratos diabéticos, alcançando valores similares ao do grupo controle. A leucina não afetou os níveis séricos de IL-6 e de TNF $\alpha$  neste modelo experimental.

*Leucina diminui a secreção de leptina, bem como aumenta a de adiponectina e de IL-10 no tecido adiposo branco (TAB)*

Neste estudo, foi observado que os animais diabéticos não tratados apresentaram reduzida secreção de TNF $\alpha$ , leptina e de adiponectina no tecido adiposo branco quando comparado com o grupo controle [TNF $\alpha$  C =  $0,202 \pm 0,01$ ; D =  $0,137 \pm 0,01$  ( $p < 0,01$ )], [leptina C =  $1959,0 \pm 146,7$ ; D =  $1010,0 \pm 61,0$  ( $p < 0,01$ )] e [adiponectina C =  $1564,0 \pm 216,8$ ; D =  $657,6 \pm 166,8$  ( $p < 0,05$ )], sendo estes dados condizentes àqueles encontrados no soro dos animais do grupo D (Figuras 13A, B e E). Estes animais não apresentaram mudanças nas concentrações de citocinas proinflamatórias IL-1 $\beta$  e IL-6 secretadas no TAB, ou seja, não houve resposta inflamatória no tecido adiposo branco dos animais do grupo D.

A ingestão crônica com leucina aumentou substancialmente a secreção de adiponectina [D =  $657,6 \pm 166,8$ ; DL =  $1664,0 \pm 234,1$  ( $p < 0,01$ )] e reduziu a de leptina [D =

1010,0 ± 61,0; DL = 597,6 ± 70,1 (p < 0,05)] no tecido adiposo branco de animais diabéticos. Além disso, a concentração de IL-10 secretada no TAB do grupo DL foi superior a do grupo D (p < 0,05), sem haver diferença com o grupo controle, o que indica que a secreção desta citocina anti-inflamatória foi normalizada em animais diabéticos (Figura 13F). Não foram observadas diferenças estatísticas na secreção de IL-6 e IL-1β entre os grupos avaliados (Figuras 13C e D).

Para explicar parte dos efeitos da suplementação crônica com leucina observados neste estudo, foi realizada a análise da expressão de RNAm da adiponectina e da leptina, citocinas que são predominantemente secretadas pelo tecido adiposo branco e que possuem papel importante na sensibilidade à insulina<sup>10,35-37</sup>. A figura 14A mostra que apesar de não haver alteração na expressão de RNAm da adiponectina em animais diabéticos não tratados, a suplementação crônica com leucina aumentou a expressão do gene que codifica esta adipocina no TRP, indicando que o aumento da secreção de adiponectina no TAB ocorreu também pela influência deste aminoácido sobre a expressão de RNAm da adiponectina. Por outro lado, a leucina não afetou a expressão de RNAm da leptina nos animais diabéticos.

#### 4. Discussão

Neste estudo foram investigados os efeitos da suplementação crônica com leucina sobre marcadores pro- e anti-inflamatórios, bem como a repercussão metabólica desta modulação sobre a homeostase glicêmica e resistência à insulina em animais diabéticos. A manifestação da polifagia, hiperglicemia crônica, perda de peso corporal, hipoinsulinemia e resistência à insulina caracterizam o diabetes mellitus neste modelo experimental. Estes autores também encontraram uma hipoleptinemia, hipoadiponectinemia e hipertrigliceridemia nestes animais<sup>3,4,38</sup>. O tratamento crônico com leucina em animais diabéticos aumentou a concentração de adipocinas anti-inflamatórias, IL-10 e adiponectina, reduziu a hipertrigliceridemia e melhorou a intolerância à glicose e a resistência à insulina neste estudo.

Diferente de alguns estudos que mostraram um aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias e da infiltração de macrófagos no TAB de animais e humanos com lipodistrofia<sup>9,13,14</sup>, não foi observado um processo inflamatório sistêmico e no tecido adiposo branco neste modelo experimental. Neste estudo, a ingestão crônica de leucina não afetou as concentrações de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNFα e IL-1β) no soro e no TAB dos

animais diabéticos. Corroborando com este resultado, no estudo de Pedroso et al.<sup>29</sup>, a suplementação crônica com leucina não alterou as concentrações séricas de citocinas pró-inflamatórias, TNF $\alpha$  e MCP-1, em animais submetidos à restrição calórica.

A suplementação com leucina aumentou substancialmente as concentrações de adiponectina e de IL-10 no soro e no TAB dos animais diabéticos, recuperando a atividade anti-inflamatória que estava reduzida nos animais do grupo D. Outros estudos também mostraram um aumento na concentração de adiponectina plasmática em ratos obesos tratados com leucina<sup>21,23,39</sup>. O tratamento crônico com leucina também aumentou a expressão de RNAm de adiponectina em animais diabéticos, assim como foi visto no estudo de Macotela et al.<sup>21</sup>, o que também contribuiu para o aumento da secreção desta citocina no TAB.

O aumento na secreção de adiponectina e de IL-10 pelo TAB, e de suas concentrações no soro podem ser, em parte, explicados pelo aumento da adiposidade em animais diabéticos tratados com leucina, cujos valores foram similares ao dos ratos não diabéticos. A leucina estimula diretamente a adipogênese e lipogênese nos adipócitos em animais resistentes à insulina, o que promove o aumento do tamanho da massa adiposa<sup>40-42</sup>. Estes dados sugerem que manter um tecido adiposo branco “saudável”, em termos de tamanho e de função, é importante para que este tecido desempenhe adequadamente seu papel como órgão endócrino e passe a secretar um perfil mais benéfico de adipocinas<sup>9,10</sup>.

A suplementação crônica com leucina reduziu a hiperglicemia dos animais diabéticos e aumentou a sensibilidade à insulina avaliada pelo índice HOMA<sub>IR</sub> e pela razão adiponectina/leptina. Neste estudo, o aumento da massa adiposa e da secreção de adiponectina pelo TAB induzidos pela ingestão crônica de leucina podem ter tido papéis importantes na intolerância à glicose e na resistência à insulina observada nos animais diabéticos. Além da sua atividade anti-inflamatória, a adiponectina também melhora a sensibilidade à insulina em vários órgãos, principalmente no TAB, fígado e músculo esquelético<sup>10</sup>.

No adipócito, a adiponectina aumenta a adipogênese e o armazenamento de triacilglicerol, promovendo assim a expansão “saudável” do TAB, bem como aumenta a captação de glicose mediada pelo GLUT-4<sup>43</sup>. No fígado e no músculo esquelético, a adiponectina reduz a lipogênese e aumenta a oxidação de lipídios por ativar a proteína quinase de AMP (AMPK) e o receptor  $\alpha$  ativado por proliferadores de peroxissoma (PPAR $\alpha$ ), prevenindo assim a esteatose hepática e o aumento de triacilglicerol intramuscular que

prejudicam a sensibilidade à insulina nestes tecidos. A adiponectina também reduz a gliconeogênese hepática por diminuir a expressão de enzimas limitantes como a fosfoenolpiruvato quinase (PEPCK) e a glicose-6-fosfatase<sup>44</sup>. Juntos, estes efeitos aumentam a sensibilidade à insulina e a captação de glicose dependente de insulina nestes tecidos, melhorando a homeostase glicêmica.

O efeito direto da leucina na sensibilidade à insulina e na captação de glicose dependente de insulina em tecidos como o fígado e o músculo esquelético podem também influenciar a homeostase à glicose<sup>17-22</sup>. A melhora da intolerância à glicose e da sensibilidade à insulina nos animais do grupo DL foram independentes de alterações no peso corporal e na concentração de insulina sérica. Em estudos anteriores, a leucina também reduziu a hiperglicemia, por mecanismos dependentes ou não de alterações na composição corporal<sup>19,45</sup>. Neste estudo, a ingestão crônica com leucina não melhorou a hipoinsulinemia dos animais diabéticos. Resultado diferente de outros estudos em animais que mostraram que a leucina apresenta propriedades insulínótropicas<sup>17,46,47</sup> e estimula a síntese proteica em células pancreáticas<sup>48,49</sup> e, dessa forma, aumenta a secreção de insulina pós prandial. Diferenças no desenho experimental, como dose de leucina ou se efeito agudo ou crônico, podem explicar estes dados contrastantes.

Sobre os resultados de leptina, os animais do grupo D apresentaram uma redução na secreção desta adipocina pelo TAB e de sua concentração sérica. Esta hipoleptinemia é resultado da intensa perda de adiposidade corporal observada neste modelo experimental, pois a leptinemia é diretamente proporcional ao tamanho da massa adiposa. No hipotálamo, a leptina aumenta a expressão de neurotransmissores que inibem a ingestão alimentar (anorexígenos), ao mesmo tempo em que inibe a expressão de neuropeptídeo Y (NPY) e do peptídeo *agouti* que estimulam a fome (orexígenos)<sup>7,10,50</sup>. A menor ação hipotalâmica da leptina sobre centros de controle da saciedade em decorrência da hipoleptinemia observada nos animais do grupo D pode explicar o aumento de 24% no consumo de ração nestes animais comparado com os ratos não diabéticos (polifagia diabética).

Vale ressaltar que além de suas ações no hipotálamo relacionadas ao controle da ingestão alimentar, do gasto energético e, portanto, do peso corporal, a leptina possui efeito anti-inflamatório no fígado, aumenta a fosforilação de proteínas da cascata de sinalização da insulina no músculo esquelético e, indiretamente, melhora a sensibilidade à insulina no

fígado, pois reduz a lipogênese *de novo* e aumenta a oxidação de lipídios nos hepatócitos<sup>7,10,50</sup>.

Neste estudo, apesar da secreção de leptina pelo TAB estar reduzida no grupo DL comparada com o grupo D, a ingestão crônica de leucina melhorou a concentração de leptina no soro dos animais diabéticos. Uma vez que a leucina possui efeito direto sobre adipócitos e a síntese de leptina é também regulada pela atividade do mTORC1, estudos investigaram se a leucina poderia regular a concentração plasmática de leptina; no entanto, tem mostrado resultados controversos. Lynch et al.<sup>51</sup> e Mao et al.<sup>52</sup> mostraram que a suplementação com leucina aumentou a concentração de leptina plasmática pós-prandial. Por outro lado, Binder et al.<sup>16</sup> não observaram alterações na leptina plasmática de animais obesos tratados cronicamente com leucina, porém, a sensibilidade à ação anorética da leptina exógena aumentou, o que reduziu a ingestão alimentar nestes animais.

Alguns fatores poderiam explicar a reduzida secreção de leptina no tecido adiposo dos ratos diabéticos tratados com leucina, o coxim adiposo avaliado (tecido adiposo visceral) e o tempo de jejum ao qual estes animais foram submetidos (6 horas). O jejum reduz drasticamente o conteúdo de leptina circulante, sugerindo que outros fatores, além do tamanho da massa adiposa, podem regular a sua secreção pelos adipócitos, como por exemplo, alterações na insulinemia induzida pelo jejum<sup>10,53</sup>. Lynch et al.<sup>55</sup> mostraram que a concentração de leptina no plasma caiu para valores basais em 6 horas após a refeição. Além disso, a expressão e secreção de leptina pelo TAB subcutâneo chega a ser 8 vezes maior do que a do TAB visceral, portanto, a escolha do coxim retroperitoneal para a análise da secreção de leptina pelo tecido adiposo branco pode ter influenciado os resultados obtidos neste estudo<sup>54</sup>.

A ingestão crônica de leucina reduziu o consumo alimentar dos ratos diabéticos, cujos valores foram semelhantes aos dos animais não diabéticos neste estudo. Apesar da influência da leucina sobre a leptina plasmática, o efeito deste aminoácido sobre o controle da ingestão alimentar ainda é inconclusivo. Estudos experimentais mostram que a infusão de leucina no sistema nervoso central reduz a ingestão alimentar e, aqueles que investigam os efeitos crônicos da leucina da dieta sobre o comportamento alimentar mostraram que este aminoácido pode aumentar, reduzir, ou não alterar o consumo alimentar<sup>21,30,42,52</sup>. Portanto, o efeito anorético da leucina, quando é ingerida na dieta, sobre o sistema nervoso central ainda precisa ser mais bem estudado.

Estudos já relataram que a suplementação com leucina também pode influenciar o metabolismo de lipídios em animais obesos induzidos pela dieta<sup>22,39</sup>. Neste estudo, a suplementação crônica com leucina reduziu a hipertrigliceridemia dos ratos diabéticos. Isto pode ser explicado, em parte, pelo efeito direto da leucina sobre a ativação da adipogênese e da lipogênese, e sobre a inibição da lipólise no TAB<sup>40,41,42</sup>. Estes processos aumentam o armazenamento de triacilglicerol no interior dos adipócitos, reduzindo o conteúdo destes lipídeos no sangue. Além disso, foi observada uma melhora da hipercolesterolemia nos animais diabéticos. Estudos têm mostrado uma redução do colesterol plasmático<sup>39</sup> ou nenhuma alteração deste parâmetro em animais obesos tratados com leucina<sup>21</sup>.

Em conclusão, a suplementação crônica com leucina diminuiu a intolerância à glicose e a resistência à insulina em ratos diabéticos. Este aminoácido aumentou a secreção de adiponectina e de IL-10 no tecido adiposo branco e suas concentrações séricas. As ações destas adipocinas como citocinas anti-inflamatórias e o papel da adiponectina sobre a sensibilidade à insulina em vários tecidos e a expansão “saúdável” do tecido adiposo branco influenciaram positivamente a homeostase glicêmica neste estudo. A leucina ainda diminuiu a hipertrigliceridemia e aumentou a adiposidade dos animais diabéticos. Estes resultados indicam que a ingestão crônica de leucina pode amenizar a disfunção metabólica causada pela hiperglicemia e resistência à insulina no diabetes.

### **Conflito de Interesse**

Os autores declaram não haver conflito de interesse.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento à pesquisa.

## **5. Referências**

1. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care* 2016; **39**:S13-S22.

2. Arulmozhi SK, Veerranjaneyulu A, Bodnahkar SL. Neonatal streptozotocin-induced rat modelo f type 2 diabetes mellitus: a glance. *Indian J Pharmacol* 2004; **36**:217-221.
3. de Oliveira AC, Andreotti S, Farias TDA, Torres-Leal, FL, de Proença, AR, Campaña AB, de Souza AH, Sertié RA, Carpinelli AR, Cipolla-Neto J, Lima FB.. Metabolic disorders and adipose tissue insulin responsiveness in neonatally STZ-induced diabetic rats are improved by long-term melatonin treatment. *Endocrinology* 2012; **153**:2178-2188.
4. Takada J, Fonseca-Alaniz MH, De Campos TB, Andreotti S, Campaña, AB, Okamoto M, Borges-Silva CD, Machado UF, Lima FB. Metabolic recovery of adipose tissue is associated with improvement in insulin resistance in a model of experimental diabetes. *J Endocrinol* 2008; **198**:51-60.
5. Lehr S, Hartwig S, Lamers D, Famulla S, Müller S, Hanisch FG, Cuvelier C, Ruige J, Eckardt K, Ouwens DM, Sell H, Eckel J. Identification and validation of novel adipokines released from primary human adipocytes. *Mol Cell Proteomics* 2012; **11**:M111.010504.
6. Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* 2015; **270**:26746–26749.
7. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; **372**:425-432.
8. Lehr S, Hartwig S, Sell H. Adipokines: a treasure trove for the discovery of biomarkers for metabolic disorders. *Proteomics Clin Appl* 2012; **6**:91–101.
9. Herrero L, Shapiro H, Nayer A, Lee, J, Shoelson SE. Inflammation and adipose tissue macrophages in lipodystrophic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; **107**:240-245.
10. Stern JH, Rutkowski JM, Scherer PE. Adiponectin, leptin, and fatty acids in the maintenance of metabolic homeostasis through adipose tissue crosstalk. *Cell Metab* 2016; **23**:770-784.
11. Hosogai N, Fukuhara A, Oshima K, Miyata Y, Tanaka S, Segawa K, Furukawa S, Tochino Y, Komuro R, Matsuda M, Shimomura I. Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes* 2007; **56**:901–911.
12. Mancuso P. The role of adipokines in chronic inflammation. *Immunotargets Ther* 2016; **5**:47-56.

13. Johnson JA, Albu JB, Engelson ES, Fried SK, Inada Y, Ionescu G, Kotler DP. Increased systemic and adipose tissue cytokines in patients with HIV-associated lipodystrophy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; **286**:E261–E271.
14. Lagathu C, Eustace B, Prot M, Frantz D, Gu Y, Bastard JP, Maachi M, Azoulay S, Briggs M, Caron M, Capeau J. Some HIV antiretrovirals increase oxidative stress and alter chemokine, cytokine or adiponectin production in human adipocytes and macrophages. *Antivir Ther* 2007; **12**:489–500.
15. Layman DK, Walker DA. Potential importance of leucine in treatment of obesity and the metabolic syndrome. *J Nutr* 2006; **136**:319S-323S.
16. Pedroso JA, Zampieri TT, Donato JJr. Reviewing the effects of L-leucine supplementation in the regulation of food intake, energy balance, and glucose homeostasis. *Nutrients* 2015; **7**:3914-3937.
17. Binder E, Bermudez-Silva FJ, Andre C, Elie M, Romero-Zerbo SY, Leste-Lasserre T, Belluomo I, Duchampt A, Clark S, Aubert A, Mezzullo M, Fanelli F, Pagotto U, Layé S, Mithieux G, Cota D. Leucine supplementation protects from insulin resistance by regulating adiposity levels. *PLoS ONE* 2013; **8**:e74705.
18. Binder E, Bermudez-Silva FJ, Elie M, Leste-Lasserre T, Belluomo I, Clark S, Duchampt A, Mithieux G, Cota D. Leucine supplementation modulates fuel substrates utilization and glucose metabolism in previously obese mice. *Obesity (Silver Spring)* 2014; **22**:713–720.
19. Eller LK, Saha DC, Shearer J, Reimer RA. Dietary leucine improves whole-body insulin sensitivity independent of body fat in diet-induced obese sprague-dawley rats. *J Nutr Biochem* 2013; **24**:1285–1294.
20. Freudenberg A, Petzke KJ, Klaus S. Comparison of high-protein diets and leucine supplementation in the prevention of metabolic syndrome and related disorders in mice. *J Nutr Biochem* 2012; **23**:1524–1530.
21. Macotela Y, Emanuelli B, Bång AM, Espinoza DO, Boucher j, Beebe K, Gall W, Kahn CR. Dietary leucine-an environmental modifier of insulin resistance acting on multiple levels of metabolism. *PLoS ONE* 2011; **6**:e21187.
22. Zhang Y, Guo K, Leblanc RE, Loh D, Schwartz GJ, Yu YH. Increasing dietary leucine intake reduces diet-induced obesity and improves glucose and cholesterol metabolism in mice via multimechanisms. *Diabetes* 2007; **56**:1647–1654.



23. Bruckbauer A, Zemel MB, Thorpe T, Akula MR, Stuckey AC, Osborne D, Martin EB, Kennel S, Wall JS. Synergistic effects of leucine and resveratrol on insulin sensitivity and fat metabolism in adipocytes and mice. *Nutr Metab (Lond)* 2012; **9**:77. doi: 10.1186/1743-7075-9-77.
24. Fu L, Bruckbauer A, Li F, Cao Q, Cui X, Wu R, Shi H, Zemel MB, Xue B. Interaction between metformin and leucine in reducing hyperlipidemia and hepatic lipid accumulation in diet-induced obese mice. *Metabolism* 2015; **64**:1426-1434.
25. Fu L, Li F, Bruckbauer A, Cao Q, Cui X, Wu R, Shi H, Xue B, Zemel MB. Interaction between leucine and phosphodiesterase 5 inhibition in modulating insulin sensitivity and lipid metabolism. *Diabetes Metab Syndr Obes* 2015; **8**:227-239.
26. Weichhart T, Costantino G, Poglitsch M, Rosner M, Zeyda M, Stuhlmeier KM, Kolbe T, Stulnig TM, Horl H, Hengstschläger M, Müller M, Säemann MD. The TSC-mTOR signaling pathway regulates the innate inflammatory response. *Immunity* 2008; **29**:565-577.
27. Reeves PG, Rossow KL, Lindlauf J. Development and testing of the AIN-93 purified diets for rodents: results on growth, kidney calcification and bone mineralization in rats and mice. *J Nutr* 1993; **123**:1923-1931.
28. Matsuzaki K, Kato H, Sakai R, Toue S, Amao M, Kimura T. Transcriptomics and metabolomics of dietary leucine excess. *J Nutr* 2005; **135**:1571S-1575S.
29. Pedroso JA, Nishimura LS, de Matos-Neto EM, Donato JJr, Tirapegui J. Leucine improves protein nutrition status and regulates hepatic lipid metabolism in calorie-restricted rat. *Cell Biochem Funct* 2013; **32**:326-332.
30. Ropelle ER, Pauli JR, Fernandes MFA, Rocco SA, Marin RM, Morari J, Souza KK, Dias MM, Gomes-Marcondes MC, Gontijo JA, Franchini KG, Velloso LA, Saad MJ, Carvalheira JB. A central role for neuronal amp-activated protein kinase (AMPK) and mammalian target of rapamycin (mTOR) in high-protein diet-induced weight loss. *Diabetes* 2008; **57**:594-605.
31. Tsubuku S, Hatayama K, Katsumata T, Nishimura N, Mawatari K, Smriga M, Kimura T. Thirteen-week oral toxicity study of branched-chain amino acids in rats. *Int J Toxicol* 2004; **23**:119-126.
32. Das A, Mukhopadhyay S. The evil axis of obesity, inflammation and type-2 diabetes. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2011; **11**:23-31.

33. Donath MY, Shoelson SE. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev Immunol.* 2011; **11**:98-107.
34. Jung U, Choi MS. Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Sci* 2014; **15**:6184-6223.
35. Chinookoswong N, Wang JL, Shi ZQ. Leptin restores euglycemia and normalizes glucose turnover in insulin-deficient diabetes in the rat. *Diabetes* 1999; **48**:1487-1492.
36. Okada-Iwabu M, Yamauchi T, Iwabu M, Homma T, Hamagami K, Matsuda K, Yamaguchi M, Tanabe H, Kimura-Someya T, Shirouzu M, Ogata H, Tokuyama K, Ueki K, Nagno T, Tanaka A, Yokoyama S, Kadowaki T. A small-molecule AdipoR agonist for type 2 diabetes and short life in obesity. *Nature* 2013; **503**:493-499.
37. Zienke F, Mabtzoros CS. Adiponectin in insulin resistance: lessons from translational research. *Am J Clin Nutr* 2010; **91**:258S-261S.
38. Takada J, Machado MA, Peres SB, Brito LC, Borges-Silva CN, Costa CE, Fonseca-Alaniz MH, Andreotti S, Lima FB. Neonatal streptozotocin-induced diabetes mellitus: a model of insulin resistance associated with loss of adipose mass. *Metabolism* 2007; **56**:977-984.
39. Torres-Leal FL, Fonseca-Alaniz MH, Teodoro GFR, Capitani MD, Vianna D, Pantaleão LC, Matos-Neto EM, Rogero MM, Donato JJr, Tirapegui J. Leucine supplementation improves adiponectin and total cholesterol concentrations despite the lack of changes in adiposity or glucose homeostasis in rats previously exposed to a high-fat diet. *Nutr Metab(lond)* 2011; **8**:62-72.
40. Lynch CJ, Patson BJ, Anthony J, Vaval A, Jefferson LS, Vary TC. Leucine is a direct-acting nutrient signal that regulates protein synthesis in adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; **283**:E503-E513.
41. Zampieri TT, Torres-Leal FL, Campana AB, Lima FB, DONATO JJr. L-leucine supplementation worsens the adiposity of already obese rats by promoting a hypothalamic pattern of gene expression that favors fat accumulation. *Nutrients* 2014; **6**:1364-1373.
42. Zeanandin G, Balage M, Schneider SM, Dupont J, Hebuterne X, Mothe-Satney I, Dardevet D. Differential effect of long-term leucine supplementation on skeletal muscle and adipose tissue in old rats: an insulin signaling pathway approach. *Age* 2012; **34**:371-387.

43. Morley TS, Cherer PE. Selective enhancement of insulin sensitivity in the mature adipocyte is sufficient for systemic metabolic improvements. *Nat Commun* 2015; **6**:7906. doi: 10.1038/ncomms8906.
44. Yoon MJ, Lee GY, Chung JJ, Ahn YH, Hong SH, Kim JB. Adiponectin increases fatty acid oxidation in skeletal muscle cells by sequential activation of AMP-activated protein kinase, p38 mitogen-activated protein kinase, and peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Diabetes* 2006; **55**:2562-2570.
45. Li H, Xu M, Lee J, He C, Xie Z. Leucine supplementation increases sirt1 expression and prevents mitochondrial dysfunction and metabolic disorders in high-fat diet-induced obese mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012; **303**:E1234–E1244.
46. Filiputti E, Rafacho A, Araujo EP, Silveira LR, Trevisan A, Batista TM, Curi R, Velloso LA, Quesada I, Boschero AC, Carneiro EM. Augmentation of insulin secretion by leucine supplementation in malnourished rats: Possible involvement of the phosphatidylinositol 3-phosphate kinase/mammalian target protein of rapamycin pathway. *Metabolism* 2010; **59**:635–644.
47. Van Loon LJ, Kruijshoop M, Verhagen H, Saris WH, Wagenmakers AJ. Ingestion of protein hydrolysate and amino acid-carbohydrate mixtures increases postexercise plasma insulin responses in men. *J Nutr* 2000; **130**:2508–2513.
48. Xu G, Kwon G, Marshall CA, Lin TA, Lawrence JC Jr, McDaniel ML. Branched-chain amino acids are essential in the regulation of p70 s6 kinase by pancreatic beta-cells. A possible role in protein translation and mitogenic signaling. *J Biol Chem* 1998; **273**:28178–28184.
49. Sans MD, Tashiro M, Vogel NL, Kimball SR, D'alecy LG, Williams JA. Leucine activates pancreatic translational machinery in rats and mice through mtor independently of cck and insulin. *J Nutr* 2006; **136**:1792–1799.
50. Yu X, Park BH, Wang MY, Wang ZV, Unger RH. Making insulin-deficient type 1 diabetic rodents thrive without insulin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**:14070-14075.
51. Lynch CJ, Gern B, Lloyd C, hutson SM, Eicher R, Vary TC. Leucine in food mediates some of the postprandial rise in plasma leptin concentrations. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; **291**:E621–E630.

52. Mao X, Zeng X, Huang Z, Wang J, Quiao S. Leptin and leucine synergistically regulate protein metabolism in C2C12 myotubes and mouse skeletal muscles. *Br J Nutr* 2013; **110**:256-264.
53. Boden G, Chen X, Mozzoli M, Ryan I. Effect of fasting on serum leptin in normal human subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; **81**:3419–3423.
54. Van Harmelen V, Dicker A, Rydén M, Hauner H, Lönnqvist F, Näslund E, Arner P. Increased lipolysis and decreased leptin production by human omental compared with subcutaneous preadipocytes. *Diabetes* 2002; **51**:2029-2036.

**Tabela 3.** Composição nutricional das dietas, conforme AIN-93M.

<b>Nutrientes</b>	<b>Controle (g/kg ração)</b>	<b>5% L-leucina* (g/kg ração)</b>
<b>Amido de milho</b>	620,692	570,692
<b>Caseína (&gt;85% proteína)</b>	140,0	140,0
<b>Sacarose</b>	100,0	100,0
<b>Óleo de soja</b>	40,0	40,0
<b>Celulose</b>	50,0	50,0
<b>Mix mineral</b>	35,0	35,0
<b>Mix vitaminas</b>	10,0	10,0
<b>L-cistina</b>	1,8	1,8
<b>Bitartarato de colina</b>	2,5	2,5
<b>Tert-butil-hidroquinona</b>	0,008	0,008
<b>Leucina</b>	-----	50

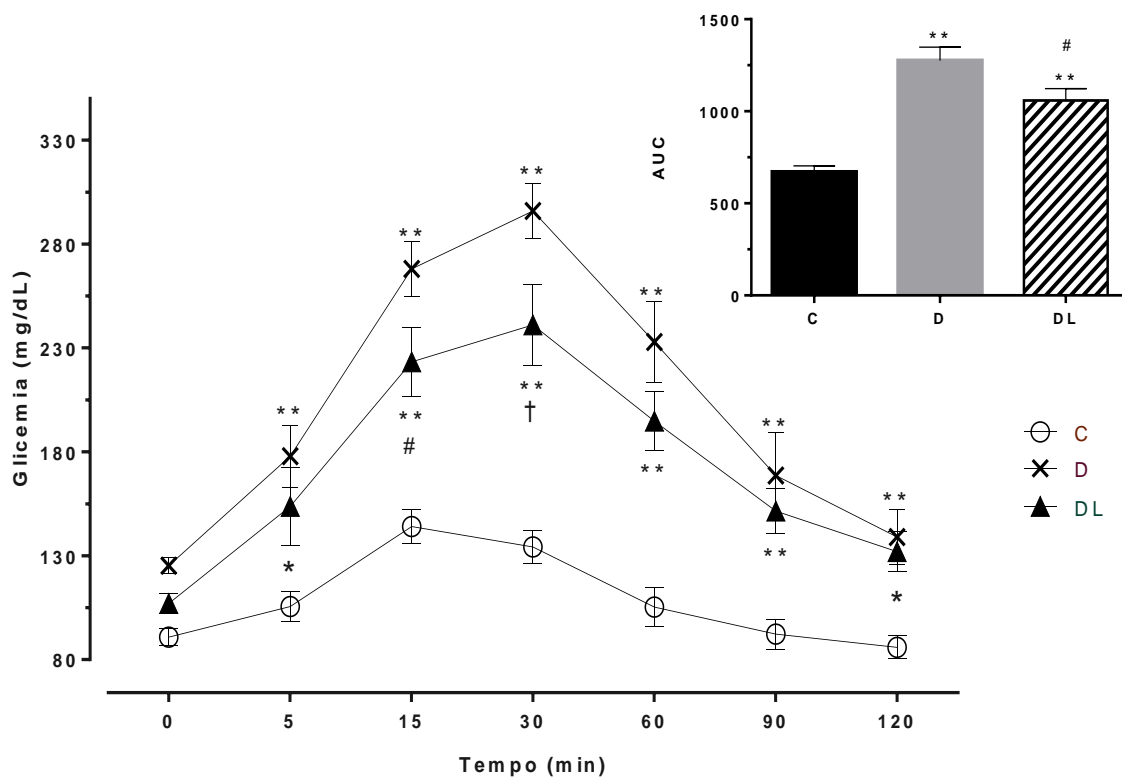
\*Adaptada de Reeves et al.<sup>25</sup>

**Tabela 4.** Peso corporal, consumo diário de ração e leucina, glicemia e insulinemia de jejum e índice HOMA<sub>IR</sub> ao final das 12 semanas de vida dos ratos diabéticos.

	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>DL</b>
<b>Peso corporal (g)</b>	318,50 ± 6,45	280,90 ± 13,23 <sup>*</sup>	283,20 ± 8,26 <sup>*</sup>
<b>Consumo de ração (g/dia)</b>	25,36 ± 0,79	33,56 ± 3,69 <sup>*</sup>	23,67 ± 1,58 <sup>†</sup>
<b>Consumo de leucina (g/dia)</b>	0,28 ± 0,01	0,34 ± 0,03	1,42 ± 0,08 <sup>**†</sup>
<b>Glicemia de jejum (mg/dL)</b>	82,00 ± 6,02	174,90 ± 12,55 <sup>**</sup>	131,80 ± 11,66 <sup>**#</sup>
<b>Insulina (pg/mL)</b>	2301,00 ± 411,90	1255,00 ± 158,60 <sup>*</sup>	1117,00 ± 279,90 <sup>*</sup>
<b>HOMA<sub>IR</sub></b>	8,31 ± 1,55	14,07 ± 1,32 <sup>*</sup>	8,66 ± 1,83 <sup>#</sup>
<b>Adiposidade (g/100g) (Σ coxins sub e visc)</b>	5,44 ± 0,25	2,96 ± 0,36 <sup>**</sup>	4,53 ± 0,28 <sup>†</sup>

Legenda: C- controle; D – diabético não tratado; DL – diabético tratado com leucina; HOMA<sub>IR</sub> – *homeostasis model of assessment-insulin resistance*; Σ coxins sub e visc – somatório dos coxins subcutâneo e viscerais. Dados expressos em média ± erro padrão (n ≥10). ANOVA *One-way* com pós-teste de Tukey.

<sup>\*</sup> vs. grupo C (p< 0,05), <sup>\*\*</sup> vs. grupo C (p< 0,01), <sup>#</sup> vs. grupo D (p< 0,05), <sup>†</sup> vs. Grupo D (p< 0,01)



**Figura 12.** Curva glicêmica após sobrecarga oral de glicose (OGTT) de ratos diabéticos tratados ou não com leucina. Legenda: C- controle; D – diabético não tratado; DL – diabético tratado com leucina e AUC – área sob a curva. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão ( $n \geq 10$ ). ANOVA *two-way* com pós-teste de Tukey.

\* vs. grupo C ( $p < 0,05$ ), \*\* vs. grupo C ( $p < 0,01$ ), # vs. grupo D ( $p < 0,05$ ), † vs. Grupo D ( $p < 0,01$ )

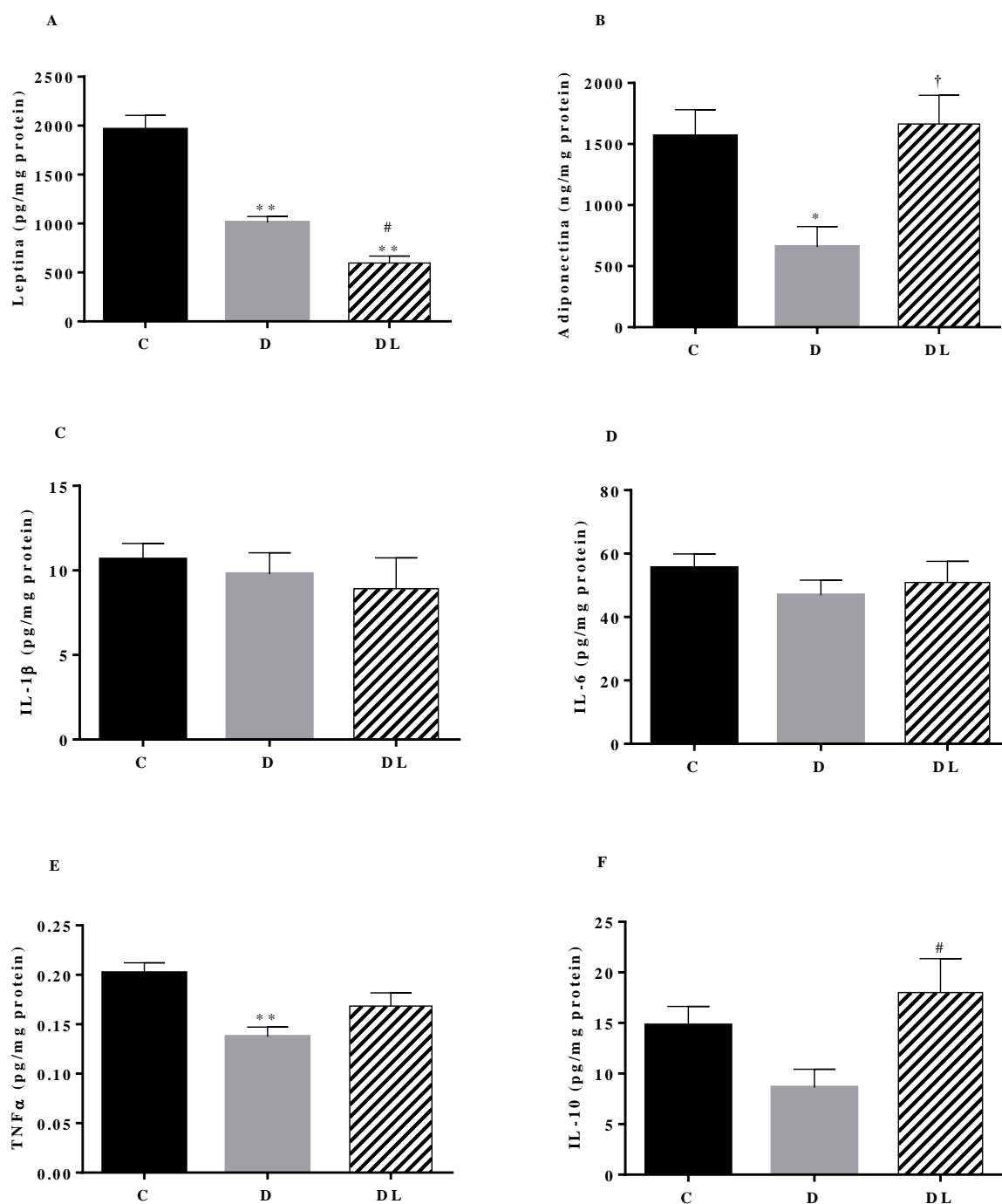
**Tabela 5.** Triacilglicerol, Colesterol total, HDL colesterol e citocinas no soro de ratos diabéticos tratados ou não com leucina na 12ª semana de vida.

	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>DL</b>
<b>TAG (mg/dL)</b>	61,60 ± 5,30	86,90 ± 10,16*	59,25 ± 3,39 <sup>#</sup>
<b>Colesterol total (mg/dL)</b>	63,08 ± 2,54	74,67 ± 3,70*	63,50 ± 3,40
<b>HDLc (mg/dL)</b>	33,0 ± 1,67	36,92 ± 2,87	36,17 ± 2,16
<b>Leptina (pg/mL)</b>	11.291,0 ± 947,80	6.993,0 ± 1401,0*	8.123,0 ± 1146,0
<b>Adiponectina (ng/mL)</b>	2.652,0 ± 366,90	1.369,0 ± 267,30*	2.935,0 ± 383,50 <sup>#</sup>
<b>Adiponectina/leptina</b>	312,9 ± 36,96	100,2 ± 21,57*	494,6 ± 87,94 <sup>†</sup>
<b>IL-6 (pg/mL)</b>	289,3 ± 51,71	158,5 ± 10,74**	180,6 ± 17,03*
<b>IL-10 (pg/mL)</b>	26,45 ± 2,90	15,18 ± 0,74*	23,22 ± 2,49 <sup>#</sup>
<b>TNFα (pg/mL)</b>	8,21 ± 0,77	5,78 ± 0,39	7,79 ± 0,83

Dados estão em média ± erro padrão (n ≥10). ANOVA *one-way* com pós-teste de Tukey. Legenda: C- controle; D – diabético não tratado; DL – diabético tratado com leucina; TAG – triacilgliceróis; HDLc - lipoproteína de alta densidade; LDL – lipoproteína de baixa densidade; IL-6 – interleucina 6; TNFα – fator de necrose tumoral alfa; IL-10 – interleucina 10.

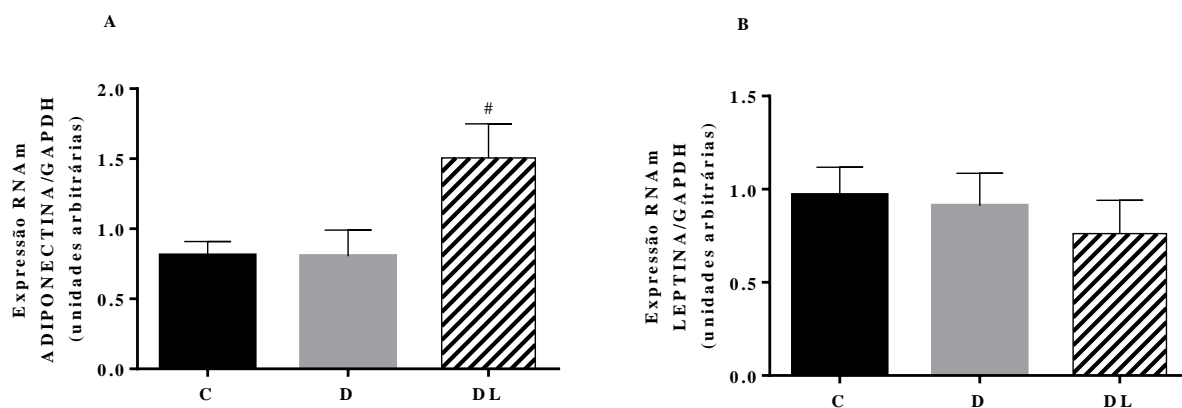
\* vs. grupo C (p< 0,05), \*\* vs. grupo C (p< 0,01), <sup>#</sup> vs. grupo D (p< 0,05), <sup>†</sup> vs. Grupo D (p< 0,01)





**Figura 13.** Adipocinas secretadas no tecido adiposo retroperitoneal de ratos diabéticos com dieta suplementada ou não com leucina. ANOVA *one-way* com pós-teste de Tukey. Legenda: C- controle, D – diabético não tratado, DL – diabético tratado com leucina, IL-1 $\beta$  – interleucina 1 $\beta$ , IL-6 – interleucina 6, TNF $\alpha$  – fator de necrose tumoral alfa, IL-10 – interleucina 10.

\* vs grupo C ( $p < 0,05$ ), \*\* vs grupo C ( $p < 0,01$ ), # vs grupo D ( $p < 0,05$ ), † vs grupo D ( $p < 0,01$ ).



**Figura 14.** A suplementação crônica com leucina aumenta a expressão de RNA<sub>m</sub> da adiponectina no tecido adiposo retroperitoneal de ratos diabéticos. ANOVA *one-way* com pós-teste de Tukey. Legenda: C- controle, D – diabético não tratado, DL – diabético tratado com leucina. Dados expressos em média ± erro padrão (n = 10).

<sup>#</sup>vs grupo D (p < 0,05).

## 9.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em conclusão, a suplementação crônica com leucina aumentou a adiposidade do coxim adiposo subcutâneo e visceral e, em paralelo, reverteu o quadro de resistência à insulina e melhorou a intolerância à glicose em modelo experimental de diabetes associado à perda intensa de tecido adiposo branco. Além de aumentar a adiposidade corporal, a ação da leucina sobre a sensibilidade à insulina no coxim subcutâneo parece estar mais relacionada com a recuperação da via de sinalização da insulina induzida pela AKT, ao passo que, no coxim visceral está indiretamente relacionada com a melhora do perfil de adipocinas secretadas por este tecido. Além disso, o tratamento crônico com leucina reduziu a hipertrigliceridemia nos animais diabéticos. Isto demonstra que a recuperação da massa adiposa branca corrigiu consideravelmente os distúrbios metabólicos relacionados ao metabolismo da glicose e de lipídeos nesta doença e melhorou a condição clínica dos animais.

## 10. REFERÊNCIAS

ADAMS, S.H. Emerging perspectives on essential amino acid metabolism in obesity and the insulin-resistant state. **Adv Nutr.**, v.2, p.445–456, 2011.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes. **Diabetes Care**, v.39, suppl 1, p.S13-S22, 2016.

BINDER, E.; BERMUDEZ-SILVA, F.J.; ANDRE, C.; ELIE, M.; ROMERO-ZERBO, S.Y.; LESTE-LASSERRE, T.; BELLUOMO, L.; DUCHAMPT, A.; CLARK, S.; AUBERT, A.; MEZZULLO M, FANELLI F, PAGOTTO U, LAYÉ S, MITHIEUX G, COTA D. Leucine supplementation protects from insulin resistance by regulating adiposity levels. **PLoS One**, v.8, p.e74705, 2013.

BINDER, E.; BERMÚDEZ-SILVA, F.J.; ELIE, M.; LESTE-LASSERRE, T.; BELLUOMO, I.; CLARK, S.; DUCHAMPT, A.; MITHIEUX, G.; COTA, D. Leucine supplementation modulates fuel substrates utilization and glucose metabolism in previously obese mice. **Obesity (Silver Spring)**, v.22, p.713-720, 2014.

BLOUET, C.; JO, Y-H.; LI, X.; SCHWARTZ, G.J. Mediobasal hypothalamic leucine sensing regulates food intake through activation of a hypothalamus–brainstem circuit. **J Neurosci.**, v.29, p.8302-8311, 2009.

BLÜMER, R.M.; VAN-ROOMEN, C.P.; MEIJER, A.J.; HOUBEN-WEERTS, J.H.; SAUERWEIN, H.P.; DUBBELHUIS, P.F. Regulation of adiponectin secretion by insulin and amino acids in 3T3-L1 adipocytes. **Metabolism.**, v.57, p.1655-1662, 2008.

CAMPAÑA, A.B. A puberdade altera a responsividade à insulina do tecido adiposo assim como sua capacidade lipogênica. [Tese (Doutorado em Fisiologia Humana)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

CAPEAU, J.; MAGRÉ, J.; CARON-DEBARLE, M.; LAGATHU, C.; ANTOINE, B.; BÉRÉZIAT, V.; LASCOLS, O.; BASTARD, J.P.; VIGOUROUX, C. Human lipodystrophies: genetic and acquired diseases of adipose tissue. **Endocr Dev.**, vol. 19, p.1–20, 2010.

CARNEVALLI, L.S.; MASUDA, K.; FRIGERIO, F.; LE-BACQUER, O.; UM, S.H.; GANDIN, V.; TOPISIROVIC, I.; SONENBERG, N.; THOMAS, G.; KOZMA, S.C. S6K1 plays a critical role in early adipocyte differentiation. **Dev Cell.**, v.18, p.763-774, 2010.

CHAKRABARTI, P.; ENGLISH, T.; SHI, J.; SMAS, C.M.; KANDROR, K.V. Mammalian target of rapamycin complex 1 suppresses lipolysis, stimulates lipogenesis, and promotes fat storage. **Diabetes**, v.59, p.775–781, 2010.

CHO, H.J.; PARK, J.; LEE, H.W.; LEE, Y.S.; KIM, J.B. Regulation of adipocyte differentiation and insulin action with rapamycin. **Biochem Biophys Res Commun.** v.321, p.942-948, 2004.

CHOI, J.H.; BANKS, A.S.; ESTALL, J.L.; KAJIMURA, S.; BOSTRÖM, P.; LAZNIK, D.; RUAS, J.L.; CHALMERS, M.J.; KAMENECKA, T.M.; BLÜHER, M.; GRIFFIN, P.R.;

SPIEGELMAN, B.M. Anti-diabetic drugs inhibit obesity-linked phosphorylation of PPARgamma by Cdk5. **Nature**, v.466, p.451-456, 2010.

COTA, D.; PROULX, K.; SMITH, K.A.; KOZMA, S.C.; THOMAS, G.; WOODS, S.C.; SEELEY, R.J. Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. **Science**, v.312, p.927-930, 2006.

CYPESS, A. M.; LEHMAN, S.; WILLIAMS, G.; TAL, I.; RODMAN, D.; GOLDFINE, A. B.; KUO, F. C.; PALMER, E. L.; TSENG, Y. H.; DORIA, A.; KOLODNY, G. M.; KAHN, C. R. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. **N Engl J Med.**, v.360, p.1509-1517, 2009.

DONATO, J., JR. Efeitos da variação do peso corporal e da suplementação com L-leucina e L-fenilalanina na composição corporal e em parâmetros metabólicos em ratos. [Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos)]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo; 2005.

DRGONOVA, J.; JACOBSSON, J.A.; HAN, J.C.; YANOVSKI, J.A.; FREDRIKSSON, R.; MARCUS, C.; SCHIÖTH, H.B.; UHL, G.R. Involvement of the neutral amino acid transporter slc6a15 and leucine in obesity-related phenotypes. **PLOS ONE**, v.8, p.e68245, 2013.

ELLER, L.K.; SAHA, D.C.; SHEARER, J.; REIMER, R.A. Dietary leucine improves whole-body insulin sensitivity independent of body fat in diet-induced obese sprague-dawley rats. **J Nutr Biochem**, v.24, p.1285–1294, 2013.

FESTUCCIA, W.T.; BLANCHARD, P.G.; TURCOTTE, V.; LAPLANTE, M.; SARIAHMETOGLU, M.; BRINDLEY, D.N.; DESHAIES, Y. Depot-specific effects of the PPARgamma agonist rosiglitazone on adipose tissue glucose uptake and metabolism. **J Lipid Res.**, v.50, p.1185-1194, 2009.

FONSECA-ALANIZ, MH.; TAKADA, J.; ALONSO-VALE, MI.; LIMA, FB. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. **J Pediatr (Rio J)**, v.83, p.S192-203, 2007.

FREUDENBERG, A.; PETZKE, K.J.; KLAUS, S. Comparison of high-protein diets and leucine supplementation in the prevention of metabolic syndrome and related disorders in mice. **J Nutr Biochem.**, v.23, p.1524-1530, 2012.

GALIC, S.; OAKHILL, J. S.; STEINBERG, G. R. Adipose tissue as an endocrine organ. **Mol Cell Endocrinol.**, v.316, p.129-39, 2010.

GESTA, S.; TSENG, Y.H.; KAHN, C.R. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. **Cell.**, v.131, p.242-256, 2007.

GAO, S.; KINZIG, K.P.; AJA, S.; SCOTT, K.A.; KEUNG, W.; KELLY, S.; STRYNADKA, K.; CHOHNAN, S.; SMITH, W.W.; TAMASHIRO, K.L.; LADENHEIM, E.E.; RONNETT, G.V.; TU, Y.; BIRNBAUM, M.J.; LOPASCHUK, G.D.; MORAN, T.H. Leptin activates hypothalamic acetyl-CoA carboxylase to inhibit food intake. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.104, p.17358-17363, 2007.

GARG, A. Lipodystrofies: genetic and acquired body fat disorders. **J Clin Endocrinol Metab.**, v.96, p.3313-3325, 2011.

HAN, J.M.; JEONG, S.J.; PARK, M.C.; KIM, G.; KWON, N.H.; KIM, H.K.; HA, S.H.; RYU, S.H.; KIM, S. Leucyl-tRNA synthetase is an intracellular leucine sensor for the mTORC1-signaling pathway. **Cell.**, v.149, p.410-424, 2012.

HAQUE, W.A.; SHIMOMURA, I. MATSUZAWA, Y.; GARG, A. Serum adiponectin and leptin levels in patients with lipodystrophies. **J Clin Endocrinol Metab.**, v.87, p.2395, 2002.

HINAULT, C.; MOTHE-SATNEY, I.; GAUTIER, N.; LAWRENCE Jr, J.C.; VAN OBBERGHEN, E. Amino acids and leucine allow insulin activation of the PKB/mTOR pathway in normal adipocytes treated with wortmannin and in adipocytes from *db/db* mice. **FASEB J.**, v.18, p.1894-1896, 2004.

HINAULT, C.; MOTHE-SATNEY, I.; GAUTIER, N.; VAN OBBERGHEN, E. Amino acids require glucose to enhance, through phosphoinositide-dependent protein kinase 1, the insulin-activated protein kinase B cascade on insulin-resistant adipocytes. **Diabetologia**, v.49, p.1017-1026, 2006.

HUANG-DORAN, I.; SLEIGH, A.; ROCHFORD, J.J.; O'RAHILLY, S.; SAVAGE, D.B. **Lipodystrophy**: metabolic insights from a rare disorder. **J Endocrinol.**, v.207, p.245-255, 2010.

JENINGA, E.H.; KALKHOVEN, E. Central players in inherited lipodystrophies. **Trends Endocrinol Metab.**, v.21, p.581-588, 2010.

KELLY, T.; YANG, W.; CHEN, C.S.; REYNOLDS, K.; HE, J. Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. **Int J Obes (Lond)**, v.32, p.1431-1437, 2008.

KIM, J.E.; CHEN, J. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity by mammalian target of rapamycin and amino acids in adipogenesis. **Diabetes**, v.53, p.2748-2756, 2004.

KOCH, C.; GÖDDEKE, S.; KRÜGER, M.; TUPS, A. Effect of central and peripheral leucine on energy metabolism in the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*). **J Comp Physiol B.**, v.183, p.261-268, 2013.

KOH, Y.K.; LEE, M.Y.; KIM, J.W.; KIM, M.; MOON, J.S.; LEE, Y.J.; AHN, Y.H.; KIM, K.S. Lipin1 is a key factor for a maturation and maintenance of adipocytes in the regulatory network with CCAAT/enhancer-binding protein alpha and peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2. **J Biol Chem.**, v.283, p.34896-34906, 2008.

LAPLANTE, M.; SABATINI, D.M. An emerging role of mTOR in lipid biosynthesis. **Curr Biol.**, v.19, p.R1046-R1052, 2009.

LI, H.; XU, M.; LEE, J.; HE, C.; XIE, Z. Leucine supplementation increases SIRT1 expression and prevents mitochondrial dysfunction and metabolic disorders in high fat diet-induced obese mice. **Am J Physiol Endocrinol metab.** v.303, p.E1234-E1244, 2012.

LYNCH, C.J.; PATSON, B.J.; ANTHONY, J.; VAVAL, A.; JEFFERSON, L.S.; VARY, T.C. Leucine is a direct-acting nutrient signal that regulates protein synthesis in adipose tissue. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, v.283, p.E503-513, 2002.

LYNCH, C.J.; GERN, B.; LLOYD, C.; HUTSON, S.M.; EICHER, R.; VARY, T.C. Leucine in food mediates some of the postprandial rise in plasma leptin concentrations. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, v.291, p.E621-630, 2006.

MACOTELO, Y.; EMANUELLI, B.; BÃNG, A.M.; ESPINOZA, D.O.; BOUCHER, J.; BEEBE, K.; GALL, W.; KAHN, C.R. Dietary leucine—An environmental modifier of insulin resistance acting on multiple levels of metabolism. **PLoS One**, v.6, p.e21187, 2011.

MANDERS, R.J.; LITTLE, J.P.; FORBES, S.C.; CANDOW, D.G. Insulinotropic and muscle protein synthetic effects of branched-chain amino acids: potential therapy for type 2 diabetes and sarcopenia. **Nutrients.**, v.8; p.1664-1678, 2012.

MAO, X.; ZENG, X.; HUANG, Z.; WANG, J.; QIAO, S. Leptin and leucine synergistically regulate protein metabolism in C2C12 myotubes and mouse skeletal muscles. **Br J Nutr.** v.110, p.256-264, 2013.

MARALDI, N.M.; CAPANNI, C.; COLUMBARO, M.; SQUARZONI, S.; PARNAIK, W.K.; WEHNERT, M.; LATTANZI, G. A pathogenic mechanism leading to partial lipodystrophy and prospects for pharmacological treatment of insulin resistance syndrome. **Acta Biomed.**, v.78, suppl.1, p.207-215, 2007.

MATSUZAKI, K.; KATO, H.; SAKAI, R.; TOUE, S.; AMAO, M.; KIMURA, T. Transcriptomics and metabolomics of dietary leucine excess. **J Nutr.**, v.135, p.1571S-1575S, 2005.

MELNIK, B.C. leucine signaling in the pathogenesis of type 2 diabetes and obesity. **World J Diabetes**, v.3, p.38-53, 2012.

MINEMURA, T.; LACY, W.W.; CROFFORD, O.B. Regulation of the transport and metabolism of amino acids in isolated fat cells. Effect of insulin and a possible role for adenosine 3',5'-monophosphate. **J Biol Chem.**, v.245, p.3872-3881, 1970.

MINISTÉRIO DA SAÚDE/SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE/SECRETARIA DE GESTÃO ESTRATÉGICA E PARTICIPATIVA. **Vigitel Brasil 2011: Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico.** Brasília: Ministério da Saúde, 2012.

NAIRIZI, A.; SHE, P.; VARY, T. C.; LYNCH, C. J. Leucine supplementation of drinking Water does not alter susceptibility to diet-induced obesity in mice. **J Nutr.**, v.139, p.715-719, 2009.

NEWSHOLME, P.; BRENNAN, L.; RUBI, B.; MAECHLER, P. New insights into amino acid metabolism, beta-cell function and diabetes. **Clin Sci (Lond).**, v.108, p.185-1894, 2005.

NICKLIN, P.; BERGMAN, P.; ZHANG, B.; TRIANTAFELLOW, E.; WANG, H.; NYFELER, B.; YANG, H.; HILD, M.; KUNG, C.; WILSON, C.; MYER, V.E.; MACKEIGAN, J.P.; PORTER, J.A.; WANG, Y.K.; CANTLEY, L.C. FINAN, P.M.; MURPHY, L.O. Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. **Cell.**, v.136, p.521-534, 2009.

de OLIVEIRA, A.C.; ANDREOTTI, S.; FARIAS, TDA. S.; TORRES-LEAL, F.L.; de PROENÇA, A.R.; CAMPAÑA, A.B.; de SOUZA, A.H.; SERTIÉ, R.A.; CARPINELLI,

A.R.; CIPOLLA-NETO, J.; LIMA, F.B. Metabolic disorders and adipose tissue insulin responsiveness in neonatally STZ-induced diabetic rats are improved by long-term melatonin treatment. **Endocrinology**, v.153, p.2178-88, 2012.

OUCHI, N.; PARKER, J.L.; LUGUS, J.J.; WALSH, K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Nat Rev Immunol.**, v.11, p.85-97, 2011.

PARK, J.Y.; CHONG, A. Y.; COCHRAN, E. K.; KLEINER, D. E.; HALLER, M. J.; SCHATZ, D. A.; GORDEN, P. Type 1 Diabetes Associated with Acquired Generalized Lipodystrophy and Insulin Resistance: The Effect of Long-Term Leptin Therapy. **J Clin Endocrinol Metab.**, v.93, p.26–31, 2008.

PAYNE, V.A.; AU, W.S.; LOWE, C.E.; RAHMAN, S.M.; FRIEDMAN, J.E.; O'RAHILLY, S.; ROCHFORD, J.J. C/EBP transcription factors regulate SREBP1c gene expression during adipogenesis. **Biochem J.**, v.425, p. 215-223, 2009.

PETERSON, T.R.; SENGUPTA, S.S.; HARRIS, T.E.; CARMACK, A.E.; KANG, S.A.; BALDERAS, E.; GUERTIN, D.A.; MADDEN, K.L.; CARPENTER, A.E.; FINCK, B.N.; SABATINI, D.M. mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway. **Cell.**, v.146, p.408-420, 2011.

POLAK, P.; CYBULSKI, N.; FEIGE, J.N.; AUWERX, J.; RÜEGG, M.A.; HALL, M.N. Adipose-specific knockout of raptor results in lean mice with enhanced mitochondrial respiration. **Cell Metab.**, v.8, p.399–410, 2008.

PORSTMANN, T.; SANTOS, C.R.; GRIFFITHS, B.; CULLY, M.; WU, M.; LEEVERS, S.; GRIFFITHS, J.R.; CHUNG, Y.L.; SCHULZE, A. SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth. **Cell Metab**, v.8, p.1500-1507, 2008.

PORSTMANN, T.; SANTOS, C.R.; LEWIS, C.; GRIFFITHS, B.; SCHULZE, A. A new player in the orchestra of cell growth: SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to the regulation of cell and organ size. **Biochem Soc Trans.**, v.37, p.278-283, 2009.

REEVES, P.G.; ROSSOW, K.L.; LINDLAUF, J. Development and testing of the AIN-93 purified diets for rodents: results on growth, kidney calcification and bone mineralization in rats and mice. **J Nutr.**, v.123, p.1923-1931, 1993.

RICOULT, S.J.H.; MANNING, B. The multifaceted role of mTORC1 in the control of lipid metabolism. **EMBO Rep.**, v. 14, p. 242-251, 2013.

ROH, C.; HAN, J.; TZATSOS, A.; KANDROR, K.V. Nutrient-sensing mTOR-mediated pathway regulates leptin production in isolated rat adipocytes. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, v.284, p.E322-E330, 2003.

ROPELLE, E.R.; PAULI, J.R.; FERNANDES, M.F.A.; ROCCO, S.A.; MARIN, R.M.; MORARI, J.; SOUZA, K.K.; DIAS, M.M.; GOMES-MARCONDES, M.C.; GONTIJO, J.A.; FRANCHINI, K.G.; VELLOSO, L.A.; SAAD, M.J.; CARVALHEIRA, J.B. A central role for neuronal amp-activated protein kinase (AMPK) and mammalian target of rapamycin (mTOR) in high-protein diet-induced weight loss. **Diabetes**, v.57, p. 594-605, 2008.



ROSEN, E.D.; HSU, C.H.; WANG, X.; SAKAI, S.; FREEMAN, M.W.; GONZALEZ, F.J.; SPIEGELMAN, B.M. C/EBP $\alpha$  induces adipogenesis through PPAR $\gamma$ : a unified pathway. **Genes Dev.**, v.16, p.22-26, 2002.

SANCAK, Y.; BAR-PELED, L.; ZONCU, R.; MARKHARD, A.L.; NADA, S.; SABATINI, D.M. Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. **Cell.**, v.141, p.290-303, 2010.

SEMPLE, R.K.; SLEIGH, A.; MURGATROYD, P.R.; ADAMS, C.A.; BLUCK, L.; JACKSON, S.; VOTTERO, A.; KANABAR, D.; CHARLTON-MENYS, V.; DURRINGTON, P.; SOOS, M.A.; CARPENTER, T.A.; LOMAS, D.J.; COCHRAN, E.K.; GORDEN, P.; O'RAHILLY, S.; SAVAGE, D.B. Postreceptor insulin resistance contributes to human dyslipidemia and hepatic steatosis. **J Clin Invest.**, v.119, p.315-322, 2009.

TAKADA, J.; MACHADO, M.A.; PERES, S.B.; BRITO, L.C.; BORGES-SILVA, C.N.; COSTA, C.E.; FONSECA-ALANIZ, M.H.; ANDREOTTI, S.; LIMA, F.B. Neonatal streptozotocin-induced diabetes mellitus: a model of insulin resistance associated with loss of adipose mass. **Metabolism.**, v.56, p.977-84, 2007.

TAKADA, J.; FONSECA-ALANIZ, M.H.; DE CAMPOS, T.B.; ANDREOTTI, S.; CAMPANA, A.B.; OKAMOTO, M.; BORGES-SILVA, C.D.; MACHADO, U.F.; LIMA, F.B. Metabolic recovery of adipose tissue is associated with improvement in insulin resistance in a model of experimental diabetes. **J Endocrinol.** v.198, p.51-60, 2008.

TORRES-LEAL, F.L.; FONSECA-ALANIZ, M.H.; ROGERO, M.M.; TIRAPEGUI, J. The role of inflamed adipose tissue in the insulin resistance. **Cell Biochem Funct.**, v.28, p.623-631, 2010.

TORRES-LEAL, F.L.; FONSECA-ALANIZ, M.H.; TEODORO, G.F.R.; CAPITANI, M.D.; VIANNA, D.; PANTALEÃO, L.C.; MATOS-NETO, E.M.; ROGERO, M.M.; DONATO Jr, J.; TIRAPEGUI, J. Leucine supplementation improves adiponectin and total cholesterol concentrations despite the lack of changes in adiposity or glucose homeostasis in rats previously exposed to a high-fat diet. **Nutr Metab. (Lond)**, v.8, p.62-72, 2011.

TORRES-LEAL, F.L. Leucina intensifica o ganho de adiposidade e as repostas metabólicas do tecido adiposo em ratos previamente obesos por dieta hiperlipídica e a gordura subcutânea é uma das mais afetadas. [Tese (Doutorado em Fisiologia Humana)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

TSUBUKU, S.; HATAYAMA, K.; KATSUMATA, T.; NISHIMURA, N.; MAWATARI, K.; SMRIGA, M.; KIMURA, T. Thirteen-week oral toxicity study of branched-chain amino acids in rats. **Int J Toxicol**, v.23, p.119-126, 2004.

UM, S.H.; FRIGERIO, F.; WATANABE, M.; PICARD, F.; JOAQUIN, M.; STICKER, M.; FUMAGALLI, S.; ALLEGRINI, P.R.; KOZMA, S.C.; AUWERX, J.; THOMAS, G. Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. **Nature.**, v.431, p.200-205, 2004.

VIGOUROUX, C.; CARON-DEBARLE, M.; LE DOUR, C.; MAGRÉ, J.; CAPEAU, J. Molecular mechanisms of human lipodystrophies: from adipocyte lipid droplet to oxidative stress and lipotoxicity. **Int J Biochem Cell Biol.**, v.43, p.862-876, 2011.

VIRTUE, S.; VIDAL-PUIG, A. Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome--an allostatic perspective. **Biochim Biophys Acta.**, v.1801, p.338-349, 2010.

ZAMPIERI, T.T.; PEDROSO, J.A.B.; FURIGO, I.C.; TIRAPEGUI, J.; DONATO, J., JR. Oral leucine supplementation is sensed by the brain but neither reduces food intake nor induces an anorectic pattern of gene expression in the hypothalamus. **PLoS One**, v.8, p.e84094, 2013.

ZAMPIERI, T.T.; TORRES-LEAL, F.L.; CAMPAÑA, A.B.; LIMA, F.B.; C L-leucine supplementation worsens the adiposity of already obese rats by promoting a hypothalamic pattern of gene expression that favors fat accumulation. **Nutrients.**, v.6, p.1364-1373, 2014.

ZHANG, Y.; PROENCA, R.; MAFFEI, M.; BARONE, M.; LEOPOLD, L.; FRIEDMAN, J.M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature.**, v.372, p.425-432, 1994.

ZHANG, Y.; GUO, K.; LEBLANC, R.E.; LOH, D.; SCHWARTZ, G.J.; YU, Y.H. Increasing dietary leucine intake reduces diet-induced obesity and improves glucose and cholesterol metabolism in mice via multimechanisms. **Diabetes**, v.56, p.1647-1654, 2007.

ZHANG, H.H.; HUANG, J.; DÜVEL, K.; BOBACK, B.; WU, S.; SQUILLACE, R.M.; WU, C.L.; MANNING, B.D. Insulin stimulates adipogenesis through the Akt-TSC2-mTORC1 pathway. **PLoS One**, v.4, p.e6189, 2009.

ZEANANDIN, G.; BALAGE, M.; SCHNEIDER, S.M.; DUPONT, J.; HEBUTERNE, X.; MOTHE-SATNEY, I.; DARDEVET, D. Differential effect of long-term leucine supplementation on skeletal muscle and adipose tissue in old rats: an insulin signaling pathway approach. **Age.**, v.34, p.371-387, 2012.

ZECHNER, R.; KIENESBERGER, P.C.; HAEMMERIE, G.; ZIMMERMANN, R.; LASS, A. Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores. **J Lipid Res.**, v.50, p.3-21, 2009.

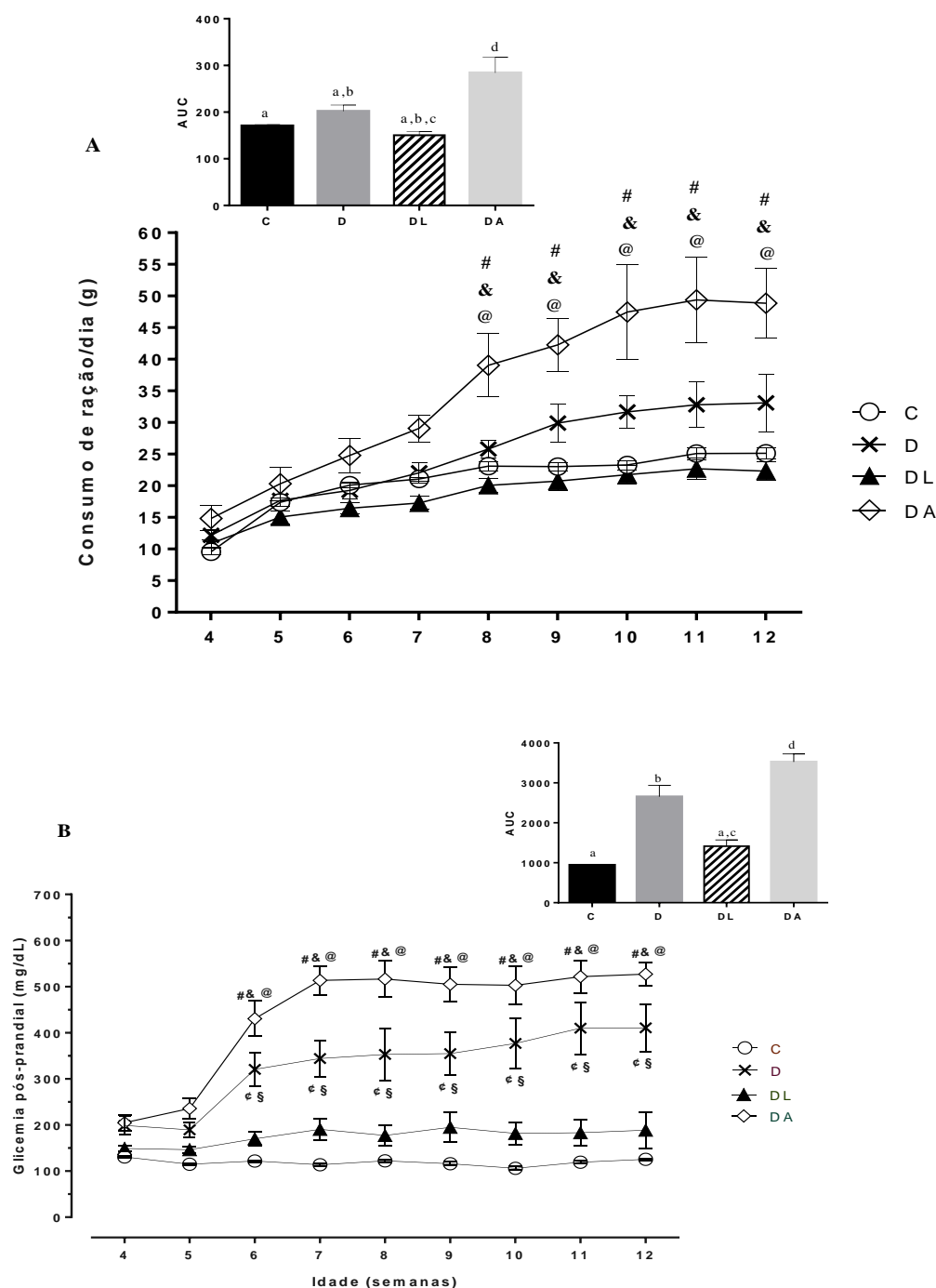
WHITE, U.A.; STEPHENS, J.M. Transcriptional factors that promote formation of white adipose tissue. **Mol Cell Endocrinol.**, v.318, n.1-2, p.10-14, 2010.

WU, G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. **Amino Acids**, v.37, n.1, p.1-17, 2009.

WU, J.; BOSTRÖM, P.; SPARKS, L.M.; YE, L.; CHOI, J.H.; GIANG, A.H.; KHANDEKAR, M.; VIRTANEN, K.A.; NUUTILA, P.; SCHAART, G.; HUANG, K.; TU, H.; VAN MARKEN LICHTENBELT, W.D.; HOEKS, J.; ENERBÄCK, S.; SCHRAUWEN, P.; SPIEGELMAN, B.M. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. **Cell.**, v.150, p.366-376, 2012.

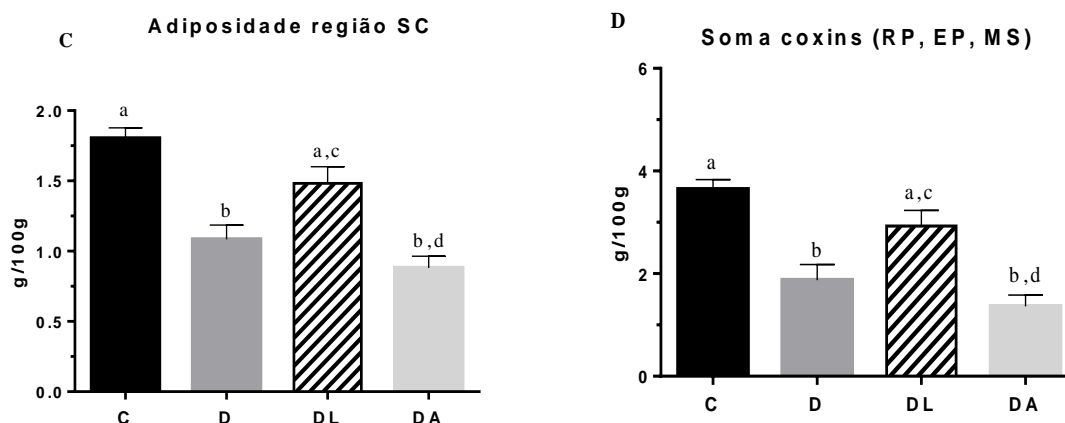
# ANEXOS

## ANEXO 1: RESULTADOS SUPLEMENTARES



**Figura 15.** Evolução de variáveis clínicas entre os grupos experimentais. **A)** Quantidade diária de ração consumida; **B)** Glicemia pós-prandial; **C)** Peso relativo do coxim subcutâneo; **D)** Peso relativo dos coxins viscerais. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão (n = 8-11), # p < 0,0001 vs. o grupo C; & p < 0,05 vs. o grupo D; @ p < 0,0001 vs. o grupo DL; ¢ p < 0,0001 vs. C; § p < 0,001 vs. DL.

**AUC, Figuras C e D:** Sem diferença estatística, se houver pelo menos uma letra em comum entre os grupos (p > 0,05).



**Figura 15** (cont.). Evolução de variáveis clínicas entre os grupos experimentais. **A)** Quantidade diária de ração consumida; **B)** Glicemia pós-prandial; **C)** Peso relativo do coxim subcutâneo; **D)** Peso relativo dos coxins viscerais. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão ( $n = 8-11$ ), #  $p < 0,0001$  vs. o grupo C; &  $p < 0,05$  vs. o grupo D; @  $p < 0,0001$  vs. o grupo DL; ¢  $p < 0,0001$  vs. C; §  $p < 0,001$  vs. DL.

**AUC, Figuras C e D:** Sem diferença estatística, se houver pelo menos uma letra em comum entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

A partir da 8ª semana de vida até o final do experimento, a polifagia foi muito mais acentuada nos animais do grupo DA comparado com o grupo D ( $p < 0,01$ ). Neste período, a quantidade de ração consumida foi 1,48 vezes maior nos animais diabéticos suplementados com aminoácidos não essenciais ( $45,40 \pm 2,028$  g/dia) em relação àquela ingerida pelos ratos diabéticos que consumiram ração controle ( $30,66 \pm 1,334$  g/dia) ( $p < 0,001$ ).

A figura 12B mostra que a glicemia pós-prandial dos animais do grupo DA permaneceu acima de 400 mg/dL desde a 6ª semana de vida, e foi estatisticamente diferente comparada com a do grupo D ( $p < 0,05$ ). Isto significa dizer que a ração AANE piorou a polifagia e a hiperglicemia crônica em animais diabéticos. Além disso, é possível observar que, apesar da elevada quantidade de ração diária consumida, os animais que consumiram a ração AANE apresentaram o menor peso relativo dos coxins subcutâneo e viscerais entre todos os grupos experimentais (Figuras 12C e 12 D).

**ANEXO 2: FICHA DO ALUNO**

28/09/2016

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

**FICHA DO ALUNO**

9132 - 8319625/1 - Vanessa Batista de Sousa Lima

**Email:** vanessal@usp.br  
**Data de Nascimento:** 20/10/1988  
**Cédula de Identidade:** RG - 2.294.447 - PI  
**Local de Nascimento:** Estado do Piauí  
**Nacionalidade:** Brasileira  
**Graduação:** Nutricionista - Universidade Federal do Piauí - Piauí - Brasil - 2009  
**Mestrado:** Mestre em Alimentos e Nutrição (1) - Universidade Federal do Piauí - Piauí - Brasil - 2011

**Curso:** Doutorado  
**Programa:** Ciência dos Alimentos  
**Área:** Nutrição Experimental  
**Data de Matrícula:** 01/10/2012  
**Início da Contagem de Prazo:** 01/10/2012  
**Data Limite para o Depósito:** 03/10/2016  
**Orientador:** Prof(a). Dr(a). Julio Orlando Tirapegui Toledo - 01/10/2012 até o presente. Email: tirapegu@usp.br  
**Proficiência em Línguas:** Inglês, Aprovado em 01/10/2012  
**Data de Aprovação no Exame de Qualificação:** Aprovado em 10/12/2014  
**Data do Depósito do Trabalho:**  
**Título do Trabalho:**  
**Data Máxima para Aprovação da Banca:**  
**Data de Aprovação da Banca:**  
**Data Máxima para Defesa:**  
**Data da Defesa:**  
**Resultado da Defesa:**  
**Histórico de Ocorrências:** Primeira Matrícula em 01/10/2012

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 18/07/2016

Impresso em: 28/09/2016 17:47:52

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

9132 - 8319625/1 - Vanessa Batista de Sousa Lima

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
BMB5804-2/5	O Órgão Adiposo como Centro Regulador do Metabolismo (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	22/10/2012	03/12/2012	60	4	90	A	N	Concluída
FBA5729-4/1	Nutrição e Metabolismo na Atividade Física	04/03/2013	07/04/2013	75	5	100	A	N	Concluída
FBA5728-3/7	Aprimoramento Didático	19/03/2013	15/04/2013	60	4	87	A	N	Concluída
HNT5759-2/1	Nutrigenômica no Contexto das Doenças Crônicas não Transmissíveis (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	16/05/2013	21/06/2013	60	4	94	A	N	Concluída
EFE5746-3/3	Adaptações Neuromusculares ao Treinamento de Força (Escola de Educação Física e Esporte - Universidade de São Paulo)	08/04/2014	17/06/2014	90	6	100	B	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	23
Estágios:			
<b>Total:</b>	<b>0</b>	<b>20</b>	<b>23</b>

Créditos Atribuídos à Tese: 167

**Observações:**

1) Curso com validade nacional, de acordo com o disposto na Portaria nº 590, de 18.06.2009..

**Conceito a partir de 02/01/1997:**

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 18/07/2016

Impresso em: 28/09/2016 17:47:52

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9132 - 8319625/1 - Vanessa Batista de Sousa Lima

Comissão julgadora da tese de doutorado:			
NUSP	Nome	Vínculo	Função
81078	Julio Orlando Tirapegui Toledo	FCF - USP	Presidente

**ANEXO 3: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS****UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO****FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA**

Ofício CEUA/FCF/89/2012

**CERTIFICADO**


A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo Certifica que o Projeto "Efeito da suplementação com leucina associada ao treinamento físico sobre a adiposidade e funcionalidade do tecido adiposo branco em modelo experimental de diabetes" (Protocolo CEUA/FCF/380), de responsabilidade do Prof. Dr. Júlio Orlando Tirapegui Toledo, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA e foi APROVADO em reunião de 10 de setembro de 2012.


São Paulo, 10 de setembro de 2012.








Prof. Dr. Jolison de Oliveira Martins  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA/FCF/USP



## ANEXO 4: CURRÍCULO LATTES DO ALUNO







---


Dados gerais
Formação
Atuação
Projetos
Produções
Educação e Popularização de C & T
Eventos
+



### Vanessa Batista de Sousa Lima

Bolsista de Doutorado do CNPq

 Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/7082147164237378>

 Última atualização do currículo em 28/09/2016

---

Possui graduação em Nutrição pela Universidade Federal do Piauí (2008). É Mestre em Alimentos e Nutrição pela Universidade Federal do Piauí (2011). Atualmente é doutoranda em Ciências dos Alimentos pela Universidade de São Paulo. Tem experiência na área de Nutrição Experimental, Bioquímica da Nutrição e Nutrição e Exercício Físico. **(Texto informado pelo autor)**

---

#### Identificação

---

**Nome**

Vanessa Batista de Sousa Lima

**Nome em citações bibliográficas**

LIMA, V. B. S.; Sousa Lima, Vanessa Batista; V. B. de Sousa Lima

---

**Endereço**

---


**Formação acadêmica/titulação**

---

**2012**

Doutorado em andamento em Ciências dos Alimentos (Conceito CAPES 7).  
 Universidade de São Paulo, USP, Brasil.  
 Orientador: Prof Dr Julio Orlando Tirapegui Toledo.

**2009 - 2011**

Mestrado em Alimentos e Nutrição. Conceito CAPES: 3..  
 Universidade Federal do Piauí, UFPI, Brasil.  
 Título: Estado Nutricional Relativo ao Zinco e sua Relação com o Estresse Oxidativo em Pacientes Diabéticos Tipo 2, Ano de Obtenção: 2011.  
 Orientador:  Prof Drª Dílina do Nascimento Marreiro.  
 Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Piauí, FAPEPI, Brasil.  
 Palavras-chave: Diabetes Mellitus Tipo 2; Hiperglicemia; zinco; Superóxido dismutase.  
 Grande área: Ciências da Saúde

**2015**

Especialização em andamento em Nutrição Aplicada ao Exercício Físico.  
 Escola de Educação Física e Esporte, EEFÉ - USP, Brasil.

**2004 - 2008**

Graduação em Nutrição.  
 Universidade Federal do Piauí, UFPI, Brasil.

---

**Formação Complementar**

---

**2008 - 2008**

Extensão universitária em Monitoria em Nutrição Materno-infantil. (Carga horária: 192h).  
 Universidade Federal do Piauí, UFPI, Brasil.

**2008 - 2008**

Extensão universitária em inglês instrumental.  
 Universidade Federal do Piauí, UFPI, Brasil.

**2008 - 2008**

Extensão universitária em Nutrição Esportiva. (Carga horária: 40h).  
Universidade Federal do Piauí, UFPI, Brasil.

**2008 - 2008**

Extensão universitária em Consulta de Nutrição a gestantes e bebês. (Carga horária: 252h).  
Universidade Federal do Piauí, UFPI, Brasil.

**2007 - 2008**

iniciação científica.  
Universidade Federal do Piauí, UFPI, Brasil.

**2007 - 2007**

Extensão universitária em Monitoria em Dietoterapia I. (Carga horária: 192h).  
Universidade Federal do Piauí, UFPI, Brasil.

**2007 - 2007**

Extensão universitária em Monitoria em Nutrição e Dietética II. (Carga horária: 192h).  
Universidade Federal do Piauí, UFPI, Brasil.

**2006 - 2006**

Extensão universitária em Monitoria em Técnica Dietética. (Carga horária: 192h).  
Universidade Federal do Piauí, UFPI, Brasil.

**2005 - 2005**

Extensão universitária em Monitoria em Fisiologia para Nutrição. (Carga horária: 192h).  
Universidade Federal do Piauí, UFPI, Brasil.

## Atuação Profissional

**Universidade Federal do Piauí, UFPI, Brasil.**

### Vínculo institucional

**2009 - 2011**

Vínculo: Estudante, Enquadramento Funcional: Mestranda em Alimentos e Nutrição, Regime: Dedicção exclusiva.

### Vínculo institucional

**2007 - 2009**

Vínculo: Aluno de Iniciação Científica, Enquadramento Funcional: Bolsita PIBIC/CNPq e Bolsista PIBIC/UFPI, Regime: Dedicção exclusiva.

### Atividades

**09/2009 - Atual**

Estágios , Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Nutrição.

#### Estágio realizado

Estágio à Docência na disciplina Nutrição e Atividade Física. Convidada a ministrar aulas nas disciplinas Dietoterapia I e Nutrição e Dietética no Ciclo de Vida II do curso Nutrição da Universidade Federal do Piauí..

**10/2010 - 12/2010**

Ensino, Nutrição, Nível: Graduação

Disciplinas ministradas

Mestranda convidada a ministrar a disciplina Trabalho de Conclusão de Curso I do curso de Nutrição da Universidade Federal do Piauí.

**04/2009 - 04/2010**

Conselhos, Comissões e Consultoria, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Nutrição.

Cargo ou função

Representante Discente do Colegiado do Programa de Pós-graduação (Mestrado) em Alimentos e Nutrição..

**Universidade de São Paulo, USP, Brasil.**

**Vínculo institucional**

**2012 - Atual**

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Doutoranda em Ciências, Nutrição Experimental, Regime: Dedicção exclusiva.

**Atividades**

**08/2015 - 12/2015**

Estágios , Faculdade de Ciências Farmacêuticas ,

Estágio realizado

Programa de Aperfeiçoamento de Ensino - PAE em Nutrição e Atividade Física.

**Projetos de pesquisa**

**2010 - 2010**

Parâmetros Bioquímicos Relativo ao Zinco e Atividade da Enzima Superóxido Dismutase em Pacientes Diabéticos Tipo 2

Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Graduação: (1) / Mestrado acadêmico: (1) .

Integrantes: Vanessa Batista de Sousa Lima - Integrante / Dilina do Nascimento Marreiro - Coordenador.

**2007 - 2008**

Efeito do Exercício Físico sobre a Atividade da Enzima Superóxido Dismutase como Biomarcador do Estresse Oxidativo em Judocas Adolescentes.

Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Graduação: (1) / Mestrado acadêmico: (1) .

Integrantes: Vanessa Batista de Sousa Lima - Integrante / Dilina do Nascimento Marreiro - Coordenador.

**Áreas de atuação**

1.

Grande área: Ciências da Saúde / Área: Nutrição / Subárea: Nutrição Experimental.

2.

Grande área: Ciências da Saúde / Área: Nutrição / Subárea: Bioquímica da Nutrição.

3.

Grande área: Ciências da Saúde / Área: Nutrição / Subárea: Nutrição e Saúde.

4.

Grande área: Ciências da Saúde / Área: Nutrição / Subárea: NUTRIÇÃO ESPORTIVA.

## Idiomas

### Inglês

Compreende BemLê Bem, Escreve Razoavelmente.

### Espanhol

Compreende BemLê Bem, Escreve Pouco.

## Prêmios e títulos

### 2008

Melhor trabalho científico apresentado na forma oral no II Congresso Piauiense em Alimentos e Nutrição: Alimentos funcionais, compostos bioativos e doenças crônicas, Departamento de Nutrição, Universidade Federal do Piauí.

## Produções

### Produção bibliográfica

### Artigos completos publicados em periódicos

Ordenar por

Ordem Cronológica ▼

1.

**LIMA, V. B. S.**; BRITO, A. K. S.; MORAIS, J. B. S.; SEVERO, J. S.; FREITAS, T. E. C.; ARAUJO, C. G. B.; MARREIRO, D. N. . Participação do Estresse Oxidativo sobre o Metabolismo do Zinco e da Enzima Superóxido Dismutase no Diabetes Mellitus Tipo 2. *Nutrição em Pauta*, v. 23, p. 5-9, 2015.

2.

SILVA, M. M.; **LIMA, V. B. S.**; CAVALCANTE, N. A. A.; COELHO, D. B.; GARCIA, E. S.; SILVA, A. M. O. E.; CRUZ, K. J. C.; NOGUEIRA, N. N.; MARREIRO, D. N. . Biochemical Parameters of Zinc and Markers of Oxidative Stress in Soccer Players. *Revista Brasileira de Ciência e Movimento*, v. 22, p. 45-50, 2014.

3.

**LIMA, V. B. S.**; **LIMA, V. B. S.**; CARVALHO FILHO, F. C.; REGO, J. G. S.; MURATORI, M.C.S. . Pesquisa de coliformes, escherichia coli e bactérias hetetróficas em água mineral. *Higiene Alimentar*, v. 77, p. 97-101, 2013.

4.

Mesquita L. S. A.; **LIMA, V. B. S.**; J M Moita Neto ; Cozzolino, SMF; MARREIRO, D. N. . Biochemical Parameters of Zinc and Activity of Superoxide Dismutase and Glutathione Peroxidase Enzymes in Athletes. *Gazzetta Medica Italiana. Archivio per le Scienze Mediche (Testo stampato)*, v. 171, p. 703-712, 2012.

5.

Feitosa, Maura Cristina Porto ; LIMA, Vanessa Batista de Sousa ; Nascimento Marreiro, Dilina . Participação da Inflamação sobre o Metabolismo do Zinco na Obesidade. *Nutrire (São Paulo)*, v. 37, p. 93-104, 2012.

6.

**doi:** F. Ennes Dourado Ferro ; **V. B. de Sousa Lima** ; N. R. Mello Soares ; S. M. Franciscato Cozzolino ; D. do Nascimento Marreiro . Biomarkers of metabolic syndrome and its relationship with the zinc nutritional status in obese women. *Nutrición Hospitalaria JCR*, v. 26, p. 650-654, 2011.

Citações: **WEB OF SCIENCE** 8 | **SCOPUS** 11

7.

LIMA, Vanessa Batista de Sousa; Sampaio, Fabiane de Araújo; Bezerra, Daíla Leite Chaves; J M Moita Neto; Nascimento Marreiro, Dilina . Parameters of glycemic control and its relationship with the zincemia and the activity of the superoxide dismutase enzyme in type 2 diabetic patients. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia (Impresso) JCR*, v. 55, p. 701-707, 2011.

Citações: **WEB OF SCIENCE** 4 | **SCOPUS** 3

8.

**doi:** Ferro, Flávia Ennes Dourado ; **Sousa Lima, Vanessa Batista** ; Soares, Nina Rosa Mello ; Sousa Almondes, Kaluce Gonçalves ; Pires, Líliane Viana ; Cozzolino, Sílvia Maria Franciscato ; Nascimento Marreiro, Dilina . Parameters of Metabolic Syndrome and Its Relationship with Zincemia and Activities of Superoxide Dismutase and Glutathione Peroxidase in Obese Women. *Biological Trace Element Research JCR*, v. 143, p. 787-793, 2011.

Citações: **WEB OF SCIENCE** 6 | **SCOPUS** 6

9

R C Noleto Magalhães ; C. Guedes Borges de Araujo ; **V. B. de Sousa Lima** ; J M Moita Neto ; N. do Nascimento Nogueira ; D. do Nascimento Marreiro . Nutritional status of zinc and activity superoxide dismutase in chronic renal patients undergoing hemodialysis. *Nutrición Hospitalaria JCR*, v. 26, p. 1471-1476, 2011.

Citações: **SCÖPUS** 6

10.

ANDRADE, L. S. ; **LIMA, V. B. S.** ; SOUSA, A. F. ; NOGUEIRA, N. N. ; MOURA FILHO, O. F. ; MARREIRO, D. N. . Nutritional status of zinc in adolescent judo athletes. *Fitness & Performance Journal (Impresso)*, v. 9, p. 77-84, 2010.

### Resumos expandidos publicados em anais de congressos

1.

**LIMA, V. B. S.** ; SOUSA, A. F. ; NOGUEIRA, N. N. ; MARREIRO, D. N. . Efeito do Exercício Físico Sobre a Atividade da Enzima Superóxido Dismutase como Biomarcador do Estresse Oxidativo em Judocas Adolescentes.. In: III Congresso de Ciência, Tecnologia e Inovação e XVII Seminário de Iniciação Científica da UFPI, 2008, Teresina. III Congresso de Ciência, Tecnologia e Inovação e XVII Seminário de Iniciação Científica da UFPI, 2008.

### Resumos publicados em anais de congressos

1.

LIMA, Vanessa Batista de Sousa; Silva, Moisés Mendes da ; Cavalcante, Nara Adília Andrade ; Silva, Danilla Michele Costa ; Almondes, Kaluce Gonçalves de Sousa ; MEDEIROS, L. G. O. ; Cozzolino, Sílvia Maria Franciscato ; NOGUEIRA, N. N. ; Nascimento Marreiro, Dílina . Parâmetros Bioquímicos Relativos ao Zinco em Jogadores de Futebol. In: (Nutrire) Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição: Trabalhos científicos do 11º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição - SBAN, 2011, Fortaleza. Anais do 11º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição - SBAN, 2011. v. 36.

2.

LIMA, Vanessa Batista de Sousa; Ferro, Flávia Ennes Dourado ; Soares, Nina Rosa Mello ; Almondes, Kaluce Gonçalves de Sousa ; Cozzolino, Sílvia Maria Franciscato ; NOGUEIRA, N. N. ; Nascimento Marreiro, Dílina . Componentes da Síndrome Metabólica e Sua Relação com a Zincemia e a Atividade das Enzimas Superóxido Dismutase e Glutaciona Peroxidase em Mulheres Obesas. In: 11º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição-SBAN, 2011, Fortaleza. (Nutrire) Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição: Trabalhos científicos do 11º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição-SBAN, 2011. v. 36.

3.

LIMA, Vanessa Batista de Sousa; Soares, Nina Rosa Mello ; Ferro, Flávia Ennes Dourado ; Oliveira, Ana Raquel Soares ; NOGUEIRA, N. N. ; Nascimento Marreiro, Dílina . Relação entre a Ingestão de Cálcio e Parâmetros Metabólicos em Mulheres Obesas. In: 11º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição - SBAN, 2011, Fortaleza. (Nutrire) Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição: Trabalhos científicos do 11º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição-SBAN, 2011. v. 36.

4.

FEITOSA, M. M. ; LIMA, Vanessa Batista de Sousa ; LUSTOSA, C. F. ; MATIAS, J. P. ; MEDEIROS, L. G. O. ; Sampaio, F. A ; LIMA, A. . Composição Centesimal, Fenólicos Totais e Capacidade Antioxidante em Amendoim (*Arachis hypogaea*). In: 11º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição - SBAN, 2011, Fortaleza. (Nutrire) Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição: Trabalhos científicos do 11º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição-SBAN, 2011. v. 36.

5.

Oliveira, Ana Raquel Soares ; Ferro, Flávia Ennes Dourado ; Oliveira, Francisco Erasmo ; Soares, Nina Rosa Mello ; LIMA, Vanessa Batista de Sousa ; Barbosa, Amanda Marreiro ; Beserra, Bruna Teles Soares ; Nascimento Marreiro, Dílina . Ingestão de Cálcio e sua Relação com Adiposidade em Mulheres Obesas. In: 11º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição - SBAN, 2011, Fortaleza. (Nutrire) Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição: Trabalhos científicos do 11º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição-SBAN, 2011. v. 36.

6.

Barbosa, Amanda Marreiro ; Beserra, Bruna Teles Soares ; Oliveira, Francisco Erasmo ; Ferro, Flávia Ennes Dourado ; Soares, Nina Rosa Mello ; Cozzolino, Sílvia Maria Franciscato ; LIMA, Vanessa Batista de Sousa ; NOGUEIRA, N. N. ; Nascimento Marreiro, Dílina . Marcadores da Síndrome Metabólica e Sua Relação com a Zincemia em Mulheres Obesas. In: 11º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição - SBAN, 2011, Fortaleza. (Nutrire) Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição: Trabalhos científicos do 11º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição-SBAN, 2011. v. 36.

7.

Beserra, Bruna Teles Soares ; Barbosa, Amanda Marreiro ; Ferro, Flávia Ennes Dourado ; Soares, Nina Rosa Mello ; Cozzolino, Sílvia Maria Franciscato ; LIMA, Vanessa Batista de Sousa ; NOGUEIRA, N. N. ; Nascimento Marreiro, Dílina . Parâmetros Bioquímicos do Zinco e Atividade das Enzimas Superóxido Dismutase e Glutaciona Peroxidase em Mulheres Obesas. In: 11º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição - SBAN, 2011, Fortaleza. (Nutrire) Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição: Trabalhos científicos do 11º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição-SBAN, 2011. v. 36.

8.

Araújo, Camila Guedes B ; Magalhães, Rosana Célia Noleto ; Reis, Marcela Aguiar ; LIMA, Vanessa Batista de Sousa ; NOGUEIRA, N. N. ; Nascimento Marreiro, Dílina . Parâmetros Bioquímicos do Zinco em Pacientes Renais Crônicos sob Hemodiálise. In: 11º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição - SBAN, 2011, Fortaleza. (Nutrire) Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição: Trabalhos científicos do 11º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição-SBAN, 2011. v. 36.

9.

Beserra, Bruna Teles Soares ; LIMA, E. V. ; Oliveira, Ana Raquel Soares ; Oliveira, Francisco Erasmo ; Barbosa, Amanda Marreiro ; LIMA, Vanessa Batista de Sousa ; Nascimento Marreiro, Dílina . Reação entre níveis séricos de vitamina D e resistência à insulina em pacientes diabéticos tipo 2. In: XVIII Congresso da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2011, Brasília - DF. Anais do XVIII Congresso da Sociedade Brasileira de Diabetes. In: Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia, 2011. v. supl 5. p. 5393.

10.

Beserra, Bruna Teles Soares ; LIMA, Vanessa Batista de Sousa ; Sampaio, Fabiane de Araújo ; Bezerra, Daila Leite Chaves ; NOGUEIRA, N. N. ; J M Moita Neto ; Nascimento Marreiro, Dilina . Estado Nutricional Relativo ao Zinco e a Atividade da Enzima Superóxido Dismutase em Pacientes Diabéticos Tipo 2. In: XVIII Congresso da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2011, Brasília - DF. Anais do XVIII Congresso da Sociedade Brasileira de Diabetes. In: Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia, 2011. v. supl 5. p. S291-S292.

11.

Beserra, Bruna Teles Soares ; Sampaio, Fabiane de Araújo ; Bezerra, Daila Leite Chaves ; Feitosa, M. M. ; LIMA, Vanessa Batista de Sousa ; J M Moita Neto ; Nascimento Marreiro, Dilina . Estado Nutricional Relativo ao Magnésio e sua Relação com a Resistência à Insulina em Pacientes Diabéticos Tipo 2. In: XVIII Congresso da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2011, Brasília - DF. Anais do XVIII Congresso da Sociedade Brasileira de Diabetes. In: Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia, 2011. v. supl 5. p. S386-S387.

12.

Sampaio, F. A ; Bezerra, D. L. C. ; LIMA, Vanessa Batista de Sousa ; Feitosa, M. M. ; Silva, J. M. C. L. ; Oliveira, Francisco Erasmo ; NOGUEIRA, N. N. ; Nascimento Marreiro, Dilina . Relação Entre o Magnésio Dietético e a Resistência à Insulina em Pacientes Diabéticos Tipo 2. In: 11º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição - SBAN, 2011, Fortaleza. (Nutrire) Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição: Trabalhos científicos do 11º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição-SBAN, 2011. v. 36.

13.

SOARES, N. R. M. ; LIMA, V. B. S. ; SOUSA, M. S. B. ; MARREIRO, D. N. . Concentrações Plasmáticas e Eritrocitárias de Zinco e Atividade das Enzimas Superóxido Dismutase e Glutathione peroxidase em Judocas Adolescentes. In: XVIII Congresso Brasileiro de Nutrição Parenteral e Enteral, VI Congresso Brasileiro de Nutrição Clínica e I Congresso Brasileiro de Gastroenterologia Hospitalar, 2009, Natal. Revista Brasileira de Nutrição Clínica: trabalhos científicos do XVIII Congresso Brasileiro de Nutrição Parenteral e Enteral, 2009. v. 24. p. 127-127.

14.

LIMA, V. B. S. ; MARREIRO, D. N. ; NOGUEIRA, N. N. ; SOARES, N. R. M. ; SOUSA, M. S. B. . Atividade da Enzima Superóxido Dismutase em Judocas Adolescentes Submetidos ao Treinamento Intenso. In: XVIII Seminário de Iniciação Científica da Universidade Federal do Piauí, 2009, Teresina. XVIII Seminário de Iniciação Científica da Universidade Federal do Piauí, 2009.

15.

LIMA, V. B. S. ; ANDRADE, L. S. ; Pires, Liliane Viana ; NOGUEIRA, N. N. ; MARREIRO, D. N. ; Cozzolino, SMF . Parâmetros Bioquímicos Relativo ao Zinco e Atividade das Enzimas Superóxido Dismutase e Glutathione Peroxidase em Judocas Adolescentes. In: 10º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição-SBAN Dos Genes à Coletividade, 2009, São Paulo. (Nutrire) Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição: Trabalhos científicos do 10º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição-SBAN Dos Genes à Coletividade, 2009. v. 34. p. 1-493.

16.

LIMA, V. B. S. ; BATISTA, P. C. ; ARAUJO, R. S. R. M. . ELABORAÇÃO DE SORVETE À BASE DE SOJA SABOR MANGA. In: II Congresso Piauiense de Alimentos e Nutrição, 2008, Teresina. II Congresso Piauiense de Alimentos e Nutrição, 2008.

17.

LIMA, V. B. S. ; SOUSA, A. F. ; ANDRADE, L. S. ; NOGUEIRA, N. N. ; MARREIRO, D. N. . EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE ZINCO EM JUDOCAS ADOLESCENTES. In: II Congresso Piauiense de Alimentos e Nutrição, 2008, Teresina. II Congresso Piauiense de Alimentos e Nutrição, 2008.

18.

LIMA, V. B. S. ; BATISTA, P. C. ; ARAUJO, R. S. R. M. . Formulação de sorvete à base de soja: avaliação de aceitabilidade e preferência. In: VIII Congresso Norte e Nordeste de Nutrição Parenteral e Enteral e VIII Congresso Norte e Nordeste de Nutrição Clínica, 2008, Fortaleza. VIII Congresso Norte e Nordeste de Nutrição Parenteral e Enteral e VIII Congresso Norte e Nordeste de Nutrição Clínica, 2008. p. 1-2.

19.

LIMA, V. B. S. ; TEMOTELO, T. L. ; COUTO, R. W. B. ; CUNHA, A. L. C. ; LIMA, T. B. C. ; LIMA, G. S. P. . CONSUMO ALIMENTAR DE GESTANTES ADOLESCENTES EM ASSISTÊNCIA NUTRICIONAL PRÉ-NATAL. In: I Congresso Piauiense de Educação em Atenção Primária à Saúde e III Ciclo de Estudos de Saúde Coletiva em Odontologia, 2008, Teresina. I Congresso Piauiense de Educação em Atenção Primária à Saúde e III Ciclo de Estudos de Saúde Coletiva em Odontologia, 2008.

20.

LIMA, V. B. S. ; TEMOTELO, T. L. ; COUTO, R. W. B. ; CUNHA, A. L. C. ; LIMA, T. B. C. ; LIMA, G. S. P. . PERFIL DE GESTANTES ADOLESCENTES ATENDIDAS NO INSTITUTO DE PERINATOLOGIA SOCIAL DA MATERNIDADE DONA EVANGELINA ROSA. In: I Congresso Piauiense de Educação em Atenção Primária à Saúde e III Ciclo de Estudos de Saúde Coletiva em Odontologia, 2008, Teresina. PERFIL DE GESTANTES ADOLESCENTES ATENDIDAS NO INSTITUTO DE PERINATOLOGIA SOCIAL DA MATERNIDADE DONA EVANGELINA ROSA, 2008.

## Apresentações de Trabalho

1.

★ LIMA, Vanessa Batista de Sousa. Dietas 'low carb' na performance física. 2016. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

2.

LIMA, Vanessa Batista de Sousa. Dietas Low Carb no desempenho esportivo. 2016. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

3.

LIMA, Vanessa Batista de Sousa. Alimentação e Exercício Físico. 2016. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

4.

★ LIMA, Vanessa Batista de Sousa. Alimentação Saudável nas Escolas. 2014. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

5.

LIMA, Vanessa Batista de Sousa. Recomendações Nutricionais no exercício físico. 2014. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

6.

LIMA, Vanessa Batista de Sousa. Hidratação no Esporte. 2014. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

7.

LIMA, Vanessa Batista de Sousa. Nutrição no Exercício Físico. 2012. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

8.

Feitosa, M. M.; LIMA, V. B. S.; LUSTOSA, C. F.; MATIAS, J. P.; MEDEIROS, L. G. O.; Sampaio, F. A.; LIMA, A. . Composição Centesimal, Fenólicos Totais e Capacidade Antioxidante em Amendoim (*Arachis hypogaea*). 2011. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

9.

Beserra, Bruna Teles Soares ; Barbosa, Amanda Marreiro ; Ferro, Flávia Ennes Dourado ; Soares, Nina Rosa Mello ; Cozzolino, Sílvia Maria Franciscato ; LIMA, Vanessa Batista de Sousa ; NOGUEIRA, N. N. ; Nascimento Marreiro, Dilina . Parâmetros Bioquímicos do Zinco e Atividade das Enzimas Superóxido Dismutase e Glutaciona Peroxidase em Mulheres Obesas. 2011. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

10.

Oliveira, Ana Raquel Soares ; Ferro, Flávia Ennes Dourado ; Oliveira, Francisco Erasmo ; Soares, Nina Rosa Mello ; LIMA, Vanessa Batista de Sousa ; Barbosa, Amanda Marreiro ; Beserra, Bruna Teles Soares ; Nascimento Marreiro, Dilina . Ingestão de Cálcio e sua Relação com Adiposidade em Mulheres Obesas. 2011. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

11.

Barbosa, Amanda Marreiro ; Beserra, Bruna Teles Soares ; Oliveira, Francisco Erasmo ; Ferro, Flávia Ennes Dourado ; Soares, Nina Rosa Mello ; Cozzolino, Sílvia Maria Franciscato ; LIMA, Vanessa Batista de Sousa ; NOGUEIRA, N. N. ; Nascimento Marreiro, Dilina . Marcadores da Síndrome Metabólica e Sua Relação com a Zincemia em Mulheres Obesas. 2011. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

12.

Sampaio, F. A ; Bezerra, D. L. C. ; LIMA, V. B. S. ; Feitosa, M. M. ; Silva, J. M. C. L. ; OLIVEIRA, F. E. ; NOGUEIRA, N. N. ; MARREIRO, D. N. . Relação Entre o Magnésio Dietético e a Resistência à Insulina em Pacientes Diabéticos Tipo 2. 2011. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

13.

LIMA, Vanessa Batista de Sousa; Soares, Nina Rosa Mello ; Ferro, Flávia Ennes Dourado ; Oliveira, Ana Raquel Soares ; NOGUEIRA, N. N. ; Nascimento Marreiro, Dilina . Relação entre a Ingestão de Cálcio e Parâmetros Metabólicos em Mulheres Obesas. 2011. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

14.

LIMA, Vanessa Batista de Sousa; Silva, Moisés Mendes da ; Cavalcante, Nara Adília Andrade ; Silva, Daniella Michele Costa ; Almondes, Kaluce Gonçalves de Sousa ; MEDEIROS, L. G. O. ; Cozzolino, Sílvia Maria Franciscato ; NOGUEIRA, N. N. ; Nascimento Marreiro, Dilina . Parâmetros Bioquímicos Relativos ao Zinco em Jogadores de Futebol. 2011. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

15.

LIMA, Vanessa Batista de Sousa; Ferro, Flávia Ennes Dourado ; Soares, Nina Rosa Mello ; Almondes, Kaluce Gonçalves de Sousa ; Cozzolino, Sílvia Maria Franciscato ; NOGUEIRA, N. N. ; Nascimento Marreiro, Dilina . Componentes da Síndrome Metabólica e Sua Relação com a Zincemia e a Atividade das Enzimas Superóxido Dismutase e Glutaciona Peroxidase em Mulheres Obesas. 2011. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

16.

Araújo, Camila Guedes B ; Magalhães, Rosana Célia Noleto ; Reis, Marcela Aguiar ; LIMA, Vanessa Batista de Sousa ; NOGUEIRA, N. N. ; Nascimento Marreiro, Dilina . Parâmetros Bioquímicos do Zinco em Pacientes Renais Crônicos sob Hemodiálise. 2011. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

17.

Beserra, Bruna Teles Soares ; LIMA, Vanessa Batista de Sousa ; Bezerra, Daila Leite Chaves ; NOGUEIRA, N. N. ; J M Moita Neto ; MARREIRO, D. N. . Estado Nutricional Relativo ao Zinco e a Atividade da Enzima Superóxido Dismutase em Pacientes Diabéticos Tipo 2. 2011. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

18.

Beserra, Bruna Teles Soares ; Sampaio, Fabiane de Araújo ; Bezerra, Daila Leite Chaves ; Feitosa, M. M. ; LIMA, Vanessa Batista de Sousa ; J M Moita Neto ; Nascimento Marreiro, Dilina . Estado Nutricional Relativo ao Magnésio e sua Relação com a Resistência à Insulina em Pacientes Diabéticos Tipo 2. 2011. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

19.

Beserra, Bruna Teles Soares ; LIMA, E. V ; Oliveira, Ana Raquel Soares ; Oliveira, Francisco Erasmo ; Barbosa, Amanda Marreiro ; LIMA, Vanessa Batista de Sousa ; Nascimento Marreiro, Dilina . Reação entre níveis séricos de vitamina D e resistência à insulina em pacientes diabéticos tipo 2. 2011. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

20.

**LIMA, V. B. S.**. Perfil Profissional do Nutricionista e suas Áreas de Atuação. 2010. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

21.

**LIMA, V. B. S.**; LIMA, G. S. P. ; Sampaio, F. A ; TEMOTE, T. L . Perfil de Gestantes Adolescentes Atendidas no Instituto de Perinatologia Social de Teresina-PI. 2010. (Apresentação de Trabalho/Outra).

22.

**LIMA, V. B. S.**; LIMA, A. ; LUSTOSA, C. F. ; MATIAS, J. P. ; MEDEIROS, L. G. O. . Avaliação da Capacidade Antioxidante in vitro e Teor de Fenólicos Totais em Amendoim (*Arachis hypogaea*). 2010. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

23.

Soares, Nina Rosa Mello ; LIMA, Vanessa Batista de Sousa ; Ferro, Flávia Ennes Dourado ; NOGUEIRA, N. N. ; Nascimento Marreiro, Dilina . Relação entre a Concentração de Cálcio da Dieta e a Adiposidade em Mulheres Obesas. 2010. (Apresentação de Trabalho/Seminário).

24.

Sampaio, F. A ; Bezerra, D. L. C. ; **LIMA, V. B. S.** ; NOGUEIRA, N. N. ; MARREIRO, D. N. . Avaliação do Magnésio Dietético e Estado Nutricional de Pacientes com Diabetes Mellitus Tipo 2. 2010. (Apresentação de Trabalho/Seminário).

25.

Neta, Eunice Alves da Silva ; LIMA, Vanessa Batista de Sousa ; Temóteo, Tatiane Leocádio ; Silva, Kelcyline Gomes da ; Lima, Geânia de Sousa Paz . Consumo Alimentar e Estado Nutricional de Gestantes Adolescentes e Assistência Nutricional Pré-Natal. 2010. (Apresentação de Trabalho/Seminário).

26.

Araújo, Camila Guedes B ; Magalhães, Rosana Célia Noletto ; Reis, Marcela Aguiar ; LIMA, Vanessa Batista de Sousa ; NOGUEIRA, N. N. ; Nascimento Marreiro, Dilina . Estado Nutricional de Pacientes em Programa de Hemodiálise. 2010. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

27.

**LIMA, V. B. S.**; ANDRADE, L. S. ; Pires, Lílíane Viana ; NOGUEIRA, N. N. ; MARREIRO, D. N. ; Cozzolino, SMF . Parâmetros Bioquímicos Relativo ao Zinco e Atividade das Enzimas Superóxido Dismutase e Glutathione Peroxidase em Judocas Adolescentes. 2009. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

28.

**LIMA, V. B. S.**; MARREIRO, D. N. ; NOGUEIRA, N. N. ; SOARES, N. R. M. ; SOUSA, M. S. B. . Atividade da Enzima Superóxido Dismutase em Judocas Adolescentes Submetidos ao Treinamento Intenso. 2009. (Apresentação de Trabalho/Seminário).

29.

**LIMA, V. B. S.**; MARREIRO, D. N. ; SOARES, N. R. M. ; SOUSA, M. S. B. . Concentrações Plasmáticas e Eritrocitárias de Zinco e Atividade das Enzimas Superóxido Dismutase e Glutathione Peroxidase em Judocas Adolescentes. 2009. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

30.

**LIMA, V. B. S.**; MARREIRO, D. N. ; NOGUEIRA, N. N. ; ANDRADE, L. S. ; SOUSA, A. F. . Efeito do exercício físico sobre a concentração plasmática de zinco em judocas adolescentes. 2008. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

31.

**LIMA, V. B. S.**; ARAUJO, R. S. R. M. ; CAMPOS, T. F. G. M. ; BATISTA, P. C. . ELABORAÇÃO DE SORVETE À BASE DE SOJA SABOR MANGA.. 2008. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

32.

**LIMA, V. B. S.**; TEMOTE, T. L. ; COUTO, R. W. B. ; CUNHA, A. L. C. ; LIMA, T. B. C. ; LIMA, G. S. P. . CONSUMO ALIMENTAR DE GESTANTES ADOLESCENTES EM ASSISTÊNCIA NUTRICIONAL PRÉ-NATAL. 2008. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

33.

**LIMA, V. B. S.**; TEMOTE, T. L. ; COUTO, R. W. B. ; CUNHA, A. L. C. ; LIMA, T. B. C. ; LIMA, G. S. P. . PERFIL DE GESTANTES ADOLESCENTES ATENDIDAS NO INSTITUTO DE PERINATOLOGIA SOCIAL DA MATERNIDADE DONA EVANGELINA ROSA. 2008. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

34.

**LIMA, V. B. S.**; SOUSA, A. F. ; MARREIRO, D. N. ; NOGUEIRA, N. N. . Efeito do Exercício Físico Sobre a Atividade da Enzima Superóxido Dismutase como Biomarcador do Estresse Oxidativo em Judocas Adolescentes. 2008. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

35.

**LIMA, V. B. S.**; ARAUJO, R. S. R. M. ; CAMPOS, T. F. G. M. ; BATISTA, P. C. . FORMULAÇÃO DE SORVETE À BASE DE SOJA: AVALIAÇÃO DE ACEITABILIDADE E PREFERÊNCIA.. 2008. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

**Outras produções bibliográficas**



1.

**LIMA, V. B. S.**; LUSTOSA, C. F.; MATIAS, J. P.; MEDEIROS, L. G. O.; LIMA, A.; Sampaio, F. A. Composição Centesimal, Fenólicos Totais e Capacidade Antioxidante em Amendoim (*Arachis hypogaea*) 2010 (Artigo Científico publicado em Anais da Semana da Pesquisa Científica-Faculdade Santo Agostinho).

#### Produção técnica

#### Entrevistas, mesas redondas, programas e comentários na mídia

1.

**LIMA, V. B. S.**. Cuidados Nutricionais com a Hidratação durante Calor Intenso. 2010. (Programa de rádio ou TV/Entrevista).

2.

**LIMA, V. B. S.**. Os Benefícios Nutricionais do Ômega-3. 2010. (Programa de rádio ou TV/Entrevista).

3.

**LIMA, V. B. S.**. Cuidados com Alimentação no Verão/Férias. 2009. (Programa de rádio ou TV/Entrevista).

4.

**LIMA, V. B. S.**. Alimentos "Amigos do coração". 2009. (Programa de rádio ou TV/Entrevista).

#### Demais tipos de produção técnica

1.

★ **LIMA, Vanessa Batista de Sousa.** Low carb Diets. 2016. (Curso de curta duração ministrado/Outra).

#### Eventos

#### Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1.

Percutaneous needle muscle biopsy - theoretical basis, clinical and research applications. 2014. (Seminário).

2.

Do sequenciamento de próxima geração À PCR digital. 2013. (Seminário).

3.

XII Simpósio de biossegurança e descartes de produtos químicos perigosos em instituições de ensino e pesquisa. 2013. (Simpósio).

4.

XVII Congresso brasileiro de Nutrologia/XVIII Simpósio de Obesidade e Síndrome Metabólica/XI ANnnnual Meeting International Colleges for Advancements of Medical Nutrition. 2013. (Congresso).

5.

II Simpósio em Ciência e Tecnologia de Alimentos e I Congresso do Instituto Nacional de Frutos Tropicais. Avaliação da Capacidade Antioxidante in vitro e Teor de Fenólicos Totais em Amendoim (*Arachis hypogaea*). 2010. (Congresso).

6.

XVIII Congresso Brasileiro de Nutrição Parenteral e Enteral, VI Congresso Brasileiro de Nutrição Clínica e I Congresso Brasileiro de Gastronomia Hospitalar. Concentrações Plasmáticas e Eritrocitárias de Zinco e Atividades das Enzimas Superóxido Dismutase e Glutathione Peroxidase em Judocas Adolescentes. 2009. (Congresso).

7.

XVIII Seminário de Iniciação Científica da Universidade Federal do Piauí. Atividade da Enzima Superóxido Dismutase em Judocas Adolescentes. 2009. (Seminário).

8.

I Congresso Piauiense de Educação em Atenção Primária à Saúde e III Ciclo de Estudos de Saúde Coletiva em Odontologia. CONSUMO ALIMENTAR DE GESTANTES ADOLESCENTES EM ASSISTÊNCIA NUTRICIONAL PRÉ-NATAL. 2008. (Congresso).

9.

I Congresso Piauiense de Educação em Atenção Primária à Saúde e III Ciclo de Estudos de Saúde Coletiva em Odontologia. PERFIL DE GESTANTES ADOLESCENTES ATENDIDAS NO INSTITUTO DE PERINATOLOGIA SOCIAL DA MATERNIDADE DONA EVANGELINA ROSA. 2008. (Congresso).

10.

II Congresso Piauiense de Alimentos e Nutrição. Efeito do exercício físico sobre a concentração plasmática de zinco em judocas adolescentes. 2008. (Congresso).

11.

II Congresso Piauiense de Alimentos e Nutrição. ELABORAÇÃO DE SORVETE À BASE DE SOJA SABOR MANGA.. 2008. (Congresso).

12.

III Congresso de Ciência, Tecnologia e Inovação e XVII Seminário de Iniciação Científica. Efeito do Exercício Físico Sobre a Atividade da Enzima Superóxido Dismutase como Biomarcador do Estresse Oxidativo em Judocas Adolescentes. 2008. (Congresso).

13.

I Simpósio acadêmico da nutrição do Piauí. 2008. (Simpósio).

14.

VIII Congresso Norte e Nordeste de Nutrição Parenteral e Enteral e VIII Congresso Norte Nordeste de Nutrição Clínica. FORMULAÇÃO DE SORVETE À BASE DE SOJA: AVALIAÇÃO DE ACEITABILIDADE E PREFERÊNCIA.. 2008. (Congresso).

15.

IV Simpósio Piauiense de Saúde e Nutrição. 2007. (Simpósio).

16.

III Simpósio Piauiense de saúde, alimentação e nutrição. 2005. (Simpósio).

17.

II Seminário Estadual da promoção da alimentação saudável e combate às carências nutricionais. 2005. (Seminário).

## Educação e Popularização de C & T

### Artigos

#### Artigos completos publicados em periódicos

1.


LIMA, V. B. S.; LIMA, V. B. S.; CARVALHO FILHO, F. C.; REGO, J. G. S.; MURATORI, M.C.S. Pesquisa de coliformes, escherichia coli e bactérias hetetóricas em água mineral. Higiene Alimentar, v. 77, p. 97-101, 2013.

#### Outras informações relevantes

Participação da Comissão Setorial de Avaliação Institucional do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Piauí como representante discente titular. Elaboração de um Manual para Implantação de Unidades de Alimentação e Nutrição (UAN) sob orientação da Professora Msc. Suely Carvalho Santiago Barreto. Desenvolvimento de um projeto de pesquisa intitulado "Efeito do Exercício Físico Sobre a Atividade da Enzima Superóxido Dismutase como Biomarcador do Estresse Oxidativo em Judocas Adolescentes" sob orientação da Profa Dra DILINA DO NASCIMENTO MARREIRO, que resultou em apresentação em painel, demonstrando a relevância do trabalho desenvolvido quanto ao tema proposto. -Bolsista PIBIC/CNPq e PIBIC/UFPI desenvolvendo projeto de iniciação científica.

Página gerada pelo Sistema Currículo Lattes em 28/09/2016 às 21:42:07

 Baixar Currículo

 Imprimir Currículo