

JAQUELINE SANTOS MOREIRA LEITE

**Suplementação com L-glutamina livre ou como dipeptideo
atenua marcadores de resistencia à insulina e esteatose
hepática em camundongos ob/ob**

Tese apresentada ao programa de Pós-
graduação em Fisiologia Humana
Instituto de Ciências Biomédica da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor em
Ciências

São Paulo

2020

JAQUELINE SANTOS MOREIRA LEITE

**Suplementação com L-glutamina livre ou como dipeptideo
atenua marcadores de resistencia à insulina e esteatose
hepática em camundongos ob/ob**

Tese apresentada ao programa de Pós-
graduação em Fisiologia Humana
Instituto de Ciências Biomédica da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor em
Ciências

Área de concentração: Fisiologia
Humana

Orientador : Prof^o Dr Angelo Rafael
Carpinelli

Versão Corrigida

São Paulo

2020

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Leite, Jaqueline Santos Moreira
/ Jaqueline Santos Moreira Leite; orientador
Angelo Rafael Carpinelli. -- São Paulo, 2020.
88 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Resistência à insulina. 2. Obesidade. 3.
Glutamina . 4. Inflamação. 5. Sistema Antioxidante.
I. Carpinelli, Angelo Rafael, orientador. II.
Título.



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Cidade Universitária "Armando de Sales Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508-000
CEUA-ICB/USP - Telefons (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*Estudo dos efeitos metabólicos, anti-inflamatórios e antioxidantes da suplementação com L-glutamina em camundongos obesos e resistentes à insulina*", registrado sob o protocolo nº **134/2015**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **04/02/2016** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais tem validade de **04 (quatro) anos** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Angelo Rafael Carpinelli**

- Membros da Equipe: *Vinicius Fernandes Cruzat (Pós-doutorando), Jaqueline Santos Moreira Leite (Pós-graduando)*

Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "*The metabolic, anti-inflammatory and antioxidant effects of L-glutamine supplementation on insulin resistant obese mice*", protocol nº **134/2015**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for scientific research purposes, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **2/4/2016** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **04 (four) years** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.) Angelo Rafael Carpinelli**

- Team members: *Vinicius Fernandes Cruzat (Postdoctoral Researcher), Jaqueline Santos Moreira Leite (Graduate Student)*

If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
<i>Mus musculus</i>	C57BL/6	Macho/male	90 dias/days	50

Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes
Coordenador CEUA-ICB/USP

Eliane Aparecida G. M. Nascimento
Secretária CEUA-ICB/USP

**“Dedico esta tese aos meus pais Vera
e José pois esse sonho também é
deles..”**

AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas foram de grande importância para trilhar este caminho árduo. Primeiramente, não posso deixar de agradecer a Deus, Nossa Senhora e minhas intercessoras Santa Tereza da Rosas e Santa Tereza Davi'la, nos momentos mais difíceis eles que me carregaram.

A minha família, minha fortaleza: meus Pais Vera e José, meus irmãos Danilo, Murilo e Bruno, Meus tios Beto e Vânia, meus avôs Olinda, Nilson e Iracema pelo amor e incentivo incondicional para realizar este sonho, por entenderem a minha ausência e por me apoiarem em todos os momentos. Não posso esquecer dos amores da minha vida meus Sobrinhos: Felipe, Octavio, José Pedro, Marina, João Henrique, Joaquim, Vicente e Maria Cecilia.

Ao meu Orientador Prof. Dr. Angelo Carpinelli por me aceitar em seu laboratório, por todo ensinamento não só na parte científica mas os ensinamentos de vida. Com certeza é uma pessoa que levo de inspiração para profissão e para vida.

Ao meu amigo Prof. Dr. Vinicius por acreditar em mim desde o início quando pensei em fazer mestrado, por todo apoio, incentivo, ensinamentos, meu grande incentivador e inspirador neste anos de vida acadêmica.

Aos Professores Dr(s). José Donato Junior, Carla R. Oliveira, Fernando Abdukader Fernanda Ortis e Eduardo Rebelato por todo apoio e colaboração para execução desta pesquisa. A Técnica Marlene por toda ajuda e amizade durante essa jornada. Aos técnicos Bob e Gilson por toda ajuda no materiais de laboratório e os animais. Aos Colegas e amigos de laboratório pela ajuda, apoio e companheirismo nestes 4 anos, em especial aos amigos: Eloisa, Hilton, Ana Claudia, Angelo e Laiane. Em especial a Carolina, pela amizade verdadeira e companheirismo em todos os momentos de alegrias ou dificuldades, uma irmã que a USP me presentiu.

Aos meus amigos que sempre me incentivaram e muitas vezes entenderam minha ausência nestes anos entre mestrado e doutorado. O meu agradecimento especial a minha amiga Vanessa por me acolher em sua casa quando cheguei em São Paulo.

Agradecimento ao apoio as agencias: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e verba PROEX (Programa de Excelência Acadêmica)", Fundação de amparo à pesquisa

(FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) , processo-140118/2016-0.

A minha gratidão à todos que de alguma forma me ajudaram nesta jornada!

“Ando devagar, Porque já tive pressa,

E levo esse sorriso,

Porque já chorei demais

Hoje me sinto mais forte

Mais feliz, quem sabe

Só levo a certeza

De que muito pouco sei

Ou nada sei

Conhecer as manhas

E as manhãs

O sabor das massas

E das maçãs

É preciso amor

Pra poder pulsar

É preciso paz pra poder sorrir

É preciso a chuva para florir

Penso que cumprir a vida

Seja simplesmente

Compreender a marcha

E ir tocando em frente

Como um velho boiadeiro

Levando a boiada

Eu vou tocando os dias

Pela longa estrada, eu vou

Estrada eu sou....”

(Sater , A; Teixeira , R)

RESUMO

LEITE, JSM. Suplementação com L-glutamina livre ou como dipeptídeo atenua marcadores de resistência à insulina e esteatose hepática em camundongos ob/ob. 88p. Tese (Doutorado em Fisiologia humana)- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2020.

Introdução: A obesidade é hoje um problema de saúde pública global, que leva à resistência periférica à insulina e, conseqüentemente, a um desequilíbrio da homeostase da glicose e morbidades associadas, como a doença hepática gordurosa. O aminoácido mais abundante no corpo, a glutamina, pode reduzir a resistência à insulina associada à obesidade. **Objetivo:** Avaliar os efeitos metabólicos, anti-inflamatórios e antioxidantes da suplementação de glutamina na sua forma livre e dipeptídica (DIP, L-alanil-L-glutamina) em camundongos Ob / Ob obesos e resistentes à insulina. **Métodos:** Camundongos da linhagem C57/BL6 adultos foram distribuídos em 5 grupos experimentais: WT (C57BL6, selvagem recebendo água), CTRL-Ob/Ob (Ob/Ob C57BL6, recebendo água), DIP (Ob/Ob C57BL6, suplementado com L-alanil-L-glutamina), GLN (Ob/Ob C57BL6, suplementado com L-glutamina livre) e ALA (Ob/Ob C57BL6, suplementado com L-alanina livre). O período de suplementação foi de 40 dias com solução contendo os suplementos a 4% na água de beber. Durante o experimento foram avaliados: a ingestão hídrica, o consumo de ração, o ganho de peso e efetuados o teste de tolerância à glicose (GTT) e à insulina (ITT). Após a eutanásia foram avaliadas as concentrações de insulina, triglicerídeos, colesterol total, concentração de glutamina e glutamato plasmáticos. No fígado e músculo esquelético foram avaliadas as concentrações de GSH, GSSG, TBARS, HSP-70 e AKTp308. Também foram determinadas a expressão gênica de enzimas do metabolismo lipídico no fígado e antioxidante e inflamatório no fígado e músculo. As diferenças estatísticas foram obtidas utilizando o teste de ANOVA *One-way*, com nível de significância de 5%. **Resultados:** Os resultados obtidos demonstraram que a suplementação com L-glutamina livre ou na forma de dipeptídeo aumentou os estoques da glutamina corporal e reduziu a resistência à insulina em camundongos Ob/Ob obesos e diabéticos. Estes efeitos são atribuídos ao aumento da capacidade antioxidante mediada pela GSH e NRF-2, pela citoproteção via HSP-70 e SIRT-1 e pela menor ativação de NFκ-B. Além disso, a suplementação com L-glutamina e L-alanina reduziram os triglicerídeos no plasma e no fígado via redução da expressão SRBP1-

c e as enzimas ACC e DGAT, além de reduzirem a secreção de insulina estimulada por alta concentração de glicose (16,7mM).

Palavras-chave: Diabetes tipo 2, inflamação, sistema antioxidante, secreção de insulina

ABSTRACT

LEITE, J.S.M. Supplementation with free L-glutamine or as dipeptide attenuates markers of insulin resistance and hepatic steatosis in ob / ob mice. 88p. Thesis (Thesis in human physiology). The Institute of Biomedical Sciences of the University of São Paulo, 2020.

Introduction: Obesity is worldwide pandemic health problem that leads to peripheral insulin resistance and consequently to an imbalance of glucose homeostasis and associated morbidities, such as fatty liver disease. The most abundant amino acid in the body, glutamine might be reduced in obesity-associated insulin resistance which may compromise insulin secretion and action. **Objective:** To evaluate the metabolic, anti-inflammatory and antioxidant effects of glutamine supplementation in its free and dipeptide form (DIP, L-alanyl-L-glutamine) in obese and insulin-resistant Ob/Ob mice.

Methods: C57/BL6 adult mice were distributed into five groups: wild type (WT, drinking water), control Ob/Ob (CTRL, drinking water), DIP Ob/Ob, free glutamine Ob/Ob (GLN, supplemented with free L-glutamine) and free alanine Ob/Ob (ALA, supplemented with free L-alanine). The supplements were offered in a 4% drinking water solution for 40 days prior to euthanasia and the total body weight gain, food and fluid intake were measured. Glucose and insulin tolerance test (GTT and ITT, respectively) were performed at the end of the 40 days of supplementation. After euthanasia, insulin, triglyceride, total cholesterol, glutamine and glutamate plasma concentrations were evaluated. In the liver and skeletal muscle, the concentrations of GSH, GSSG, TBARS, and HSP-70 were evaluated. The gene expression of lipid metabolism enzymes in the liver and antioxidant and inflammatory in the liver and muscle were also determined. The statistical differences were obtained using the One-Way ANOVA, with minimum difference of $P < 0.05$. **Results:** GLN and DIP increased glutamine stocks in the liver and skeletal muscle. GLN and DIP groups have shown a reduction in insulin resistance parameters. These effects were attributed to the increased antioxidant capacity mediated by GSH and NRF-2, cytoprotection mediated by HSP-70 and lower inflammatory profile associated with NF κ -B pathway. In addition, supplementation with L-glutamine and L-alanine reduced triglycerides in plasma and liver via reduced expression SRBP1-c and enzymes ACC and DGAT, in addition to reducing insulin secretion stimulated by high glucose concentration (16, 7mM).

Keywords: Diabetes type 2; inflammation, oxidative stress, antioxidant system, insulin secretion

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Eletroforese de gel de agarose a 1,5% correspondente ao fragmento de DNA da cauda dos animais.....	27
Figura 2 - Concentração plasmática de glutamina(A) e glutamato (B).....	42
Figura 3 - Concentração de glutamina (A) e glutamato (B) hepático, glutamina (C) e glutamato muscular (D).....	43
Figura 4 - Glicemia basal (A) e insulina plasmática (B).....	44
Figura 5 - Teste de tolerância à glicose (GTT) medido por tempo (A) e Área sob a curva (B, AUC).....	46
Figura 6 - Teste de tolerância à insulina (ITT) (A) e AUC (B).....	47
Figura 7 - Secreção de insulina das ilhotas pancreáticas em diferentes concentrações de glicose.....	48
Figura 8 - Concentração de glicogênio hepático	51
Figura 9 - Gotículas de gordura no tecido hepático e Imagens representativa do fígado dos animais.....	52
Figura 10 - Translocação para o núcleo do Fator de transcrição NRF-2. no fígado (A) e músculo esquelético (B)	55
Figura 11 - Translocação para o núcleo do dímero P65 do NF-kB no fígado (A) e músculo esquelético (B).....	56
Figura 12 - Conteúdo de HSP70 no fígado(A) e músculo esquelético (B).....	57
Figura 13 - Conteúdo de AKT fosforilada (Tr-308) no fígado (A) e músculo esquelético (B).....	58
Figura 14 - Expressão gênica de sirt-1 no fígado (A) e músculo esquelético (B).....	58
Figura 15 - Expressão gênica de Hspab1 no fígado (A) e músculo esquelético (B).....	59
Figura 16 - Expressão gênica de proteínas antioxidantes no fígado e músculo esquelético.	60
Figura 17 - Expressão de genes envolvidos com o metabolismo lipídico hepático....	62
Figura 18 - Expressão gênica de citocinas no fígado e musculo esquelético.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Sequência dos primers dos genes avaliados.....	38
Tabela 2 - Consumo de ração e ingestão hídrica durante o experimento.....	40
Tabela 3 - Relação do peso inicial, ganho de peso e peso do fígado e músculo esquelético.....	41
Tabela 4: Colesterol total e triglicerídeos e marcadores hepáticos.....	49
Tabela 5: Concentração plasmática de Creatinina e Ureia	50
Tabela 6 - Concentração de TBARS hepático e muscular (MDA/g de tecido fresco).....	53
Tabela 7 - Concentração hepática e muscular de glutatona oxidada e reduzida.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS

- AKT: Proteína quinase B
- ALA: Grupo L-alanina livre
- ALT: Alanina aminotransferase
- AST: Aspartato aminotransferase
- ChREBP: Proteína de ligação a elemento responsiva a carboidrato
- CTRL: Grupo controle obeso
- DIP: L-alanil- L-glutmaina
- DM: diabetes *melittus*
- DM2: diabetes *melittus* tipo 2
- EROs: Espécies reativas de oxigênio
- GDH :glutamato desidrogenase
- GLN: Grupo L- glutamina livre
- GLP-1: Peptideo semelhante a glucagon
- GSH: Glutationa reduzida
- GSIS: *Glucose stimulated insulin secretion* - secreção de insulina estimulada pela glicose
- GSSG: Glutationa oxidada
- GTT: Teste de tolerância à glicose
- HDL: Lipoproteína de alta densidade (*High density lipoprotein cholesterol*)
- HSF-1: Fator de choque térmico 1
- HSP: Proteína de choque térmico
- IL-1 β : Interleucina 1 beta
- IL-6: Interleucina 6
- IMC: Índice de massa corporal
- ITT: Teste de tolerância à insulina
- JNK: Jun N-terminal quinase
- MCP-1: Quimiotactante de monócitos 1
- MDA: malondialdeído
- MIP-1: Proteína inflamatória de macrófagos 1
- NaOH: Hidróxido de sódio
- NF-kB: Fator nuclear Kappa B

NOX: NADPH oxidase

NRF-2: Fator nuclear eritroide relacionado ao fator 2

PDK: Piruvato desidrogenase quinase

PGC-1 α : Receptor ativado por proliferador de peroxissoma 1 alfa

PPAR α : *Peroxisome proliferator-activated receptor*

RI: resistência à insulina

SIRT-1: Sirtuína 1

SOD: superóxido dismutase

SREBP-1c: Fator de transcrição de ligação ao elemento regulador de esterol 1

TBA: ácido tiobarbitúrico

TBARS: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TCA o ciclo do ácido tricarbóxico

TG: triglicerídeos

TLR4: Receptor do tipo Toll 4

TNF- α : fator de necrose tumoral

LISTA DE SIMBÓLOS

°C: graus ceusos

g: gramas

h: horas

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

L: Litros

mim: Minutos

Mg: miligramas

Mg/dL: Miligramas por decilitro

mL: mililitros

mM: milimolar

NaOH: Hidróxido de sódio

Na₂CO₃: Carbonato de sódio

ng/mL: nanograma por mililitro

nm: nanometros

O₂⁻: ânion superóxido

U/L: Unidade por litro

µl: microlitro

uM: micromolar

µmol: milimolar

% : porcento

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	20
1.1. Esteese oxidativo , inflamação na obesidade e DM2.....	20
1.2. Metabolismo proteico na obesidade e DM2: importância da glutamina..	22
2.1.OBJETIVO.....	25
2.1. Objetivo geral.....	25
2.2. Objetivos específicos.....	25
3.MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1. Animais.....	26
3.2. Procriação dos Animais selvagens e Ob/Ob.....	26
3.3. Genotipagem.....	26
<u>3.3.1. Extração do DNA.....</u>	26
<u>3.3.2. RT PCR.....</u>	27
3.4. Grupos experimentais.....	28
3.5. Dieta e suplementação.....	28
3.6. Testes indicadores de resistência à insulina.....	28
3.7. Extração de tecidos e isolamento de ilhotas pancreáticas.....	29
3.8. Insulina Plasmática.....	29
3.9. Concentrações de glutamina e glutamato plasmático e tecidual.....	30
3.10. Concentração de triglicérides e colesterol total.....	30
3.11. Atividade da Alanina aminotrasferase (ALT) e Aspartato aminotrasnferase (AST) plasmático.....	31

3.12	Glutathiona reduzida e oxidada.....	31
3.13.	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).....	32
3.14.	Determinação de conteúdo de triglicerídeos hepático.....	32
3.15.	Determinação de conteúdo de Glicogênio.....	32
3.16	Quantificação de proteína.....	33
3.17.	Extração da Fração Nuclear e Citoplasmática do músculo e fígado.....	33
3.18.	Translocação nuclear dos Fatores de transcrição NRF-2. e.NF-kB.....	34
3.19.	Conteúdo proteico através da técnica de Western Blot	34
3.20.	Histologia.....	35
3.20.1.	Coloração H & E.....	35
3.21.2.	Coloração OilRed O (ORO).....	35
3.21.	Dosagem de insulina por radioimunoensaio.....	36
3.23	Expressão gênica por PCR real time.....	36
3.24.	Análise estatística.....	38
4.RESULTADOS.....		40
4.1.	Consumo de ração e ingestão hídrica.....	40
4.2.	Peso corporal.....	41
4.3.	Glutamina corporal.....	42
4.4.	Homeostasia da glicose.....	44
4.5.	Colesterol, triglicerídeos e marcadores do metabolismo hepático.....	49
4.6.	Creatinina e Ureia.....	50
4.7.	Glicogênio hepático.....	51
4.8.	Histologia Hepática.....	52

4.9. Concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	53
4.10. Concentração hepática e muscular de GSH e GSSG.....	54
4.11. Translocação para o núcleo do Fator de transcrição NRF-2.....	55
4.12 Translocação para o nucleo do fator de transcrição NF-kB.....	56
4.13. Análises mensuradas pela técnica de Western blot.....	57
4.14. Análises mensuradas pela técnica de qPCR.....	59
5. DISCUSSÃO.....	66
6. CONCLUSÃO.....	73
7. RERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74

1. INTRODUÇÃO

O estilo de vida não saudável, a baixa atividade física, o excesso de ingestão calórica e o consumo de dietas ricas em gorduras saturadas são os principais fatores que desencadeiam distúrbios metabólicos, tais como obesidade, diabetes melittus tipo 2 (DM2), dislipidemia e esteatose hepática não alcoólica ^{1;2}. Atualmente vivemos uma pandemia de obesidade, que nos últimos quarenta anos aumentou cerca de quatro vezes. De acordo com OMS havia 100 milhões de obesos em 1975 que passou para 671 milhões em 2016, além de 1,3 bilhões de pessoas com sobrepeso ^{3;4}.

As alterações metabólicas causadas pela obesidade promovem inflamação sistêmica e estresse oxidativo crônico, que contribuem para o desenvolvimento do DM2 e da esteatose hepática ^{5; 6; 7}. O DM2 é uma doença metabólica complexa e heterogênea na qual as interações entre fatores genéticos e ambientais resultam no desenvolvimento de graus variáveis de resistência à insulina (RI), disfunção das ilhotas pancreáticas e diminuição progressiva da resposta secretória de insulina ^{5; 8}, o que acarreta em desequilíbrio na homeostase glicêmica. Esse desequilíbrio é provocado principalmente pela elevada síntese de glicose pelo fígado, por causa da redução da insulina circulante e/ou resistência à mesma em tecidos periféricos, especialmente no fígado e músculos esqueléticos ⁹. A elevada síntese de glicose pelo fígado leva à esteatose hepática não alcoólica em aproximadamente 65-70% dos DM2. ^{10; 11}.

1.1. Estresse oxidativo , inflamação na obesidade e DM2

Em obesos, o elevado consumo de alimentos com alta densidade energética, ricos em carboidratos simples e gorduras saturadas, geram eventos hiperglicêmicos, os quais promovem estresse oxidativo tanto nos tecidos periféricos quanto em ilhotas pancreáticas ¹². As alterações do estado redox ocorrem em decorrência do aumento da síntese mitocondrial de espécies reativas do oxigênio (EROs), glicosilação não enzimática de proteínas e auto-oxidação da glicose nos tecidos ¹³. O aumento dos radicais livres ativam mecanismos anti-oxidantes eficientes na regulação do estado redox tecidual, porém, eventualmente, não em condições de estresse.

O fator nuclear eritroide relacionado ao fator 2 (NRF-2) é o principal regulador da resposta adaptativa ao estresse oxidativo. Em concentrações normais, o NRF-2 é encontrado ligado à proteína citosólica Keap1. Quando há aumento nas EROs, são produzidas alterações conformacionais na proteína Keap1, havendo uma separação

entre a Keap1 e a NRF-2 e, esta última, transloca para o núcleo induzindo os genes alvo pela ligação ao ARE (elemento de resposta antioxidante) ¹⁴. A via Keap1-Nrf2-ARE é crucial na regulação de vários genes que expressam proteínas antioxidantes e citoprotetoras, tais como a glutathiona (GCLC), a superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathiona peroxidase (GPx)¹⁵. Cabe salientar que o NRF-2 também tem um importante papel na regulação do metabolismo dos lipídeos e da glicose e a sua inativação vem sendo correlacionada com aumento da resistência à insulina e esteatose hepática ^{1; 14; 16}.

É importante salientar que o principal antioxidante não enzimático do organismo, a glutathiona (GSH), encontra-se reduzida tanto em indivíduos obesos quanto em indivíduos diabéticos, o que compromete a defesa antioxidante e o estado redox celular nestes indivíduos ^{17; 18}. Estudos demonstram que a concentração plasmática de GSH pode ser inversamente correlacionada com o IMC e a massa gorda ^{19; 20}. Além disso, a redução da GSH em indivíduos obesos e resistentes à insulina está diretamente envolvida com a disfunção da célula beta pancreática, resistência à insulina nos tecidos-alvo e esteatose hepática ²¹.

Na fisiopatologia da obesidade, o estresse oxidativo e a hipertrofia e hiperplasia do tecido adiposo estimulam a migração de macrófagos pró-inflamatórios, aumentando a síntese de citocinas inflamatórias, tais como fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina 6 (IL-6), interleucina 1 beta (IL-1 β) ^{5; 22; 23}. Além disso, o próprio estresse oxidativo promove a ativação de citocinas inflamatórias, tais como o TNF- α e a IL-6 ⁶. Na circulação, as citocinas inflamatórias podem se ligar ao receptor semelhante ao Toll do tipo 4 (TLR4) dos tecidos-alvo desencadeando a ativação de vias de sinalização, tais como o fator nuclear Kappa B (NF-kB) ^{5; 24}. Em sua forma ativa, o NF-kB promove o disparo da transcrição de genes que exercem funções essenciais na regulação da homeostasia celular ^{25; 26}. A ativação destas vias na obesidade representa um papel crítico para o desenvolvimento do DM2 e esteatose hepática em indivíduos obesos, principalmente por inativar os receptores de insulina nos tecidos-alvo ^{26; 27; 28}.

Outro fator relevante para a resistência à insulina em indivíduos obesos, são as alterações na função da proteína Sirtuína 1 (SIRT1) ¹⁷. Esta desacetilase de histona exerce um papel crucial na inflamação, principalmente por promover a desacetilação da subunidade p65 do NF-kB em tecidos periféricos, promovendo a sua inativação ^{29; 30}. Além de atuar na regulação do metabolismo lipídico e da glicose ³¹. Por exemplo,

em camundongos *knockout* para SIRT-1, a ausência desta proteína acarreta em hiperglicemia, resistência à insulina e esteatose hepática devido ao aumento da gliconeogênese hepática. A SIRT-1 pode regular fatores de transcrição envolvidos com metabolismo lipídico tais como proteína 1 de ligação ao elemento regulador de esterol (SREBP-1c) e proteína de ligação ao elemento responsivo a carboidratos (ChREBP)³². A SIRT1 também está correlacionada com a expressão de proteínas de choque térmico (HSPs) ³³. As HSPs possuem um papel citoprotetor em todas as células do organismo e uma das famílias de HSPs mais estudadas são as proteínas de aproximadamente 70 kda (HSP-70, HSP-72 e HSP-73) ^{33; 34; 35}. A HSP-70 atua na modulação da resposta inflamatória e morte celular. Um estudo com animais *knockout* para HSP-72 demonstrou que a ausência desta proteína aumenta a adiposidade e reduz a sensibilidade à insulina por até 42 % no músculo esquelético, principalmente pela menor fosforilação da proteína AKT ³⁶. A HSP-72 também pode regular o fator de transcrição NFkB tanto nos tecidos periféricos, quanto nas ilhotas pancreáticas ³⁷.

1.2. Metabolismo proteico na obesidade e DM2: importância da glutamina

Em indivíduos obesos e diabéticos, as alterações no metabolismo proteico, principalmente pela maior oxidação de aminoácidos, pode reduzir a concentração da glutamina, o aminoácido mais abundante do organismo ³⁸. Tanto no plasma quanto nos tecidos, a concentração de glutamina é 10 a 100 vezes superior aos outros aminoácidos. No plasma a concentração de glutamina corresponde de 20% do total de aminoácidos livres na corrente sanguínea, variando entre 500 a 800 µM/L e nos tecidos representa de 40 a 60% do pool de aminoácidos ³⁹. O fígado, cérebro, pulmões, músculo esquelético e tecido adiposo sintetizam glutamina, a partir do glutamato com a catálise da enzima glutamina sintetase ^{39; 40}. Contudo, a mucosa intestinal, os leucócitos e as células dos túbulos renais, utilizam glutamina em grande quantidade em seu metabolismo, principalmente pela alta atividade da glutaminase expressa nesses tecidos ^{40; 41; 42}. Cabe salientar que em situações catabólicas, o fígado pode se tornar um local consumidor de glutamina e o músculo esquelético, principal tecido responsável pela síntese de glutamina, não consegue suprir a demanda de glutamina reduzindo a sua disponibilidade ^{39; 41}.

Assim, estudos recentes têm associado a redução de glutamina e da razão glutamina/glutamato no plasma com um maior risco de mortalidade e o desenvolvimento de doenças crônicas, como o DM2 ^{43; 44; 45}. A razão

glutamina/glutamato foi inversamente associada ao IMC, peso corporal, glicemia em jejum, insulina plasmática, índice HOMA e triglicédeos, e além de estar positivamente associada a maiores concentrações de HDL ⁴⁵. Este fato pode ser particularmente importante, uma vez que estudos tanto em modelos animais ^{46; 47} quanto em seres humanos ^{48; 49} tem demonstrado que a glutamina possui propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e citoprotetoras. Nesse sentido, os efeitos da suplementação com L-glutamina têm sido investigados como uma alternativa nutricional para restaurar a concentração de glutamina corporal, modular respostas inflamatórias e atenuar o estresse oxidativo em situações de elevado catabolismo ^{49; 50; 51}.

Dentre as alternativas de suplementação com L-glutamina, a utilização de dipeptídeos tais como a L-alanil-L-glutamina (DIP) tem sido recomendada em situações de elevado estresse metabólico ⁵². Contudo, mais recentemente foi demonstrado que tanto o DIP quanto a solução contendo L-glutamina e L-alanina na forma livre são eficazes em restaurar a concentração de glutamina corporal, tendo efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes. Além disso, uma maior capacidade de citoproteção foi observada através da expressão de HSPs nos tecidos periféricos ^{35; 46; 47; 53; 54; 55; 56}. Estes resultados indicam um possível papel da L-alanina no metabolismo da glutamina por meio de sua transaminação em diversos tecidos ⁴⁷.

Outra via na qual a suplementação com L-glutamina pode melhorar a capacidade antioxidante está relacionada à expressão de NRF-2. Em dois estudos, a maior disponibilidade de glutamina em células intestinais se correlacionou com o aumento da expressão de NRF-2 e maior disponibilidade de GSH ^{57; 58}. Entretanto, a literatura não apresenta estudos verificando se os efeitos antioxidantes da suplementação com L-glutamina atuam por meio desta via do NRF-2 no desenvolvimento de DM2 em indivíduos obesos.

Os efeitos da suplementação crônica com L-glutamina ou L-alanina também foram estudados em ratos obesos e resistentes à insulina em dieta hiperlipídica ⁵⁹. Nesse trabalho, somente a suplementação com L-glutamina aumentou a sua concentração plasmática e atenuou a RI no músculo esquelético e no fígado. Porém, a suplementação com L-glutamina induziu uma RI no tecido adiposo branco. Em estudo recente utilizando camundongos da linhagem B6.129SF2/J obesos induzidos por dieta hiperlipídica, a suplementação com L-glutamina livre ou com dipeptídeo não alterou os parâmetros de resistência à insulina e citoproteção (HSP-70). Porém, de

acordo com os autores, os camundongos da linhagem B6.129SF2/J são mais resistentes aos efeitos causados pela dieta hiperlipídica por mecanismos que podem incluir a adaptação intestinal, o que reduz a absorção de nutrientes, incluindo aminoácidos ⁶⁰. Porém em humanos, a suplementação com L-glutamina durante quatro semanas em mulheres obesas ou com sobrepeso, diminuiu cerca de 20% a insulinemia e o índice HOMA-IR ⁶¹. A partir de estudos *in vitro* com linhagem de células beta pancreáticas submetidas à estímulo com macrófagos humanos obesos, foi sugerido que a maior oferta de L-glutamina através da utilização do DIP mantém normalizada a secreção de insulina, devido à maior proteção anti-inflamatória e antioxidante, bem como um menor estresse de retículo e da disfunção mitocondrial via sistema NOX ³³. No entanto, até o presente momento, não foram encontrados na literatura estudos verificando estes efeitos em modelos animais.

Neste sentido, este estudo avaliou o efeito da suplementação com L-glutamina livre ou como dipeptídeo poderia ser um agente terapêutico para atenuar o estresse oxidativo, inflamação e conseqüentemente diminuir as comorbidades causadas pela obesidade tais como: a resistência periférica à insulina e regular secreção de insulina e esteatose hepática.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos da suplementação oral crônica com L-glutamina livre e na forma de dipeptídeo (L-alanil-L-glutamina) sobre a resistência à insulina em camungos Ob/Ob.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos da suplementação com L-glutamina na homeostasia da glicose.
- Avaliar os efeitos da suplementação com L-glutamina no o sistema antioxidante e eixo glutamina-glutathione.
- Avaliar os efeitos da suplementação com L-glutamina na resposta inflamatória.
- Avaliar os efeitos da suplementação com L-glutamina na resposta citoprotetora mediada pela via da HSP70.
- Avaliar os efeitos da suplementação com L-glutamina no metabolismo lipídico hepático.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

No presente estudo foram utilizados camundongos Ob/Ob C57/BL6 adultos machos com peso médio de 45 ± 5 gramas e como grupo controle “wild type” não mutante composto por animais selvagens C57/BL6 adultos machos, pesando cerca de 24 ± 3 gramas. Todos os animais iniciaram o protocolo experimental com 90 ± 3 dias de vida. Os mesmos foram procriados e mantidos no Biotério de camundongos do departamento de Fisiologia e Biofísica, sendo utilizados de acordo com certificado aprovado pela CEUA ICB (no 134/2015) e normas estabelecidas pelo CONCEA.

Os animais foram agrupados em número máximo de quatro por caixa e mantidos durante todo o experimento sob temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa do ar de 55% e obedecendo a um ciclo de 12 horas claro e 12 horas escuro (luz acesa às 6:00). A dieta foi ofertada *ad libitum* por meio de ração específica para roedores (NUVILAB CR1, Nuvital Nutrientes LTDA, Curitiba). O peso dos animais e consumo de ração foi mensurado uma vez por semana. O método de morte utilizado foi o deslocamento cervical.

3.2. Procriação dos Animais selvagens e Ob/Ob

Os animais com genótipo Ob/Ob têm como característica a infertilidade⁶². Para obtermos estes animais, é necessário acasalar animais heterozigotos. Como resultado, obtêm-se os seguintes animais: *Wild Type* (genótipo 0), Heterozigotos (genótipo 1) e animais mutantes Ob/Ob (genótipo 2). Após o desmame, uma amostra da cauda dos animais é retirada para a genotipagem através do método de RT-PCR.

3.3. Genotipagem

3.3.1. Extração do DNA

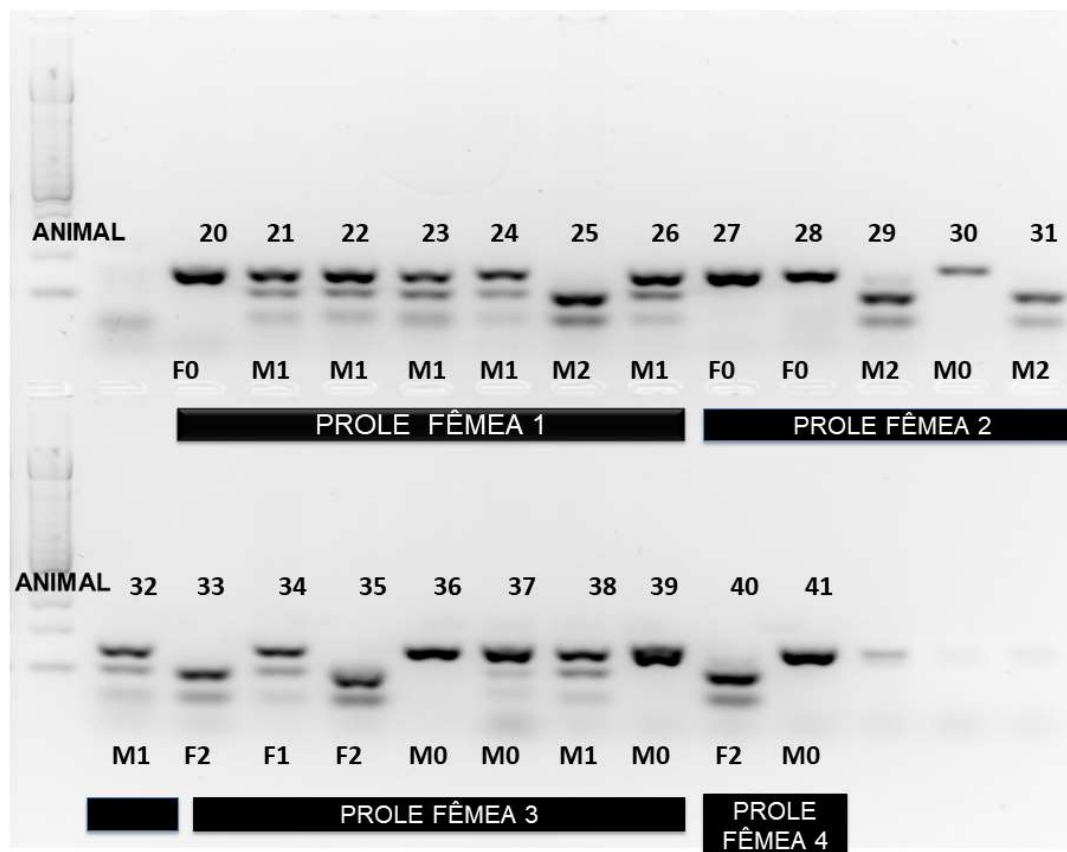
Para a extração do DNA contido na cauda do animal foi utilizado RED Extract-N-Amp Tissue PCR kit (Sigma Aldrich, St Louis, Mo, EUA). Para tal 112,5 μl de tampão de extração foi adicionado a amostra da cauda do animal e centrifugadas por 1 min à 10000 RPM e 22°C . Em seguida, as amostras foram deixadas por 20 min em temperatura ambiente prosseguido de 12 min à 92°C . Foram adicionados 50 μl de tampão de neutralização e colocado no vórtex por 1 min. As amostras foram armazenadas na a 4°C por 24horas.

3.3.2. RT-PCR

Para o RT-PCR, em um microtubo foi adicionado 0,25 µl de primer, 3,75 µl de água, 5 µl de RED mix e 1 µl de DNA extraído. Posteriormente, foi adicionado 5 µl de tampão com enzima de restrição. O PCR foi realizado no Termociclador Simplim AMP-TermalCycle (Life Technology Carlsbad, California, EUA) por 24 horas.

As amostras foram carregadas em gel de agarose à 2% com gel red para eletroforese em cuba Biorad. Posteriormente o gel foi revelado em fotorrevelador Amersham Imager 600 imagers (G.E Healthcare, EUA).

Figura 1 - Eletroforese de gel de agarose a 1,5% correspondente ao fragmento de DNA da cauda dos animais.



Animais genotipados após o desmame entre 21 a 28 dias. M0: macho *wild type*; M1: macho heterozigoto e M2: macho Ob/Ob; F0 fêmea *wild type*; F1: fêmea heterozigota; F2 fêmea Ob/Ob

A figura 1 descreve o exemplo de uma das genotipagens realizadas no ano de 2016, na qual foi avaliada a genotipagem dos filhotes de quatro fêmeas. Como resultado observa-se que foi obtido 1 macho Ob/Ob e 2 fêmeas Ob/Ob.

A partir do mês de junho de 2016 foi realizada uma nova técnica para aumento da produção dos animais. A técnica consiste na reversão da infertilidade de animais

machos Ob/Ob através do transplante de gordura epididimal de um irmão homocigoto ou heterocigoto para o dorso de um irmão Ob/Ob ⁶². Ao total foi realizada a cirurgia com 6 animais. Como total de animais foram criados 670 animais, sendo em média 150 Ob/Ob.

3.4 Grupos experimentais

- ✓ **WT** - *Wild type* Camundongos C57/BL6 não mutantes, saudáveis, recebendo água
- ✓ **CTRL** - Camundongos Ob/Ob C57/BL6, recebendo água
- ✓ **DIP** - Camundongos Ob/Ob C57/BL6, recebendo o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina
- ✓ **GLN** - Camundongos Ob/Ob C57/BL6, recebendo L-glutamina livre
- ✓ **ALA** - Camundongos Ob/Ob C57/BL6, recebendo L-alanina livre

3.5. Dieta e suplementação

O período total de suplementação foi de 40 dias. A suplementação foi ofertada por meio da dissolução dos aminoácidos na água de beber dos animais à concentração de 4% ^{47; 59}. Os animais dos grupos suplementados receberam: o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina (Fresenius Kabi – Produtos Farmacêuticos do Brasil Ltda) ou os aminoácidos L-glutamina ou L-alanina na forma livre (Synth, Diadema, SP, Brasil). Os grupos controles (WT e CTRL) receberam água.

3.6. Testes indicadores de resistência à insulina

Após o período de aproximadamente 12 semanas os camundongos Ob/Ob C57/BL6 normalmente apresentaram significativa evolução da resistência à insulina. Esse diagnóstico foi confirmado através de testes de tolerância à glicose (GTT) e teste de tolerância à insulina (ITT) intraperitoneal os quais foram realizados na 4^a e 5^a semanas de suplementação, respectivamente. Para realização do GTT e ITT, os animais ficaram sob restrição alimentar de 4 horas.

GTT: foi injetada uma solução de glicose equivalente a 0,1 ml/10g de peso corporal, diluído em 0,1g de glicose/ml de solução salina (Dextrose, Sinthy, Brasil) e coletado 1 µl de amostras de sangue da cauda do animal nos tempos 0, 20, 30, 60, 90 e 120 minutos.

ITT: 0,75 UI de insulina foi injetada nos animais WT e 2 UI de insulina foi injetada nos animais Ob/Ob. O sangue foi coletado nos tempos 0, 20, 30, 60, 90 e 120 minutos.

Estes testes são considerados de estresse moderado, pois envolvem repetidas intervenções no animal, apesar de relativamente indolores.

3.7. Extração de tecidos e isolamento de ilhotas pancreáticas

Logo após a morte, o fígado e o músculo gastrocnêmio foram removidos e congelados utilizando um “*freeze-clamp*”, sendo posteriormente colocados em nitrogênio líquido e freezer -80°C para posteriores análises. Amostras de sangue foram coletadas e posteriormente centrifugadas a 2500 RPM por 15 minutos a 4°C sendo coletado o soro e armazenado em freezer -80°C.

A extração de ilhotas pancreáticas foi realizada pelo método da digestão do pâncreas exócrino pela colagenase, de acordo com metodologia descrita por Lacy et al. ⁶³ e adaptada por Kinaseiwiz et al. ⁶⁴. Para tal, o ducto biliar foi clampeado na sua extremidade distal onde foi introduzida uma agulha e injetados 3 mL de solução de colagenase (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA). O pâncreas foi dissecado, e em seguida colocado em banho a 37 °C durante 25 minutos. A seguir, foi agitado manualmente em banho maria a 37°C por 1 minuto para a digestão da porção exócrina. A coleta das ilhotas pancreáticas foi feita em placa de Petri com o emprego de micropipeta e lupa.

3.8. Insulina Plasmática

A concentração plasmática de insulina foi realizada com kit comercial EZRMI-13K - Rat/Mouse Insulin ELISA (EMD Millipore Corporation, St. Charles, Missouri USA). Para tal, a microplaca foi lavada 3 vezes com *wash buffer* e adicionado 10 µl de *assay buffer* nos poços correspondentes ao branco e amostras ou 10 µl de *Matrix solution* nos poços dos padrões e controles. Em seguida, foram adicionados 10 µl dos padrões, controles ou amostras nos poços correspondentes e 80 µl de *detection solution* em todos os poços e incubada por 2h sob agitação moderada em temperatura ambiente. O líquido presente na placa foi desprezado e a mesma foi lavada 3 vezes com *wash buffer*. Foram adicionados 100 µl de *enzyme solution* e incubado por 30 min sob agitação. Posteriormente, o líquido foi desprezado e a placa foi lavada 3 vezes com *wash buffer*. Foram adicionados 100 µl de *substrate solution* em cada poço da placa e deixada sob agitação por 6 min em temperatura ambiente e adicionado 100 µl de *stop solution*. A leitura foi realizada nos comprimentos de onda 450 e 590 nm no leitor de microplaca de ELISA (SynergyH1/Biotek, Winooski, VT, EUA).

3.9. Concentrações de glutamina e glutamato plasmático e tecidual

A determinação de glutamina e glutamato plasmáticos foram realizadas por meio do kit comercial para glutamina/glutamato (Sigma-Aldrich Diagnostics Inc., Saint Louis, Missouri, EUA), no qual recomenda a metodologia descrita por Lund ⁶⁵. Para a determinação dos conteúdos de glutamina e/ou glutamato plasmático, os plasmas foram homogeneizados com ácido tricloroacético (TCA) a 5% na proporção de 1:1 em homogeneizador (Ultra Turrax). Após a homogeneização em TCA, neutralizou-se os plasmas utilizando 6 µl de Na₂CO₃ para cada 100 µL de sobrenadante coletado. Posteriormente, foi feita a centrifugação a 16.000 g por 2 min a 4°C, sendo o sobrenadante transferido para outro microtubo de 1,5 ml. O volume de Na₂CO₃ utilizado foi suficiente para elevar o pH das amostras para cerca de 6,5. Para o ensaio foi utilizados 20 µL dos sobrenadantes em triplicata.

Para a determinação de glutamina e glutamato muscular (gastrocnêmico) e hepático, as amostras foram homogeneizadas em TCA 5% à razão de 6 mL por grama de tecido utilizando-se homogeneizador de facas (Ultra Turrax, IKA Dispersadores, Brasil). Imediatamente após a homogeneização, centrifugou-se a amostra em a 16.000 g por 2 min. a 4°C. Em um microtubo de 600µl o sobrenadante foi coletado e neutralizado com 6 µL de Na₂CO₃ para cada 100 µL de sobrenadante. O volume de Na₂CO₃ utilizado foi suficiente para trazer o pH das amostras para cerca de 6,5.

A primeira reação do ensaio de glutamina/glutamato consiste na desaminação enzimática da L-glutamina, por meio da enzima glutaminase (GA), gerando quantidades estequiométricas de amônio (NH₄⁺) e L-glutamato. Em seguida, o L-glutamato foi desidrogenado e convertido a α-cetoglutarato (2-oxoglutarato) via glutamato desidrogenase (GDH), na presença de NAD⁺. As quantidades de L-glutamina e/ou glutamato das amostras foram proporcionais à quantidade de NADH formado, medido a 340 nm em leitoras de microplaca de ELISA (SynergyH1/Biotek, Winooski, VT, EUA).

3.10. Concentração de triglicérides e colesterol total

As concentrações de triglicérides e colesterol no plasma foram determinadas utilizando método colorimétrico através do kit comercial Triglicérides Liquiform e Colesterol Liquiform (Labtest, Lagoa Santa, BR). Para tal, foram adicionados à placa de 96 poços 2 µl de plasma e 200 µl do reagente disponibilizado no kit e incubado por

10 min à 37°C. Em seguida, foi realizada a leitura a 500 nm em leitoras de microplaca de ELISA (SynergyH1/Biotek, Winooski, VT, EUA).

3.11. Atividade da alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) plasmático

Para a detecção da atividade da Alanina aminotransferase (ALT) e Aspartato aminotransferase (AST) foram utilizados Kits colorimétricos de detecção da LABTEST (Lagoa Santa, MG, Brasil). Para a realização da análise 5µl de amostra de plasma e 25µl do reagente 1 foram adicionados à microplaca de 96 poços e incubados à 37 °C por 30 min. Após foi adicionado 25 µl do reagente 2 e incubado por 20 min a temperatura ambiente, 250 µl de NaOH foram adicionados e incubado por 5 min e posteriormente foi realizada a leitura à 490 nm em leitoras de microplaca de ELISA (SynergyH1/Biotek, Winooski, VT, EUA).

3.12. Glutathiona reduzida e oxidada

A determinação das concentrações de GSH e GSSG foi realizada no fígado e no músculo gastrocnêmico através do kit comercial 38185 Quantification kit for oxidized and reduced glutathione (Sigma, St Louis, MO, EUA).

Para o processamento das amostras, 100 mg de tecido foram homogeneizados com 0,5 ml de solução de ácido 5-sulfosalicílico à 5 % utilizando ultratriturax. Posteriormente, o homogenato foi centrifugado à 8000 g por 10 min. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e diluído com água deionizada para a concentração de 0,5% de solução de ácido-5-sulfosalicílico. Para determinação, o homogenato foi separado em 2 tubos com 200 µl. No tubo para medir GSSG, foram adicionados 4ul de *Masking solution*. Após foi adicionado 40 ul de amostras de GSH, GSSG ou curvas em cada poço da placa de 96 poços. Foram adicionados 120 µl de solução *Buffer* e incubado por 1 hora a 37°C. Posteriormente, foram adicionados 20 µl de *Substrate working solution*, 20 µl de *Coenzyme working solution* e 20 µl de *Enzyme working solution* em cada poço e incubado por 10 minutos a 37°C e realizada a leitura a 405 nm em leitoras de microplaca de ELISA (SynergyH1/Biotek, Winooski, VT, EUA). Para o cálculo de GSH foi utilizada a seguinte fórmula: $GSH = GSH\ total - 2x\ GSSG$.

3.13. Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

A determinação das TBARS foi realizada nos tecidos muscular e hepático homogeneizados em TCA 15%, contendo 10 µl de hidroxitolueno butilado (BHT) a 29,5 mM⁶⁶. A proporção da mistura ao tecido foi de 5 ml/g de tecido fresco. Posteriormente, as amostras são fervidas em banho-maria a 100°C por 30 minutos e centrifugadas por 10 minutos a 2500 g a 4 °C, sendo coletado o sobrenadante. A amostra coletada foi misturada em ácido tiobarbitúrico (TBA) na proporção de 1:1 em microplaca de ELISA e foi feita a leitura à 535 nm (SynergyH1/Biotek, Winooski, VT, EUA).

3.14. Determinação de conteúdo de triglicerídeos hepático

Para a quantificação dos triglicerídeos hepáticos as amostras foram processadas conforme metodologia descrita por⁶⁷. Aproximadamente 25 mg de tecido foram homogeneizadas com uma solução clorofórmio-metanol (2:1). Posteriormente, as amostras ficaram sob agitação por 16 horas à 4°C. Após adicionou-se 500 µl de cloreto de sódio à 0,6% seguida de uma centrifugação de 20 min à 2000 g a 4°C. Desprezou-se o sobrenadante e a fase orgânica foi coletada e seca em nitrogênio. O homogenato foi ressuspendido em 50 µl de isopropanol.

A quantidade de triglicerídeos presentes no homogenato foi determinada a partir de kit comercial Triglicérides liquiform Labtest (Labtest, Lagoa Santa, Brasil). Para tanto, 10 µl do padrão ou homogenato foram adicionados à microplaca de 96 poços juntamente com 200 µl do reagente de trabalho. Incubou-se por 10 minutos a 37°C e posteriormente realizada a leitura a 540 nm no espectrofotômetro SynergyH1/Biotek, Winooski, VT, EUA.

3.15. Determinação de conteúdo de Glicogênio

Para determinação de glicogênio foi utilizada a solução de antrona em ácido sulfúrico. O princípio do método consiste em hidrólise do glicogênio à glicose e reação de antrona com glicose. Esta reação promove coloração esverdeada.

Para extração dos tecidos, segundo protocolo estabelecido por Van Der Vies.⁶⁸, foi adicionado Hidróxido de Potássio a 30%, 1 ml para cada 250 mg de tecido e, durante uma hora, os tecidos foram acondicionados em Banho Maria à, aproximadamente, 100°C. Após homogeneização em Vórtex, foi adicionado Sulfato de Sódio (Na₂SO₄), 100 µl para cada 250 mg de tecido, e Solução de Etanol 70%, 3,5

ml para cada 250 mg de tecido. As amostras foram levadas novamente ao Banho Maria, durante 15 minutos. Posteriormente, foram centrifugadas à 1000 rpm, durante 20 minutos, descartando-se o sobrenadante. Para 250 mg de amostra, foi adicionado 1ml de água quente.

Para quantificação, de acordo com estabelecido por Hassid, 1957, foi feita uma curva de glicose entre 10 e 80 $\mu\text{l/ml}$. As amostras, padrões e controle foram pipetadas em microplaca de 96 poços. Foram adicionados 150 μl de solução de antrona. A leitura foi efetuada em 650 nm no espectômetro SynergyH1/Biotek, Winooski, VT, EUA.

3.16. Quantificação de proteína

Para quantificar a concentração da proteína no homogenato foi utilizado o kit comercial Pierce 660 nm Protein Assay reagent (Thermo Scientific, Rockford, EUA). Para o ensaio, primeiramente os homogenatos de fígado e músculo foram diluídos em água deionizada 30x e 20x respectivamente. Os padrões de albumina foram diluídos em diluição seriada 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250 e 0. Na placa de 96 poços de Elisa foram adicionados 10 μl de amostra diluída e padrões, e após adicionou-se 150 μl do reagente de detecção e foi feita a leitura em ELISA à 562 nm (SynergyH1/Biotek, Winooski, VT, EUA). As leituras foram plotadas a partir da curva de albumina.

3.17. Extração da Fração Nuclear e Citoplasmática do músculo e fígado

Amostras de fígado e músculo foram extraídas conforme kit comercial de extração nuclear Cayman (Cayman, Ann Arbor, MI, EUA). Para a extração, o tecido foi homogeneizado com tampão hipotônico de extração contendo inibidores de fosfatase e protease, DTT 1 mM e 10% NP-40 (3 ml por grama de tecido) utilizando o ultriturax e incubado por 15 minutos no gelo. Posteriormente, o homogenato foi centrifugado à 300 g por 10 minutos a 4°C e recolhido o sobrenadante, sendo correspondente a fração citoplasmática e estocado no gelo. O pélete formado foi ressuspensionado com 500 μl de tampão hipotônico de extração e incubado novamente por 15 min no gelo. Após adicionou-se 50 μl de NP-40 a 10% e o homogenato formado foi centrifugado a 14 000 g por 30 seg a 4°C. O sobrenadante foi novamente recolhido como fração citosólica e estocado a -80°C.

O pélete formado foi ressuspensionado em 100 μl de *buffer* de extração nuclear com inibidores de protease e fosfatase, agitado no vórtex por 15 seg e ficou sob agitação leve no rocker com gelo por mais 15 min, este processo foi repetido duas

vezes. O homogenizado foi centrifugado por 10 min à 14000 g à 4°C. O sobrenadante, correspondente à fração nuclear, foi recolhido e estocado em -80°C. Posteriormente foi mensurada a quantidade de proteína presente nas frações citoplasmáticas e nuclear conforme descrito no item 5.16.

3.18. Translocação nuclear dos Fatores de transcrição NRF-2 e NF-κB

A Translocação do NRF-2 foi mensurada utilizando o kit NRF-2 transcription factor assay kit (Cayman, Ann Arbor, MI- EUA) e para avaliar a Translocação do P65 do NFκB foi utilizado o kit NF-κB (p65) Transcription Factor Assay Kit(Cayman, Ann Arbor, MI- EUA).

Estes kits utilizam um método não radioativo e sensível para detectar a atividade de ligação do DNA do fator de transcrição específico em extratos nucleares e lisados de células inteiras. Um ensaio de imunoabsorção enzimática de 96 poços (ELISA) substitui o ensaio de mudança de mobilidade eletroforética radioativa pesada (EMSA). Uma sequência específica de DNA de cadeia dupla (dsDNA) contendo o elemento de resposta é imobilizada nos poços de uma placa de 96 poços. O fator de transcrição contido em um extrato nuclear se liga especificamente ao elemento de resposta. O fator de transcrição é detectado pela adição de anticorpo primário específico dirigido contra o fator de transcrição.

Para a realização do método em ambos os kits, 10 µl de amostra nuclear foram adicionados em cada poço da placa de 96 poços juntamente com 90 µl do reagente CTFB e incubado *overnight* à 4 °C sem agitação. Posteriormente, a placa foi lavada 5 vezes com 200 µl de *Wash Buffer* e adicionados 100 µl de anticorpo primário, sendo incubado por 1 hora sem agitação. A placa foi lavada 5 vezes com 200 µl de *Wash Buffer* e incubada por 1 hora com 100 µl de anticorpo secundário. Após a incubação, a placa foi lavada mais 5 vezes e adicionou-se 100 µl de *developing solution* em cada poço. A placa ficou sob agitação por 45 min em temperatura ambiente e adicionado 100 µl de *stop solution*. A placa foi lida no espectrofotômetro (SynergyH1/Biotek, Winooski, VT, EUA) à 450 nm. A absorbância gerada foi corrigida pela quantidade de proteína presente no extrato nuclear da amostra.

3.19. Conteúdo proteico através da técnica de Western Blot

Quantidades iguais de proteína, determinadas por metodologia descrita por Kit BCA, foram carregadas em gel de poli-acrilamida para eletroforese SDS-PAGE⁶⁹ em

cuba Mini-Protean-II (Bio-Rad). Após a corrida em gel, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (GE Health, Care-Amersham) por eletrotransferência (Bio-Rad). A membrana foi incubada com os seguintes anticorpos primários: HSP-70 (1:1000 Cell Signaling Technology), AKTp 308 (1:500 Santa Cruz, Dallas- USA) e AKT total (1:500 Santa Cruz, Dallas- USA). A análise do conteúdo celular de α -tubulina foi utilizada como normalizador, utilizando os mesmos métodos e instrumentos para a incubação com anticorpo α -tubulina (1:10000 Invitrogen). Após incubação (overnight a 4°C) e lavagem, foi realizada a incubação com solução de anticorpo secundário (Peroxidase-conjugated AffiniPure IgG) por 1 h. Terminada a incubação, lavou-se com TBST. Para a revelação das membranas, foi utilizado Kit ECL Western Blotting Biorad (G.E, EUA) no equipamento Image quant GE (G.E , EUA).

3.20. Histologia

3.20.1. Coloração por H & E

O fígado foi fixado em solução de formaldeído 10%, durante 8 horas. Ao término do período de fixação, os fragmentos foram armazenados em cassetes (individuais) e mantidos em solução de álcool 70% *overnight*. Posteriormente, o material foi submetido a uma sequência de banhos com álcool 95%, álcool 100% e xilol. Ao término dos banhos, o material foi incluído em parafina, a uma temperatura de 60°C. Os cortes foram realizados em micrótomo (Zeiss), com espessura de 5 μ m. Após disposição em lâminas de microscopia, foi realizada a coloração com hematoxilina e eosina (H&E) para avaliação das gotículas de gordura. As imagens (20 de cada animal para fígado e 10 para tecido adiposo) foram obtidas utilizando um microscópio Nikon Eclipse Ti-U na objetiva de 20X, com câmera digital Nikon DS-Ri1 e NIS-Elements BR 3.1 software. As imagens de fígado foram projetadas em um monitor LCD de alta resolução, um sistema teste com 270 pontos (P_T) foi fixado no monitor, cada ponto individual (P_I) que ficava sobre as gotículas de gordura era contado. Após essa contagem foi feita uma relação de P_I/P_T , essa relação gerou uma densidade de volume de esteatose hepática (Adaptado de CATTA-PRETA,⁷⁰.

3.20.2. Coloração por Oil Red O (ORO)

O fígado foi embebido em um molde com tissue-tek (Thermo Scientific), logo após foi colocado em um recipiente contendo álcool isopropílico e congelado em nitrogênio líquido (N_2). Depois, foi cortado no criostato (Microm H560). Foram feitos

três cortes de 12 µm, de diferentes partes do tecido, por lâmina (duas lâminas por animal). As lâminas foram coradas com ORO por 5 minutos, em seguida lavadas em água corrente por 30 minutos, e contra coradas com hematoxilina de Harys por 5 minutos, em seguida lavadas em água corrente por 5 minutos. As imagens (10 de cada animal) foram obtidas utilizando um microscópio Nikon Eclipse Ti-U na objetiva de 20X, com câmera digital Nikon DS-Ri1 e NIS-Elements BR 3.1 software. Essas imagens foram projetadas em um monitor LCD de alta resolução. A quantificação do acúmulo de gordura no tecido foi realizada através do programa Image J, a imagem foi aberta pelo programa, convertida em escala de cinza 8-bit (Image → type → 8-bit). Depois foi seguida a seguinte sequência: Image → Adjust → Threshold; Analyse → Set measurements, quando esse recurso foi aberto, apareceu uma caixa, que foi marcado limite do Threshold, área e densidade integrada. Os resultados foram obtidos através de Analyse → Measure ⁷¹. Foram utilizados como resultado os valores das áreas, que correspondia à quantidade de gordura no tecido.

3.21. Dosagem de insulina por radioimunoensaio

A quantidade de insulina secretada foi determinada por radioimunoensaio. Foi feita uma solução reagente, contendo uma quantidade conhecida de anticorpo, uma quantidade conhecida do hormônio marcado radioativamente (insulina marcada com iodo – ¹²⁵I, PerkinElmer, Turku, Finlândia) e uma quantidade desconhecida de hormônio não radioativo (amostra). As duas formas de hormônio (radioativa e amostra não-radioativa) competem pelos mesmos locais de ligação no anticorpo. Portanto, quanto mais hormônio não-radioativo (amostra) estiver presente, menos o hormônio radioativo irá se ligar.

O complexo insulina-anticorpo marcado formado foi precipitado com polietilenoglicol e dosado em contador do tipo gama (PerkinElmer, Turku, Finlândia). De acordo com a curva-padrão de concentrações conhecidas de hormônio radioativo, foi determinada a concentração do hormônio não-radioativo em cada amostra.

3.22 Expressão genica por PCR *real time*

Para isolamento do RNA total, amostras pesando aproximadamente 50 mg do fígado foram dissecadas e submetidas a homogeneização em 1 mL de reagente *Trizol* (*Thermofisher*), seguindo as recomendações do fabricante e com o auxílio de homogeneizador *Polytron*.

Após a primeira etapa, foram adicionados 0,2 ml de clorofórmio ao homogenado e, posteriormente, realizou-se uma centrifugação a 12.000 g para recuperação da fase aquosa superior. A esta se adicionaram 0,5 mL de isopropanol e nova centrifugação a 12.000 g foi feita para obtenção do precipitado. Descartou-se o sobrenadante e, ao sedimentado, 1 mL de etanol 75% foi adicionado, procedimento seguido de centrifugação a 7500 g. O sobrenadante foi novamente descartado e o procedimento de lavagem com etanol foi repetido. O precipitado final, sem resíduo de etanol, foi ressuspensão em 100 a 200 µl de água nanopura.

A quantificação espectrofotométrica de RNA foi realizada com 1 ul da solução da amostra a 260 nm, utilizando sistema NanoDrop, modelo 2000c (ThermoFisher, USA). Para averiguação da pureza da solução de ácido nucleico, foram feitas leituras adicionais a 230 e a 280 nm para cálculo das razões 260/230 e 260/280.

Para a obtenção do cDNA, em cada tubo foi adicionada 2 µg de RNA e tratada com DNase (Invitrogen, USA) e adicionado ao termociclador (ThermoFisher, USA) à 25ª por 15 minutos, seguido 65ª C por 10 min com de adição de EDTA 25mM a fim de inibir a DNase. Para a síntese do cDNA foi adicionado as amostras Random Primer (Invitrogen, ThermoFisher, USA) e levado ao termociclador por 10 minutos à 70°C. E posteriormente foi adicionado o mix com a transcriptase reversa (SuperscriptII, Invitrogen, ThermoFisher, USA) e levado ao termociclador nos seguintes ciclos: 25°C - 10 minutos, 42°C-2 minutos, 42°C-50 min e 70°C – 15 minutos. Em seguida as amostras foram congeladas para posterior reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR-*Real time*)

Para o RT-PCR -*Real time* foi adicionado ao tubo 2 ul de amostra juntamente com o mix de primers e syber green (Invitrogen, USA), PCR foi realizado no Rotor gene Q 5 plex platform (Qiagen, USA).

Foram avaliados os seguintes genes:

Tabela 1- Sequência dos primers dos genes avaliados

Gene	Primer
Sirt-1	Fw – CTGACTGGAGCTGGGGTTTC Rv – ACATGGCTTGAGGATCTGG
HSPB1	Fw-ATCACTGGCAAGCACGAAGA Rv-GGCCTCGAAAGTAACCGGAA
GCLC	Fw – CATCAATGGGAAGGAAGGGGTA Rv – TCGGGTGTCCACATCAACTTC
GPX1	Fw – CGGGACTACACCGAGATGAAC Rv – TTGCCATTCTCCTGGTGTCC
Catalase	Fw – GTCCACCCTGACTATGGGGC Rv- GAATTGCGTTCTTAGGCTTCTCAG
DGAT2	Fw-ACTGGAACACGCCCAAGAAA Rv-GTAGTCTCGGAAGTAGCGCC
ACC	Fw – ACCAGGTCATCAGTACACCATC Rv –ACTTTCTTTTTTCATCCAGCCTTCC
AGS	Fw- CCTGGACCATGTGAGATACCG Rv – GAGTGCCTGTCGCCTATCTT
SRBP-1	Fw-AGCAGTCACCAGCTTCAGTC Rv-GGTCATGTTGGAAACCACGC
ChRBP	Fw- TGGAGACGGTCATTTCTTCAGAT Rv – GGATTCTGGGGTCTCTTGAGG
IL-6	Fw-GAACAGTAACCCCGACTCAGGAAA Rv-CAGTGCCTGTCAGAAGAGAGAT
IL-1β	Fw-AATGAAAGACGGCACACCCA Rv- CTCTGCTTGTGAGGTGCTGA
TNF-α	Fw- ATGGCCTCCCTCTCATCAGT Rv TTTGCTACGACGTGGGCTAC
B2M	Fw – GCACTTTGTCCGGAGTGATG Rv – ATACATAGGGGATGGGCTGG

Legenda FW: Forward - Rv: Reverse

Para cálculo, resumidamente, para cada condição acima descrita, foram calculados os valores de ΔCt de cada gene de interesse ($\Delta Ct = Ct$ gene de interesse - Ct média geométrica do gene constitutivo). Em seguida, tomando-se como referência os valores de ΔCt média geométrica WT, calculou-se os valores de $\Delta\Delta Ct$, resultados da subtração $WTt - \Delta Ct$ Tratamento.

5.2. Análise estatística

Os dados estão expressos em média \pm erro padrão da média. A normalidade foi previamente analisada pelo teste Shapiro-Wilk. Os resultados observados nos grupos experimentais foram analisados através do teste de ANOVA de uma via (*One-way ANOVA*), seguido de teste de pos-hoc de Tukey, quando apropriado. Para análise estatística dos experimentos de GTT e ITT foi utilizado o teste ANOVA de duas vias (*Two-way ANOVA*), seguido de teste pos-hoc de Bonferroni.

A homogeneidade de variâncias foi previamente testada pelo teste de Levene. Um valor alfa de 5% foi adotado para rejeitar a hipótese de nulidade e a elaboração

dos cálculos e gráficos foi realizada através do pacote estatístico SPSS versão 20.0 para Windows e Graphpad Prisma 5.

4.RESULTADOS

4.1. Consumo de ração e ingestão hídrica

Tabela 2 - Consumo de ração e ingestão hídrica durante o experimento.

	Ob/Ob				
	WT	CTRL	DIP	GLN	ALA
Consumo de ração (g/sem.)	3,67 ± 0,27	6,33 ± 0,17*	5,74 ± 0,17*	5,06 ± 0,13**	5,10 ± 0,22**
Ingestão hídrica (mL/dia)	7,04 ± 0,55	6,08 ± 0,19	7,78 ± 0,28#	7,53 ± 0,41#	7,55 ± 0,19#

Camundongos C57/BL6 Ob/Ob suplementados durante 40 dias por via oral com solução contendo 4% de: Dipeptídeo (DIP) ou L-glutamina (GLN) ou L-alanina (ALA) ou água filtrada (CTRL Ob/Ob e WT). Resultados expressos em média ± erro padrão da média (n = 8 por grupo).

* Representa diferença estatística significativa quando comparado com WT (p<0,05 *One-way ANOVA, pos-hoc Tukey HSD*).

Representa diferença estatística significativa quando comparado com CTRL Ob/Ob (p<0,05 *One-way ANOVA, pos-hoc Tukey HSD*).

O consumo de ração e a ingestão hídrica foram mensurados uma vez por semana durante os 40 dias de experimento. Todos os grupos de animais Ob/Ob (CTRL, DIP, GLN e ALA) apresentaram um aumento significativo no consumo de ração quando comparado ao grupo selvagem (WT, p<0,05). Este resultado era esperado uma vez que os animais Ob/Ob têm como característica a hiperfagia (tabela 2). Em relação aos grupos suplementados, os animais que receberam L-glutamina (GLN) ou L-alanina apresentaram redução significativa no consumo de ração, quando comparado ao grupo CTRL.

Em relação à ingestão hídrica, todos os animais suplementados apresentaram aumento significativo (p<0,05) na ingestão hídrica quando comparados aos grupos WT e CTRL, não havendo diferença entre os grupos suplementados (Tabela 2).

4.2. Peso corporal

Tabela 3 - Relação do peso inicial, ganho de peso e peso do fígado e músculo esquelético.

	Ob/Ob				
	WT	CTRL	DIP	GLN	ALA
Peso inicial (g)	24,89 ± 0,6	45,9 ± 1,5*	45,9 ± 1,5*	45,19 ± 0,8*	45,43 ± 1,0*
Ganho de peso (g)	0,99 ± 0,36	7,15 ± 0,98*	6,90 ± 0,95*	5,21 ± 0,53*	5,89 ± 0,51*
Peso do fígado (% do peso corporal)	4,80 ± 1,1	6,70 ± 0,4	6,80 ± 0,8	6,20 ± 0,5	6,80 ± 0,5
Peso do músculo (% do peso corporal)	0,70 ± 0,08	0,40 ± 0,03*	0,30 ± 0,016*	0,40 ± 0,03*	0,30 ± 0,03*

Camundongos C57/BL6 Ob/Ob suplementados durante 40 dias por via oral com solução contendo 4% de: Dipeptídeo (DIP) ou L-glutamina (GLN) ou L-alanina (ALA) ou água filtrada (CTRL Ob/Ob e WT). Resultados expressos em média ± erro padrão da média (n = 8 por grupo).

* Representa diferença estatística significativa quando comparado com WT ($p < 0,05$ *One-way ANOVA, pos-hoc Tukey HSD*).

Representa diferença estatística significativa quando comparado com CTRL Ob/Ob ($p < 0,05$ *One-way ANOVA, pos-hoc Tukey HSD*).

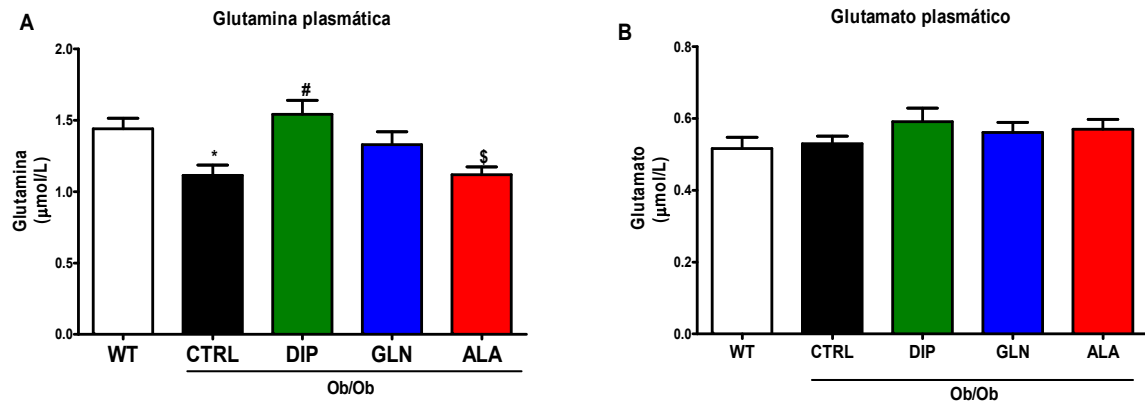
Como pode ser observado na Tabela 3, todos os grupos de animais Ob/Ob apresentaram aumento peso corporal inicial ($p < 0,05$). O peso corporal dos animais foi utilizado como critério de distribuição dos animais Ob/Ob nos grupos experimentais (CTRL, DIP, GLN e ALA), de forma que não houvesse diferença estatística entre os grupos.

O perfil de ganho de peso se manteve durante os 40 dias de suplementação, ou seja, os grupos com animais Ob/Ob apresentaram um ganho de peso maior quando comparado ao WT ($p < 0,05$). Não houve alterações no perfil de ganho de peso entre os grupos suplementados quando comparados ao grupo controle obeso (tabela 3).

Em relação ao peso dos tecidos, todos grupos com animais Ob/Ob apresentaram uma redução no peso do músculo gastrocnêmico quando comparado ao grupo selvagem (WT $p < 0,05$). A suplementação com os aminoácidos não alterou significativamente o peso dos tecidos (Tabela 3).

4.3. Glutamina corporal

Figura 2 - Concentração plasmática de glutamina(A) e glutamato (B).



Camundongos C57/BL6 Ob/Ob suplementados durante 40 dias por via oral com solução contendo 4% de: Dipeptídeo (DIP) ou L-glutamina (GLN) ou L-alanina (ALA) ou água filtrada (CTRL Ob/Obe WT). Amostras de plasma foram extraídas após o sacrifício de animais. Resultados expressos em média \pm erro padrão da média (n = 8 por grupo).

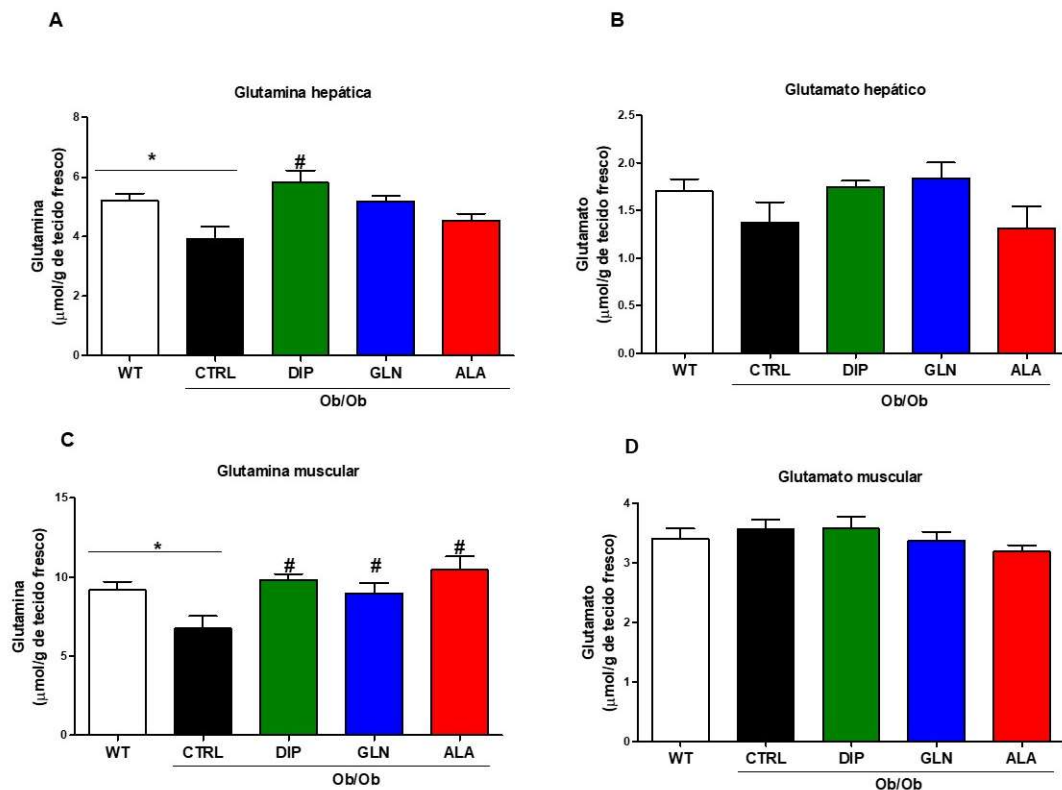
* Representa diferença estatística significativa quando comparado com WT ($p < 0,05$ *One-way ANOVA, pos-hoc Tukey HSD*).

Representa diferença estatística significativa quando comparado com CTRL Ob/Ob ($p < 0,05$ *One-way ANOVA, pos-hoc Tukey HSD*).

\$ Representa diferença estatística significativa quando comparado com DIP ($p < 0,05$ *One-way ANOVA, post-hoc Tukey HSD*).

De acordo com a figura 2, a concentração plasmática de glutamina reduziu no CTRL Ob/Ob e suplementado com L-alanina quando comparado com WT ($p < 0,05$). Os animais suplementados com DIP apresentaram um aumento na concentração plasmática de glutamina quando comparados aos grupos ALA e CTRL ($p < 0,05$). A concentração de glutamato plasmático não se alterou significativamente entre os grupos.

Figura 3 - Concentração de glutamina (A) e glutamato (B) hepático, glutamina (C) e glutamato muscular (D).



Camundongos C57B16 Ob/Ob, suplementados durante 40 dias por via oral com solução contendo 4% de: Dipeptídeo (DIP) ou L-glutamina (GLN) ou L-alanina (ALA) ou água filtrada (CTRL e WT). Resultados expressos em média \pm erro padrão da média (n = 8 por grupo).

*Representa diferença estatística significativa quando comparado com WT ($p < 0,05$, *One-way ANOVA, post-hoc Tukey HSD*).

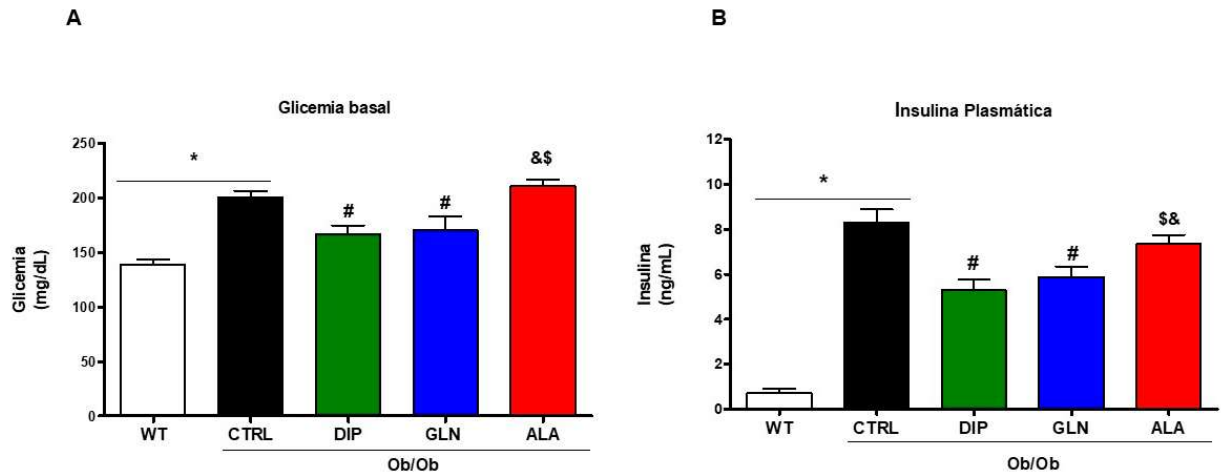
Representa diferença estatística significativa quando comparado com CTRL ($p < 0,05$, *One-way ANOVA, post-hoc Tukey HSD*).

Em relação à concentração de glutamina hepática houve redução no grupo CTRL Ob/Ob quando comparado ao WT ($p < 0,05$). Somente o grupo DIP foi eficaz em aumentar significativamente a concentração de glutamina quando comparado ao grupo CTRL Ob/Ob. Entretanto, observa-se um aumento de 32,3% no grupo GLN quando comparado ao grupo CTRL Ob/Ob (Figura 3A).

De acordo com a figura 3C e 3D a concentração de glutamina no tecido muscular esquelético foi significativamente menor no grupo CTRL Ob/Ob, quando comparado ao grupo WT. Nos grupos Ob/Ob suplementados com DIP, ALA e GLN, a concentração de glutamina no tecido muscular esquelético se apresentou elevada, se comparada ao grupo CTRL Ob/Ob (Tabela 3, $p < 0,05$).

4.4. Homeostasia da glicose

Figura 4 - Glicemia basal (A) e insulina plasmática (B).



Camundongos C57B16 Ob/Ob suplementados durante 40 dias por via oral com solução contendo 4% de: Dipeptídeo (DIP) ou L-glutamina (GLN) ou L-alanina (ALA) ou água filtrada (CTRL e WT). Glicemia foi mensurada após 4 horas de restrição alimentar e a insulina foi mensurada após 2 horas de restrição alimentar. Resultados expressos em média \pm erro padrão da média (n = 8 por grupo).

* Representa diferença estatística significativa quando comparado com WT ($p < 0,05$ *One-way ANOVA*, *pos-hoc Tukey HSD*).

Representa diferença estatística significativa quando comparado com CTRL Ob/Ob ($p < 0,05$ *One-way ANOVA*, *pos-hoc Tukey HSD*).

\$ Representa diferença estatística significativa quando comparado com DIP ($p < 0,05$ *One-way ANOVA*, *pos-hoc Tukey HSD*).

& Representa diferença estatística significativa quando comparado com GLN ($p < 0,05$ *One-way ANOVA*, *pos-hoc Tukey HSD*).

A glicemia foi mensurada após 4 horas de restrição alimentar (Figura 4A). Uma das características do animal Ob/Ob é a hiperglicemia e, como esperado, o grupo CTRL apresentou glicemia significativamente maior quando comparado ao grupo WT. Entre os grupos suplementados, aqueles suplementados com L-glutamina (DIP e GLN) reduziram significativamente a glicemia basal em relação ao grupo CTRL ($p < 0,05$). Entretanto, no grupo suplementado com L-alanina, a glicemia aumentou significativamente ($p < 0,05$) quando comparado aos grupos WT, DIP e GLN.

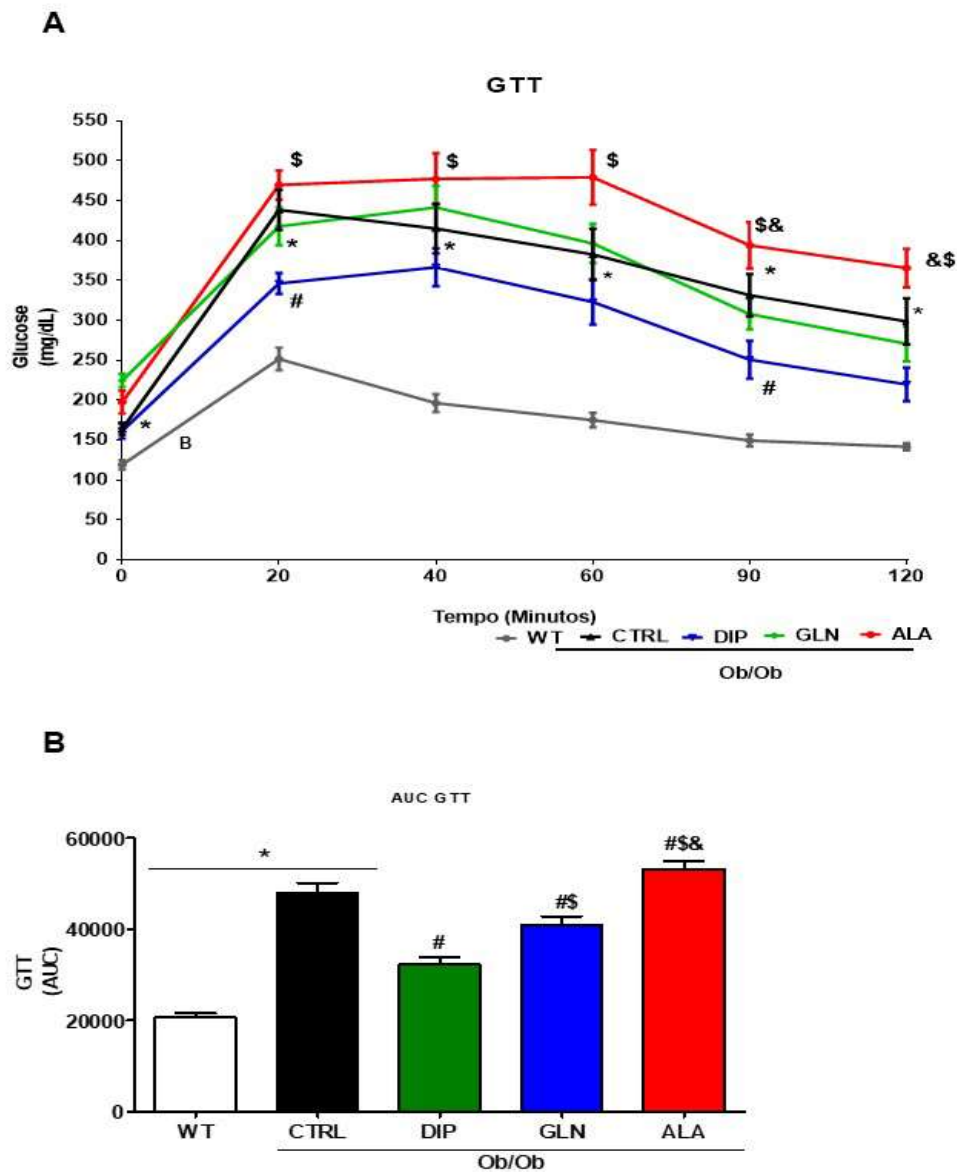
Uma das características dos animais Ob/Ob é a hiperinsulinemia. Todos grupos com animais Ob/Ob apresentaram a concentração de insulina plasmática aumentada em relação ao WT ($p < 0,05$). Cabe salientar que os animais CTRL Ob/Ob apresentaram aumento significativo de 8 vezes na insulinemia (Figura 4B). As suplementações com L-glutamina, tanto na forma livre quanto o dipeptídeo, reduziram a insulinemia quando comparado ao CTRL Ob/Ob ($p < 0,01$ e $p < 0,05$ DIP e GLN,

respectivamente). No entanto, os animais suplementados com L-alanina permaneceram com a concentração plasmática de insulina aumentada em relação aos demais grupos suplementados ($p < 0,05$).

O teste de tolerância à glicose (GTT) foi realizado na 4ª semana de suplementação durante o período da tarde e após 4 horas de restrição alimentar. De acordo com a figura 4, no tempo zero, somente o grupo GLN iniciou o teste com a glicemia aumentada quando comparado ao WT e durante o teste todos os grupos apresentaram glicemia aumentada quando comparados ao WT, o que refletiu em uma maior área sob a curva em todos os grupos Ob/Ob (Figura 5B, $p < 0,05$).

O grupo DIP apresentou redução significativa nas glicemias no início (20 min) e ao final do teste (90 e 120 min), o que refletiu em uma área sob a curva menor quando comparado ao CTRL (Figura 5). O grupo GLN também apresentou uma menor área sob a curva quando comparado ao grupo CTRL (Figura 5), o que demonstra o efeito da suplementação de glutamina na melhora da tolerância à glicose. Entretanto, o grupo suplementado com L-alanina apresentou glicemia mais elevada em praticamente todos os tempos estudados quando comparado ao DIP e área sob a curva significativamente aumentada quando comprado aos demais grupos experimentais.

Figura 5 - Teste de tolerância à glicose (GTT) medido por tempo (A) e Área sob a curva (B, AUC).



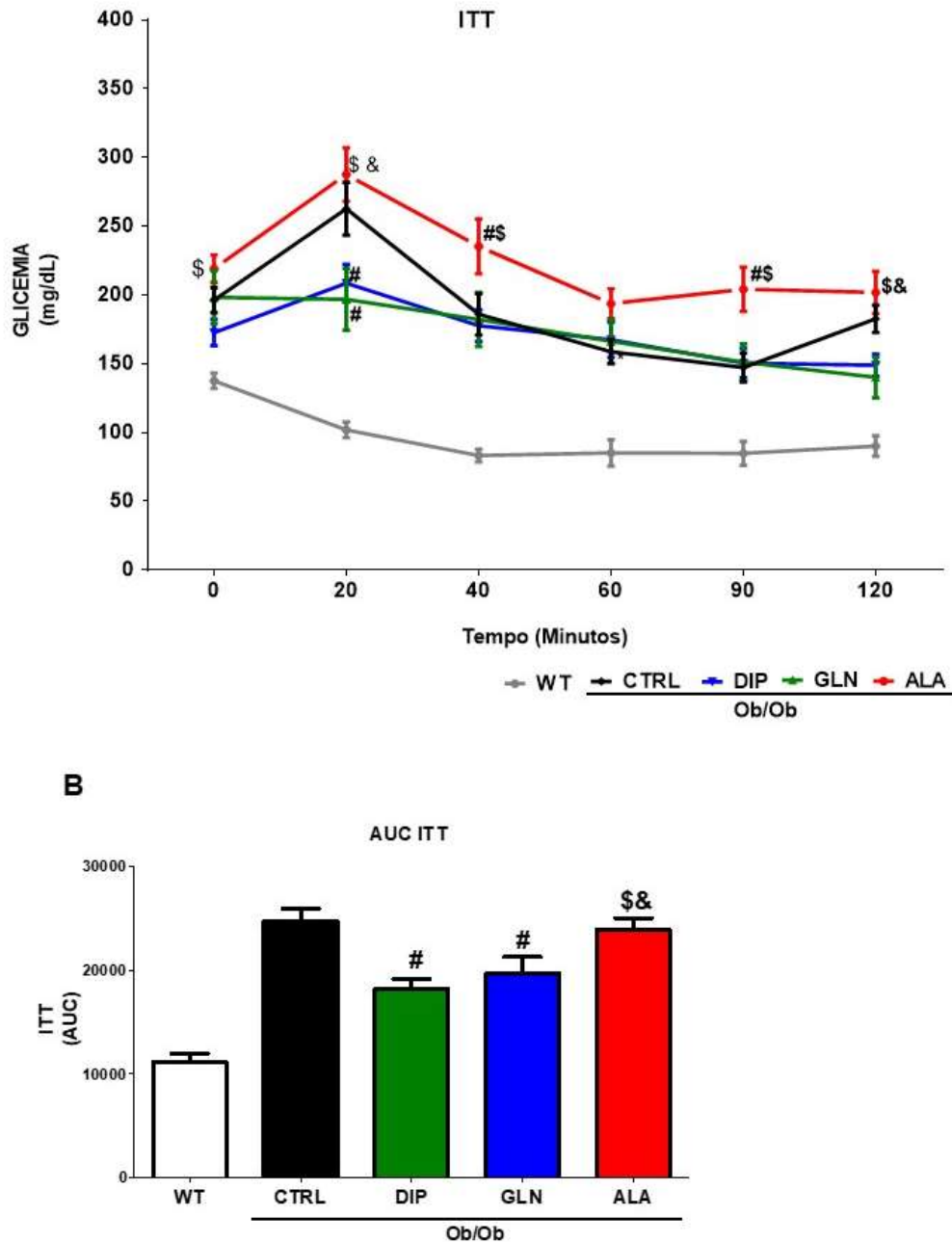
Camundongos C57/BL6 Ob/Ob suplementados durante 40 dias por via oral com solução contendo 4% de: Dipeptídeo (DIP) ou L-glutamina (GLN) ou L-alanina (ALA) ou água filtrada (CTRL Ob/Ob e WT). O teste foi realizado na 4^o semana de suplementação. Para normalizar a glicemia, a ração foi retirada 4 horas antes do teste. Resultados expressos em média \pm erro padrão da média (n = 10 por grupo).

* Representa diferença estatística significativa quando comparado com WT ($p < 0,05$, One-way ANOVA, pos-hoc Tukey HSD e para curva tempo x glicemia $p < 0,05$, two-way ANOVA, pos-hoc Bonferonni HSD).
Representa diferença estatística significativa quando comparado com CTRL Ob/Ob ($p < 0,05$, One-way ANOVA, pos-hoc Tukey HSD e para curva tempo x glicemia $p < 0,05$, two-way ANOVA, pos-hoc Bonferonni HSD).

\$ Representa diferença estatística significativa quando comparado com DIP ($p < 0,05$, One-way ANOVA, posteste Tukey HSD e para curva tempo x glicemia $p < 0,05$, two-way ANOVA, pos-hoc Bonferonni HSD).

& Representa diferença estatística significativa quando comparado com GLN ($p < 0,05$, One-way ANOVA, pos-hoc Tukey HSD e para curva tempo x glicemia $p < 0,05$, two-way ANOVA, pos-hoc Bonferonni HSD).

Figura 6 - Teste de tolerância à insulina (ITT) (A) e AUC (B).



Camundongos C57B16 Ob/Ob, suplementados durante 40 dias por via oral com solução contendo 4% de: Dipeptídeo (DIP) ou L-glutamina (GLN) ou L-alanina (ALA) ou água filtrada (CTRL e WT). O teste foi realizado na 5ª semana de suplementação. Para normalizar a glicemia a ração foi retirada 4 horas antes do teste. Resultados expressos em média \pm erro padrão da média (n = 10 por grupo).

* Representa diferença estatística significativa quando comparado com WT ($p < 0,05$ One-way ANOVA, *pos-hoc Tukey HSD* e *para curva tempo x glicemia* $p < 0,05$).

Representa diferença estatística significativa quando comparado com CTRL Ob/Ob ($p < 0,05$ One-way ANOVA, *pos-hoc Tukey HSD* e *para curva tempo x glicemia* $p < 0,05$, two-way ANOVA, *pos-hoc Bonferonni HSD*).

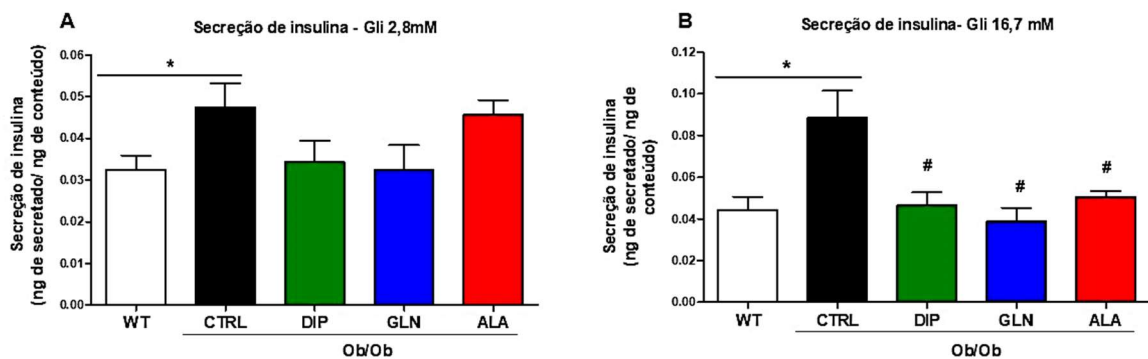
\$ Representa diferença estatística significativa quando comparado com DIP ($p < 0,05$ One-way ANOVA, *pos-hoc Tukey HSD* e *para curva tempo x glicemia* $p < 0,05$, two-way ANOVA, *pos-hoc Bonferonni HSD*).

& Representa diferença estatística significativa quando comparado com GLN ($p < 0,05$ *One-way ANOVA*, *pos-hoc Tukey HSD* e *para curva tempo x glicemia* $p < 0,05$, *two-way ANOVA*, *pos-hoc Bonferonni HSD*).

O teste de tolerância à insulina (ITT) foi realizado na 5ª semana de suplementação. Na figura 6 se observa que o CTRL Ob/Ob apresentou glicemia mais elevada quando comparados aos animais selvagens (WT), refletindo em uma área sob a curva maior no CTRL Ob/Ob (Figura 6) quando comparados ao WT ($p < 0,05$), entretanto este fato não pode ser comparado estatisticamente, pois a dose de insulina administrada nos animais Ob/Ob foi maior que a administrada no animais WT.

Nos animais suplementados, os grupos DIP e GLN apresentaram glicemia menor que o CTRL Ob/Ob no tempo 20 min e menor AUC quando comparado ao CTRL Ob/Ob ($p < 0,05$), indicando que a suplementação com glutamina aumenta a sensibilidade à insulina. Além disso, assim como no GTT, o grupo ALA obteve maior AUC quando comparados aos grupos DIP e GLN ($p < 0,05$).

Figura 7 - Secreção de insulina das ilhotas pancreáticas em diferentes concentrações de glicose.



Camundongos C57/BL6 Ob/Ob suplementados durante 40 dias por via oral com solução contendo 4% de: Dipeptídeo (DIP) ou L-glutamina (GLN) ou L-alanina (ALA) ou água filtrada (CTRL e WT) Ilhotas pancreáticas foram extraídas e incubadas por 1 hora em 2,8 mM ou 16,7 mM de glicose. Resultados expressos em quantidade secretada dividido pelo conteúdo total de insulina nas ilhotas. Resultados expressos em média \pm erro padrão da média ($n = 6$ por grupo).

* Representa diferença estatística significativa quando comparado com WT ($p < 0,05$ *One-way ANOVA*, *pos-hoc Tukey HSD*).

Representa diferença estatística significativa quando comparado com CTRL Ob/Ob ($p < 0,05$ *One-way ANOVA*, *pos-hoc Tukey HSD*).

Após a morte dos animais, as ilhotas pancreáticas extraídas do pâncreas de todos os grupos experimentais foram estimuladas por uma hora com tampão Krebs Henseleit contendo baixa (2,8 mM, equivalente a cerca de 50 mg de glicose/dL) ou

alta concentração de glicose (16,7 mM, equivalente a cerca de 300 mg de glicose/dL). Nas duas concentrações de glicose o grupo CTRL Ob/Ob apresentou maior secreção de insulina quando comparado ao grupo WT ($p < 0,05$). Na presença de alta concentração de glicose todos os grupos suplementados reduziram significativamente a secreção de insulina quando comparados ao CTRL Ob/Ob ($p < 0,05$).

4.5. Colesterol, triglicerídeos e marcadores do metabolismo hepático

Tabela 4- Colesterol total e triglicerídeos e marcadores hepáticos.

	Ob/Ob				
	WT	CTRL	DIP	GLN	ALA
Colesterol total (mg/dL)	127 ± 16,8	196 ± 25,7*	119 ± 14,5 [#]	103 ± 14,9 [#]	112 ± 17 [#]
Triglicerídeos Plasmático (mg/dL)	46,7 ± 2,7	89,2 ± 11,6*	49,0 ± 4,69 [#]	55,28 ± 5,1 [#]	56,6 ± 5,7 [#]
Triglicerídeos hepáticos (mg/tecido fresco)	50,43 ± 7,9	101,2 ± 13,5*	67,0 ± 3,7 [#]	49,6 ± 7,1 [#]	53,5 ± 4,5 [#]
ALT (U/L)	40,1 ± 6,6	99,3 ± 11,6*	88,6 ± 11,4	41,8 ± 12,8 [#]	69,2 ± 6,8
AST (U/L)	58,3 ± 10,3	93,1 ± 10,21*	104,1 ± 16,6	56,00 ± 12,5 [#]	100,5 ± 22,2
Gama GT (U/L)	172,4 ± 9,9	229,0 ± 26,42	223,5 ± 16,06	173 ± 23,31	191,6 ± 18,99
Albumina (mg/dL)	2.07 ± 0.19	2.26 ± 0.24	2.31 ± 0.27	2.57 ± 0.32	2.89 ± 0.06

Camundongos C57B16 Ob/Ob, suplementados durante 40 dias por via oral com solução contendo 4% de: Dipeptídeo (DIP) ou L-glutamina (GLN) ou L-alanina (ALA) ou água filtrada (CTRL e WT). Resultados expressos em média ± erro padrão da média (n = 8 por grupo).

* Representa diferença estatística significativa quando comparado com WT ($p < 0,05$ *One-way ANOVA*, *pos-hoc Tukey HSD*).

Representa diferença estatística significativa quando comparado com CTRL Ob/Ob ($p < 0,05$ *One-way ANOVA*, *pos-hoc Tukey HSD*).

De acordo com tabela 4, a concentração plasmática de colesterol total e triglicerídeos são mais altas no grupo CTRL Ob/Ob quando comparado ao grupo WT ($p < 0,05$). Entre os suplementados, os grupos DIP, GLN e ALA reduziram as concentrações plasmáticas de colesterol total e triglicerídeos quando comparados ao grupo CTRL Ob/Ob ($p < 0,05$).

A esteatose hepática é caracterizada triglicerídeos nos hepatócitos^{72; 73}. De acordo com a figura 11, no grupo CTRL Ob/Ob se observa um aumento significativo na concentração de TG quando comparado ao WT. Contudo, todas as suplementações reduziram significativamente a concentração de TG hepático quando comparado ao CTRL Ob/Ob (Tabela 4)

Em relação aos marcadores de função hepática, as transaminases AST e ALT estão elevadas no grupo CTRL Ob/Ob quando comprado ao grupo WT ($p < 0,05$), o que indica um prejuízo da função hepática destes animais. Porém, a suplementação com L-glutamina livre reduziu significativamente as concentrações plasmáticas de ALT e AST quando comprado ao grupo CTRL Ob/Ob e também reduziu significativamente ALT quando comprado ao DIP ($p < 0,05$). Em relação a concentração de albumina e gama gt plasmática não houve alteração significativa entre os grupos (Tabela 4).

4.6. Creatinina e Ureia

Tabela 5- Concentração plasmática de creatinina e ureia

	Ob/Ob				
	WT	CTRL	DIP	GLN	ALA
Creatinina (mg/dL)	0,60 ± 0,07	0,42 ± 0,09	0,38 ± 0,09	0,39 ± 0,09	0,14 ± 0,04*
Ureia (mg/dL)	41,9 ± 2,9	52,9 ± 2,9*	43,5 ± 4,3	41,6 ± 5,2	43,6 ± 4,7

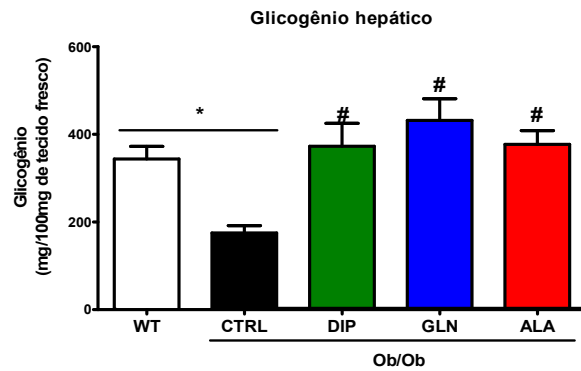
Camundongos C57B16 Ob/Ob, suplementados durante 40 dias por via oral com solução contendo 4% de: Dipeptídeo (DIP) ou L-glutamina (GLN) ou L-alanina (ALA) ou água filtrada (CTRL e WT). Resultados expressos em média ± erro padrão da média (n = 8 por grupo).

* Representa diferença estatística significativa quando comparado com WT ($p < 0,05$ *One-way ANOVA*, *pos-hoc Tukey HSD*).

Em relação à concentração plasmática de creatinina, houve uma redução significativa no grupo ALA quando comparado ao grupo WT (tabela 5). A concentração plasmática de ureia no grupo CTRL Ob/Ob aumentou significativamente quando comparado ao WT.

4.7. Glicogênio Hepático

Figura 8- Concentração de glicogênio hepático



Camundongos C57B16 Ob/Ob, suplementados durante 40 dias por via oral com solução contendo 4% de: Dipeptídeo (DIP) ou L-glutamina (GLN) ou L-alanina (ALA) ou água filtrada (CTRL e WT). Resultados expressos em média \pm erro padrão da média (n = 8 por grupo).

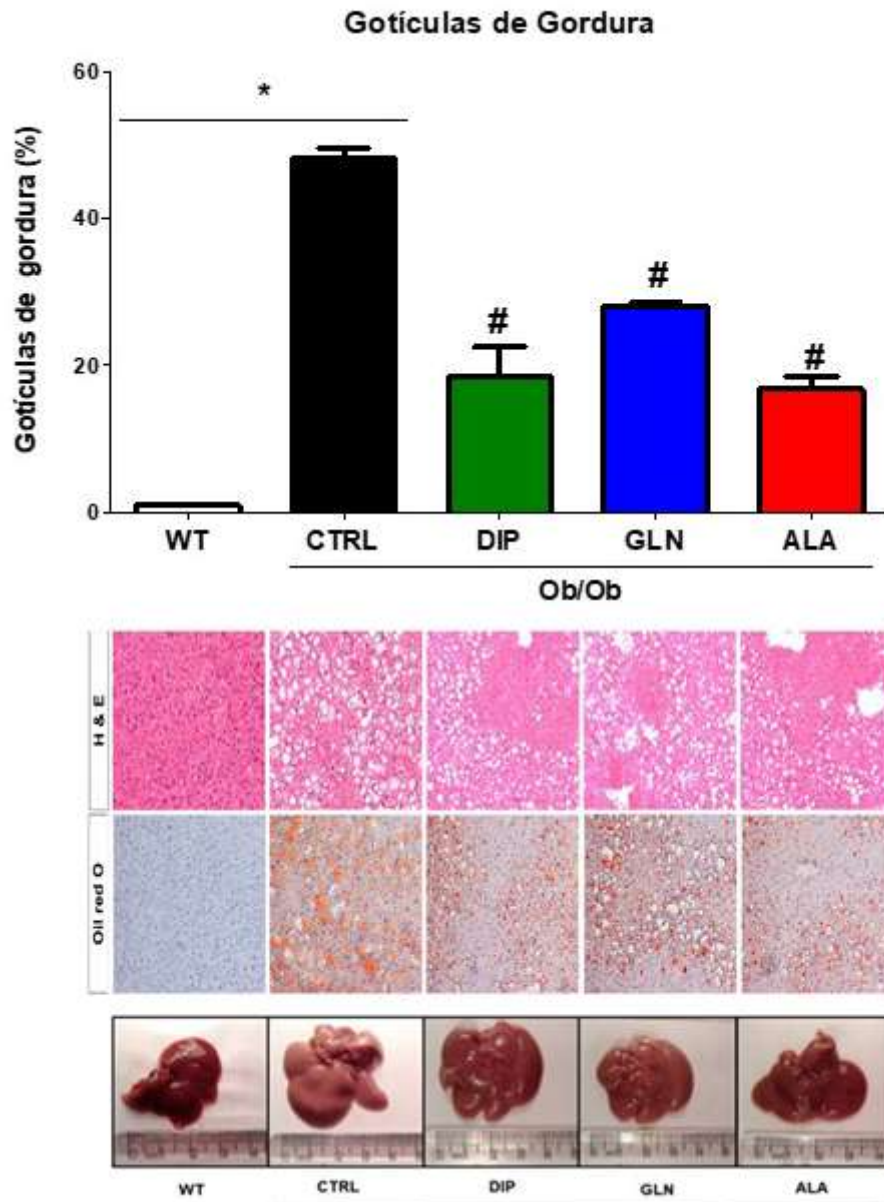
* Representa diferença estatística significativa quando comparado com WT ($p < 0,05$, *One-way ANOVA, post-hoc Tukey HSD*).

Representa diferença estatística significativa quando comparado com CTRL ($p < 0,05$, *One-way ANOVA, post-hoc Tukey HSD*).

O fígado é o órgão que apresenta o maior estoque de glicogênio. Como se observa na figura 8, os animais CTRL Ob/Ob apresentaram redução nos estoques de glicogênio hepático quando comparado aos animais selvagens (WT). Entre todos os grupos suplementados, houve aumento do glicogênio hepático em relação ao CTRL Ob/Ob ($p < 0,05$).

4.8. Histologia Hepática

Figura 9 - Gotículas de gordura no tecido hepático e Imagens representativa do fígado dos animais.



Camundongos C57BL6 Ob/Ob, suplementados durante 40 dias por via oral com solução contendo 4% de: Dipeptídeo (DIP) ou L-glutamina (GLN) ou L-alanina (ALA) ou água filtrada (CTRL e WT). n=3 por grupo. Resultados expressos em média \pm erro padrão da média. As histológicas de fígado foram analisadas por técnica HE e Oil Red O. A quantificação de gotículas foi quantificada por HE.

* Representa diferença estatística significativa quando comparado com WT ($p < 0,05$ *One-way ANOVA*, *pos-hoc Tukey HSD*).

Representa diferença estatística significativa quando comparado com CTRL Ob/Ob ($p < 0,05$ *One-way ANOVA*, *pos-hoc Tukey HSD*).

Corroborando com os resultados de triglicerídeos, de acordo com a figura 9 a contagem de gotículas de gordura por HE demonstra que os animais CTRL Ob/Ob apresentaram aumento de 48% no acúmulo de gordura quando comparado ao WT ($p < 0,05$). Em todos os grupos suplementados, o acúmulo de gordura foi reduzido em média 20% quando comparado ao CTRL Ob/Ob ($p < 0,05$), indicando uma melhora na esteatose destes animais.

4.9. Concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Tabela 6 - Concentração de TBARS hepático e muscular (MDA/g de tecido fresco).

	Ob/Ob				
	WT	CTRL	DIP	GLN	ALA
Hepático (MDA/ g de tecido fresco)	2,90 ± 0,4	4,51 ± 0,55*	2,45 ± 0,40 [#]	2,41 ± 0,35 [#]	1,85 ± 0,49 [#]
Muscular (MDA/ g de tecido fresco)	2,52 ± 0,29	4,71 ± 0,67*	2,75 ± 0,46 [#]	2,71 ± 0,35 [#]	2,57 ± 0,37 [#]

Camundongos C57B16 Ob/Ob, suplementados durante 40 dias por via oral com solução contendo 4% de: Dipeptídeo (DIP) ou L-glutamina (GLN) ou L-alanina (ALA) ou água filtrada (CTRL e WT).

Resultados expressos em média ± erro padrão da média (n = 10 por grupo).

* Representa diferença estatística significativa quando comparado com WT ($p < 0,05$, *One-way ANOVA, post-hoc Tukey*).

Representa diferença estatística significativa quando comparado com CTRL ($p < 0,05$, *One-way ANOVA, post-hoc Tukey*).

O MDA é um subproduto da peroxidação lipídica, podendo ser utilizado como um biomarcador para estresse oxidativo⁷⁴. De acordo com a tabela 6, a concentração de MDA tanto no fígado quanto no músculo esquelético aumentou nos animais CTRL Ob/Ob, se comparado ao animal selvagem (WT, $p < 0,05$). Além disso, todas as suplementações foram eficazes em reduzir as concentrações de MDA no fígado e no músculo esquelético, quando comparado aos animais CTRL Ob/Ob ($p < 0,05$), o que sugere um menor estresse oxidativo.

4.10. Concentração hepática e muscular de GSH e GSSG

Tabela 7 - Concentração hepática e muscular de glutatona oxidada e reduzida.

	Ob/Ob				
	WT	CTRL	DIP	GLN	ALA
FÍGADO					
Glutaciona total ($\mu\text{mol/g}$ de tecido fresco)	0,49 \pm 0,04	0,43 \pm 0,04	0,66 \pm 0,02 [#]	0,60 \pm 0,05 [#]	0,51 \pm 0,03
GSH ($\mu\text{mol/g}$ de tecido fresco)	0,31 \pm 0,03	0,27 \pm 0,05	0,44 \pm 0,05 [#]	0,43 \pm 0,05	0,27 \pm 0,03 ^{\$}
GSSG ($\mu\text{mol/g}$ de tecido fresco)	0,08 \pm 0,001	0,08 \pm 0,001	0,08 \pm 0,002	0,08 \pm 0,001	0,12 \pm 00,01
GSSG/GSH	0,29 \pm 0,06	0,31 \pm 0,04	0,23 \pm 0,06	0,20 \pm 0,04	0,47 \pm 0,07 ^{\$&}
MUSCULO ESQUELÉTICO					
Glutaciona total ($\mu\text{mol/g}$ de tecido fresco)	0,10 \pm 0,06	0,06 \pm 0,04 [*]	0,11 \pm 0,01 [#]	0,11 \pm 0,01 [#]	0,08 \pm 0,007
GSH ($\mu\text{mol/g}$ de tecido fresco)	0,06 \pm 0,009	0,03 \pm 0,004 [*]	0,06 \pm 0,001 [#]	0,08 \pm 0,013 [#]	0,05 \pm 0,009
GSSG ($\mu\text{mol/g}$ de tecido fresco)	0,02 \pm 0,0008	0,02 \pm 0,001	0,02 \pm 0,001	0,02 \pm 0,002	0,02 \pm 0,001
GSSG/GSH	0,27 \pm 0,04	0,53 \pm 0,07 [*]	0,22 \pm 0,02 [#]	0,21 \pm 0,03 [#]	0,32 \pm 0,03

Camundongos C57B16 Ob/Ob, suplementados durante 40 dias por via oral com solução contendo 4% de: Dipeptídeo (DIP) ou L-glutamina (GLN) ou L-alanina (ALA) ou água filtrada (CTRL e WT). Resultados expressos em média \pm erro padrão da média (n = 6 por grupo).

* Representa diferença estatística significativa quando comparado com WT (p<0,05 *One-way ANOVA, pos-hoc Tukey HSD*).

Representa diferença estatística significativa quando comparado com CTRL Ob/Ob (p<0,05 *One-way ANOVA, pos-hoc Tukey HSD*).

\$ Representa diferença estatística significativa quando comparado com DIP (p<0,05 *One-way ANOVA, posteste Tukey HSD*).

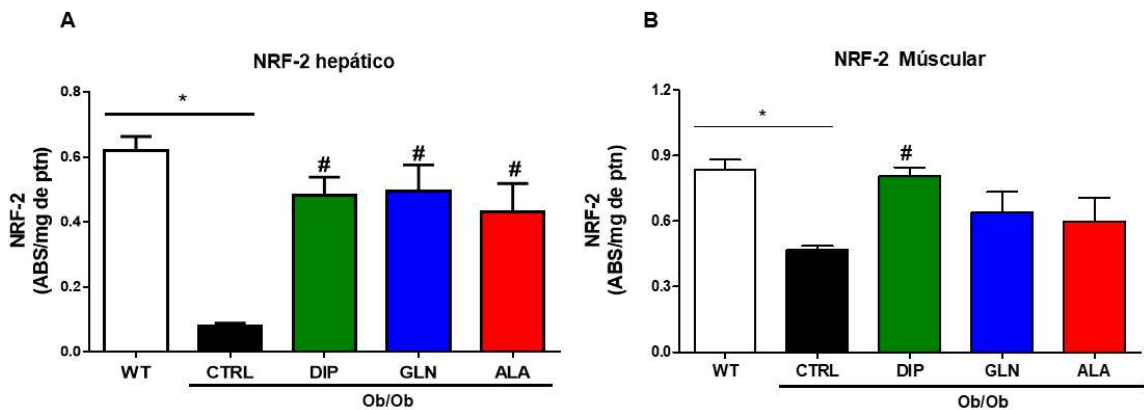
& Representa diferença estatística significativa quando comparado com GLN (p<0,05 *One-way ANOVA, pos-hoc Tukey HSD*).

O fígado é o principal órgão sintetizador de GSH do organismo ⁷⁵. Os grupos suplementados com glutamina aumentaram significativamente a concentração de glutatona total (GSH+GSSG). Em relação ao GSH, somente no grupo DIP houve um aumento quando comparado ao grupo CTRL Ob/Ob (p<0,05). Em relação à razão GSSG/GSH houve um aumento significativo no grupo ALA quando comparado aos grupos DIP e GLN (Tabela 7, p<0,05).

No músculo esquelético, os animais CTRL Ob/Ob reduziram significativamente a GSH total e a GSH no estado reduzido e, conseqüentemente, aumentando a razão GSSG/GSH ($p < 0,05$). Os animais suplementados com L-glutamina livre ou dipeptídeo apresentaram aumento significativo nas concentrações de GSH total, GSH e conseqüente redução na razão GSSG/GSH, sugerindo um efeito antioxidante promovido pela suplementação com L-glutamina.

4.11. Translocação para o núcleo do Fator de transcrição NRF-2

Figura 10 - Translocação para o núcleo do Fator de transcrição NRF-2. no fígado (A) e músculo esquelético (B).



Camundongos C57B16 Ob/Ob, suplementados durante 40 dias por via oral com solução contendo 4% de: Dipeptídeo (DIP) ou L-glutamina (GLN) ou L-alanina (ALA) ou água filtrada (CTRL e WT). Resultados expressos em média \pm erro padrão da média ($n = 6$ por grupo).

* Representa diferença estatística significativa quando comparado com WT ($p < 0,05$ *One-way ANOVA, pos-hoc Tukey HSD*).

Representa diferença estatística significativa quando comparado com CTRL Ob/Ob ($p < 0,05$ *One-way ANOVA, pos-hoc Tukey HSD*).

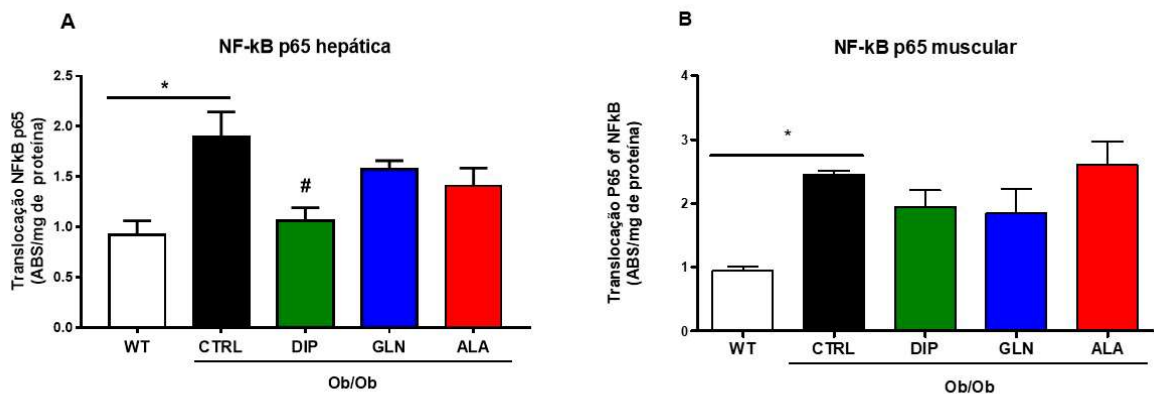
O NRF-2 é o principal fator de transcrição envolvido com a defesa antioxidante e detoxificação hepática ⁷⁶. Nos animais CTRL Ob/Ob ocorreu uma redução na translocação do fator NRF-2 para o núcleo quando comparado ao WT ($p < 0,05$). Entretanto, todos os grupos suplementados aumentaram a translocação de NRF-2 para o núcleo e sua ligação ao DNA quando comparado ao CTRL ($p < 0,05$), mostrando que as suplementações levaram a uma ativação deste fator de transcrição.

No músculo esquelético também houve redução significativa da translocação do Fator NRF-2 no grupo CTRL Ob/Ob quando comparado ao WT ($p < 0,05$).

Entretanto, somente o grupo DIP aumentou significativamente a ativação do NRF-2, ou seja, sua translocação para o núcleo e ligação ao DNA ($p < 0,05$).

4.12 Translocação para o núcleo do fator de transcrição NF- κ B

Figura 11 - Translocação para o núcleo do dímero P65 do NF- κ B no fígado (A) e músculo esquelético (B).



Camundongos C57B16 Ob/Ob, suplementados durante 40 dias por via oral com solução contendo 4% de: Dipeptídeo (DIP) ou L-glutamina (GLN) ou L-alanina (ALA) ou água filtrada (CTRL e WT). Resultados expressos em média \pm erro padrão da média ($n = 5$ por grupo).

* Representa diferença estatística significativa quando comparado com WT ($p < 0,05$ *One-way ANOVA, pos-hoc Tukey HSD*).

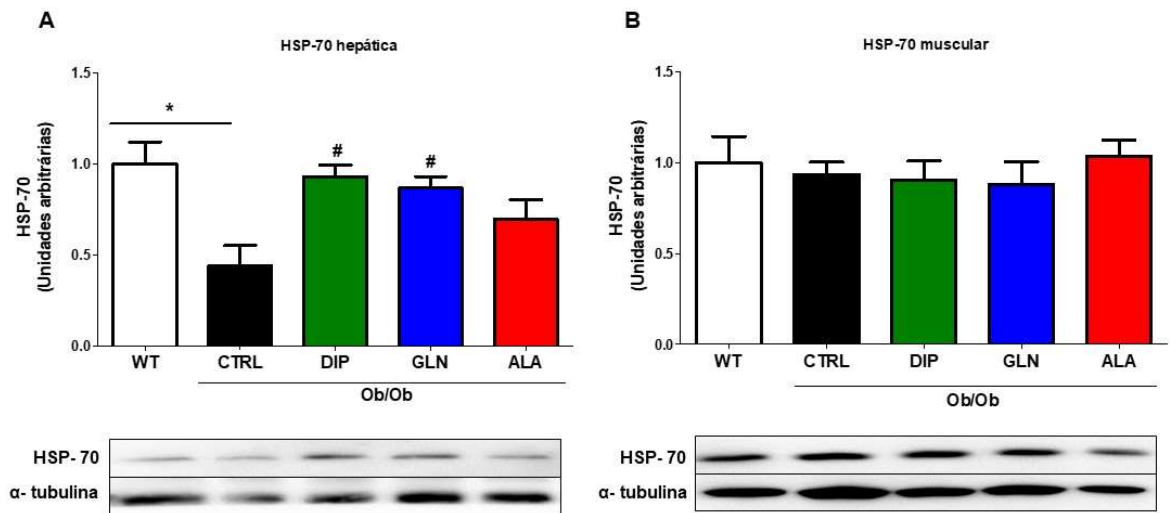
Representa diferença estatística significativa quando comparado com CTRL Ob/Ob ($p < 0,05$ *One-way ANOVA, pos-hoc Tukey HSD*).

O fator de transcrição NF- κ B é encontrado de forma dimérica no citoplasma de células, é inativo quando associado a inibidores de κ B (I κ B). O heterodímero p65 / RelA é o indutor de atividade de ligação a NF- κ B mais comum em animais⁷⁷. A ativação induzida de p65 em resposta a uma variedade de estímulos é tipicamente transitória, mas suficiente para regular positivamente a transativação de genes alvo de diversas atividades, como proliferação celular, citocinas inflamatórias, quimiocinas e mediadores de apoptose⁷⁸. No fígado e músculo esquelético a translocação para o núcleo do P65 do NF- κ B aumentou significativamente no grupo CTRL quando comparado ao WT (figura 11 A e B). Entretanto, somente o grupo DIP reduziu significativamente translocação para núcleo do P65 do NF- κ B no fígado quando comparado CTRL ($p < 0,05$). O grupo ALA apresentou resultado semelhantes ao CTRL

ao aumentar a translocação do NF-kb para o núcleo no músculo quando comparado ao WT (figura 11B).

4.13. Análises mensuradas pela técnica de Western blot

Figura 12 - Conteúdo de HSP70 no fígado(A) e músculo esquelético (B).



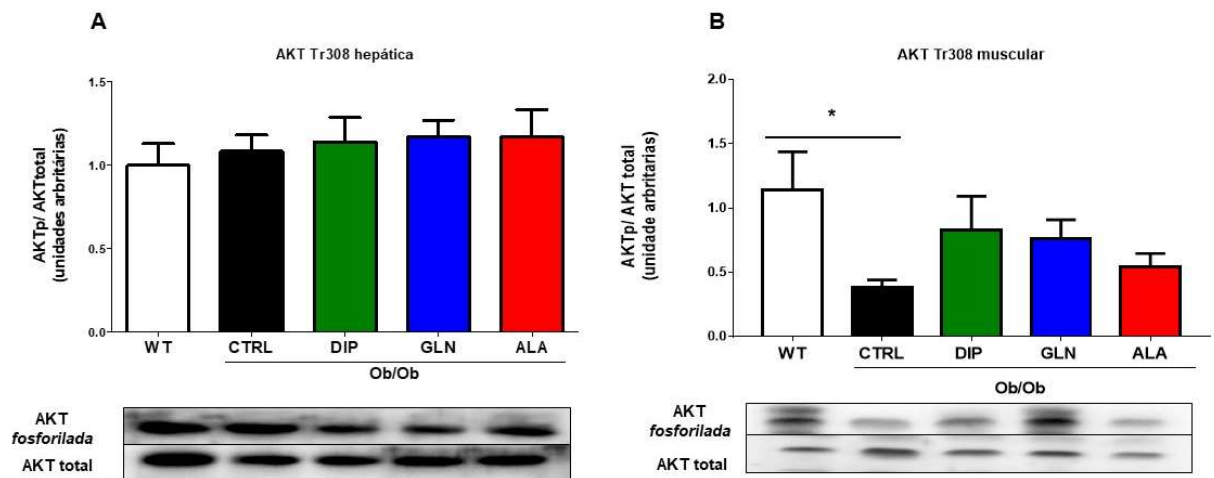
Camundongos C57B16 Ob/Ob, suplementados durante 40 dias por via oral com solução contendo 4% de: Dipeptídeo (DIP) ou L-glutamina (GLN) ou L-alanina (ALA) ou água filtrada (CTRL e WT). Resultados expressos em média \pm erro padrão da média ($n = 6$ por grupo).

* Representa diferença estatística significativa quando comparado com WT ($p < 0,05$ One-way ANOVA, *pos-hoc Tukey HSD*).

Representa diferença estatística significativa quando comparado com CTRL Ob/Ob ($p < 0,05$ One-way ANOVA, *pos-hoc Tukey HSD*).

De acordo com a figura 12A, o grupo no CTRL Ob/Ob houve uma redução na expressão proteica de HSP-70 no fígado ($p < 0,05$). Entre os suplementados, a suplementação com glutamina livre ou com o DIP aumentaram a expressão de HSP-70 no fígado quando comparado ao CTRL Ob/Ob ($p < 0,05$). Já no músculo esquelético no conteúdo proteico HSP-70 no em todos os grupos experimentais (Figura 12B).

Figura 13 - Conteúdo de AKT fosforilada (Tr-308) no fígado (A) e músculo esquelético (B).



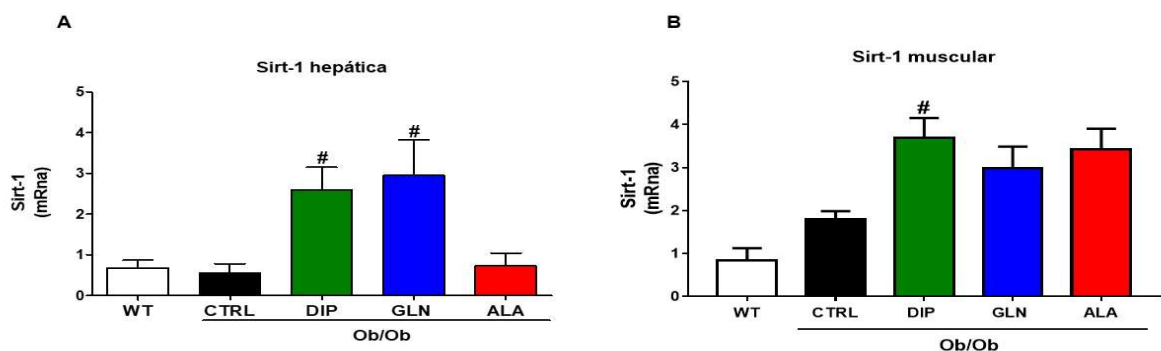
Camundongos C57B16 Ob/Ob, suplementados durante 40 dias por via oral com solução contendo 4% de: Dipeptídeo (DIP) ou L-glutamina (GLN) ou L-alanina (ALA) ou água filtrada (CTRL e WT). Resultados expressos em média \pm erro padrão da média ($n = 5$ por grupo).

* Representa diferença estatística significativa quando comparado com WT ($p < 0,05$ One-way ANOVA, *pos-hoc Tukey HSD*).

De acordo com a Figura 13A, não houve alterações significativas entre os grupos na fosforilação de AKT no fígado. Porém, corroborando com os resultados de glicemia e insulinemia, a expressão de Akt fosforilada (Tr-308) foi reduzida nos animais CTRL Ob/Ob ($p < 0,05$), o que indica uma maior resistência à insulina. Entretanto todas as suplementações não aumentaram significativamente a fosforilação de AKT (Tr-308).

4.14. Análises mensuradas pela técnica de qPCR

Figura 14 - Expressão gênica de sirt-1 no fígado (A) e músculo esquelético (B).



Camundongos C57/BL6 Ob/Ob suplementados durante 40 dias por via oral com solução contendo 4% de: Dipeptídeo (DIP) ou L-glutamina (GLN) ou L-alanina (ALA) ou água filtrada (CTRL e WT).

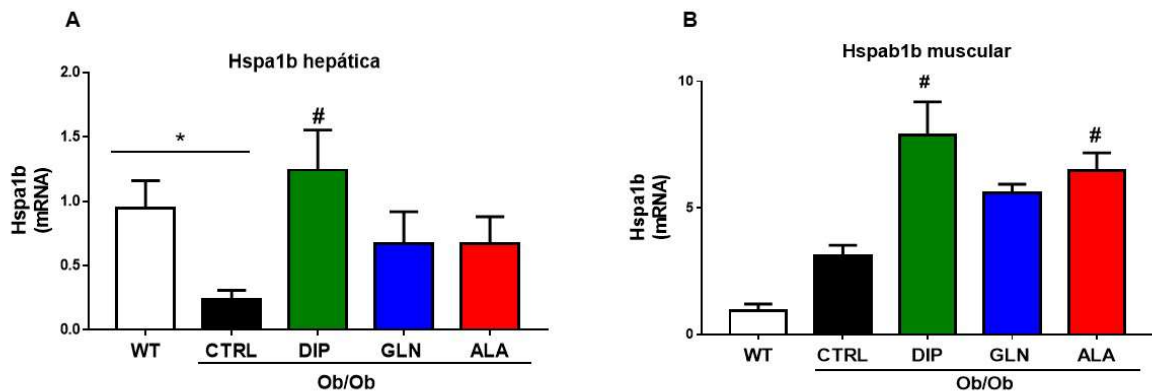
Resultados expressos em média +/- erro padrão da média (n = 6 por grupo). Os resultados foram normalizados pelo gene constitutivo B2M e pela média do delta Ct do grupo WT.

* Representa diferença estatística significativa quando comparado com WT ($p < 0,05$, *One-way ANOVA, post-hoc Tukey*).

Representa diferença estatística significativa quando comparado com CTRL ($p < 0,05$, *One-way ANOVA, post-hoc Tukey*).

A sirt-1 é uma dessasetilase de histona envolvida com o metabolismo lipídico e glicídico. Em relação a expressão genica da Sirt-1 no fígado (figura 14A) se observa aumento na expressão genica nos grupos suplementados com glutamina (DIP e GLN) quando comparado ao CTRL ($P < 0,05$). Porém no músculo esquelético somente o grupo DIP aumentou significativamente a expressão gênica de Sirt-1 (figura 14B).

Figura 15 - Expressão gênica de Hspab1 no fígado (A) e músculo esquelético (B).



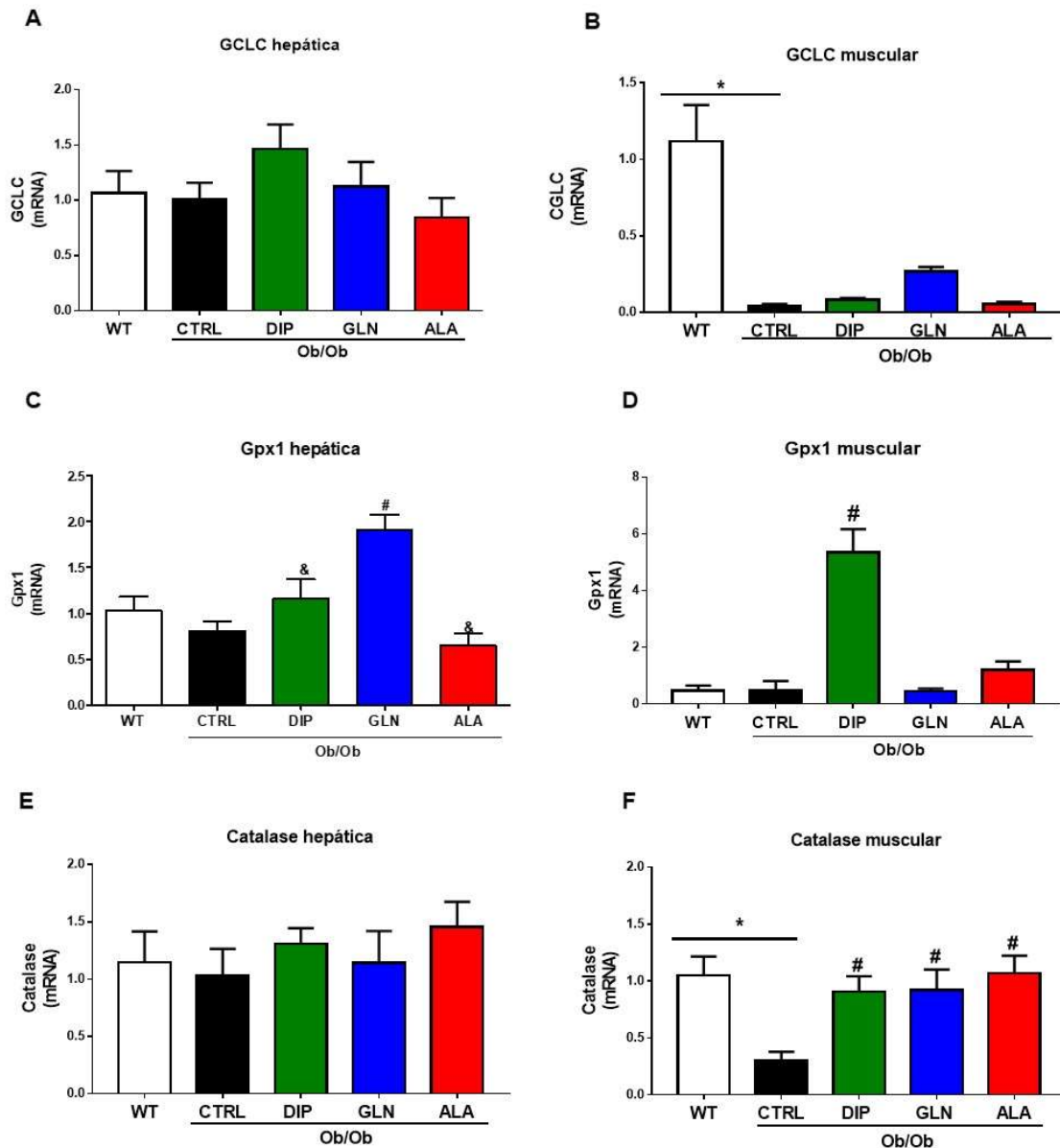
Camundongos C57/BL6 Ob/Ob suplementados durante 40 dias por via oral com solução contendo 4% de: Dipeptídeo (DIP) ou L-glutamina (GLN) ou L-alanina (ALA) ou água filtrada (CTRL e WT). Resultados expressos em média +/- erro padrão da média (n = 6 por grupo). Os resultados foram normalizados pelo constitutivo B2M e pela média do delta Ct do grupo WT.

* Representa diferença estatística significativa quando comparado com WT ($p < 0,05$, *One-way ANOVA, post-hoc Tukey*).

Representa diferença estatística significativa quando comparado com CTRL ($p < 0,05$, *One-way ANOVA, post-hoc Tukey*).

O termo "proteína de choque térmico" (HSP) representa uma superfamília de genes, e suas proteínas como "acompanhantes moleculares" aumentam a síntese em resposta a condições ambientais. Na figura, avaliamos a expressão do gene Hspb1 responsável por codificar as proteínas da família HSP70⁷⁹. No fígado se observa uma redução significativa na expressão no grupo CTRL quando comparado ao WT e um aumento significativo no grupo DIP quando comparado com o grupo CTRL. No músculo esquelético (figura 15 B), a expressão gênica de Hspb1 aumentou no grupo DIP e ALA quando comparado ao CTRL ($p < 0,05$).

Figura 16 - Expressão gênica de proteínas antioxidantes no fígado e músculo esquelético.



Expressão gênica: (A) GCLC no fígado. (B) GCLC no músculo esquelético. (C) GPx1 no fígado. (D) GPx1 no músculo esquelético. (E) Catalase no fígado (F) Catalase músculo esquelético

C57/BL6 Ob/Ob suplementados durante 40 dias por via oral com solução contendo 4% de: Dipeptídeo (DIP) ou L-glutamina (GLN) ou L-alanina (ALA) ou água filtrada (CTRL e WT). Resultados expressos em média +/- erro padrão da média (n=6 por grupo). Os resultados foram normalizados pelo constitutivo B2M e pela média do delta Ct do grupo WT.

* Representa diferença estatística significativa quando comparado com WT (p<0,05, One-way ANOVA, post- hoc Tukey)

Representa diferença estatística significativa quando comparado com CTRL (p<0,05, One-way ANOVA, post-hoc Tukey)

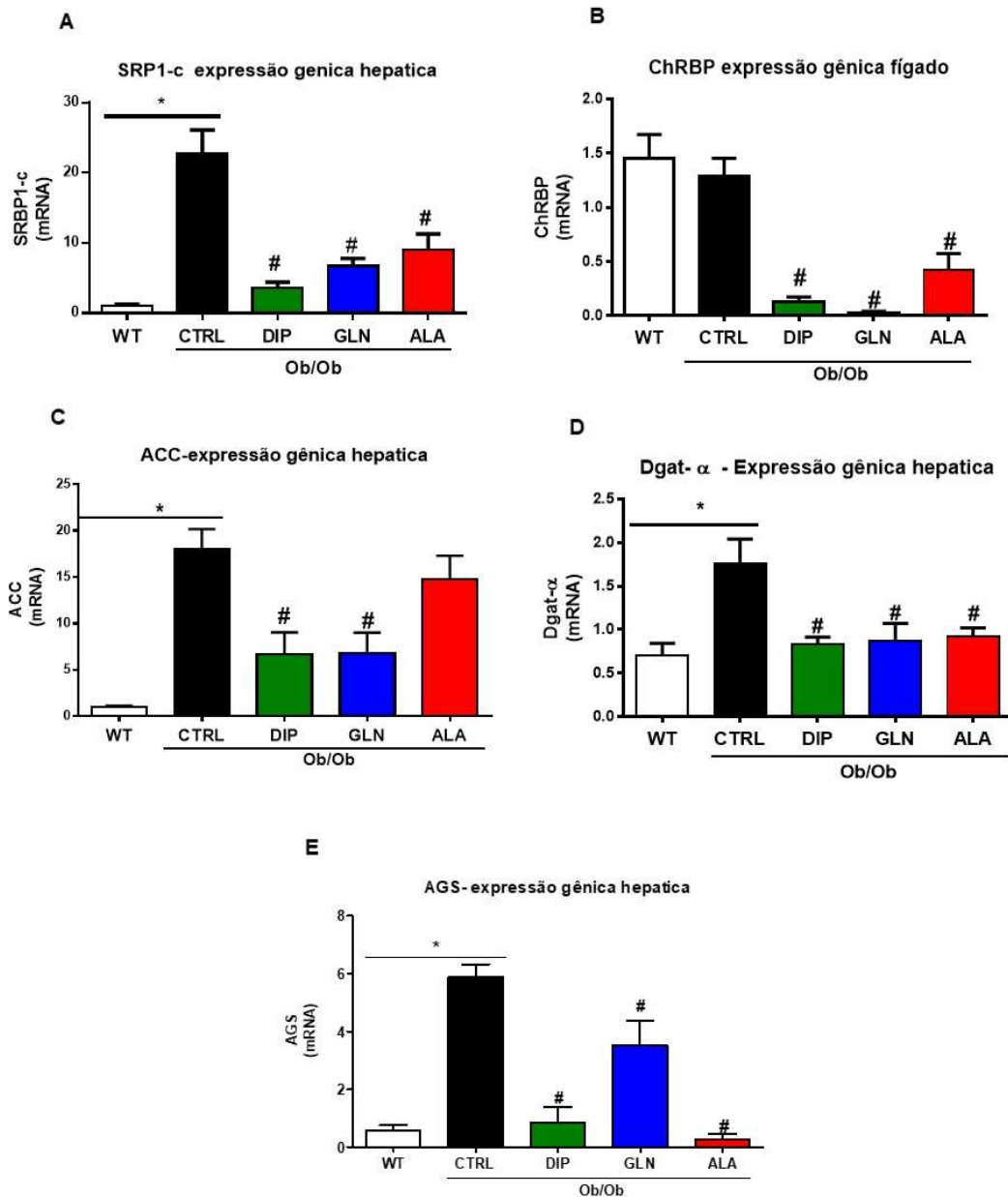
O gene GCLC está envolvido com a síntese de glutatona. De acordo com a figura 16 A e B, não houve alterações significativas na expressão genica de GCLC.

Somente no músculo esquelético se observa uma redução significativa da expressão de GCLC no grupo Ob/Ob CTRL quando comparado ao WT.

Já a expressão gênica de GPx1 no fígado aumentou significativamente no grupo GLN quando comparado CTRL, DIP e ALA. No músculo esquelético, somente o grupo DIP aumentou significativamente a expressão de GPX1 quando comparado ao controle obeso (figura 16C).

Em relação a expressão gênica da enzima Catalase, no fígado a expressão gênica não apresentou alterações significativas (Figura 16E e F). Já no músculo esquelético houve redução significativa da expressão genética do gene da catalase no grupo Ob/Ob CTRL e aumento significativo em todos os grupos suplementados (Figura 16F).

Figura 17 - Expressão de genes envolvidos com o metabolismo lípidico hepático.



Expressão gênica no fígado de: (A) fator de transcrição SREBP-1c, (B) fator de transcrição ChRBP, (C) Acetil-coa carboxilase (ACC), (D) enzima diacilglicerol aciltransferase (Dgat - α), (E) ácido graxo sintase (AGS) C57/BL6 Ob/Ob suplementados durante 40 dias por via oral com solução contendo 4% de: Dipeptídeo (DIP) ou L-glutamina (GLN) ou L-alanina (ALA) ou água filtrada (CTRL e WT). Os resultados foram normalizados pelo constitutivo B2M e pela média do delta Ct do grupo WT. Resultados expressos em média \pm erro padrão da média (n = 6 por grupo).

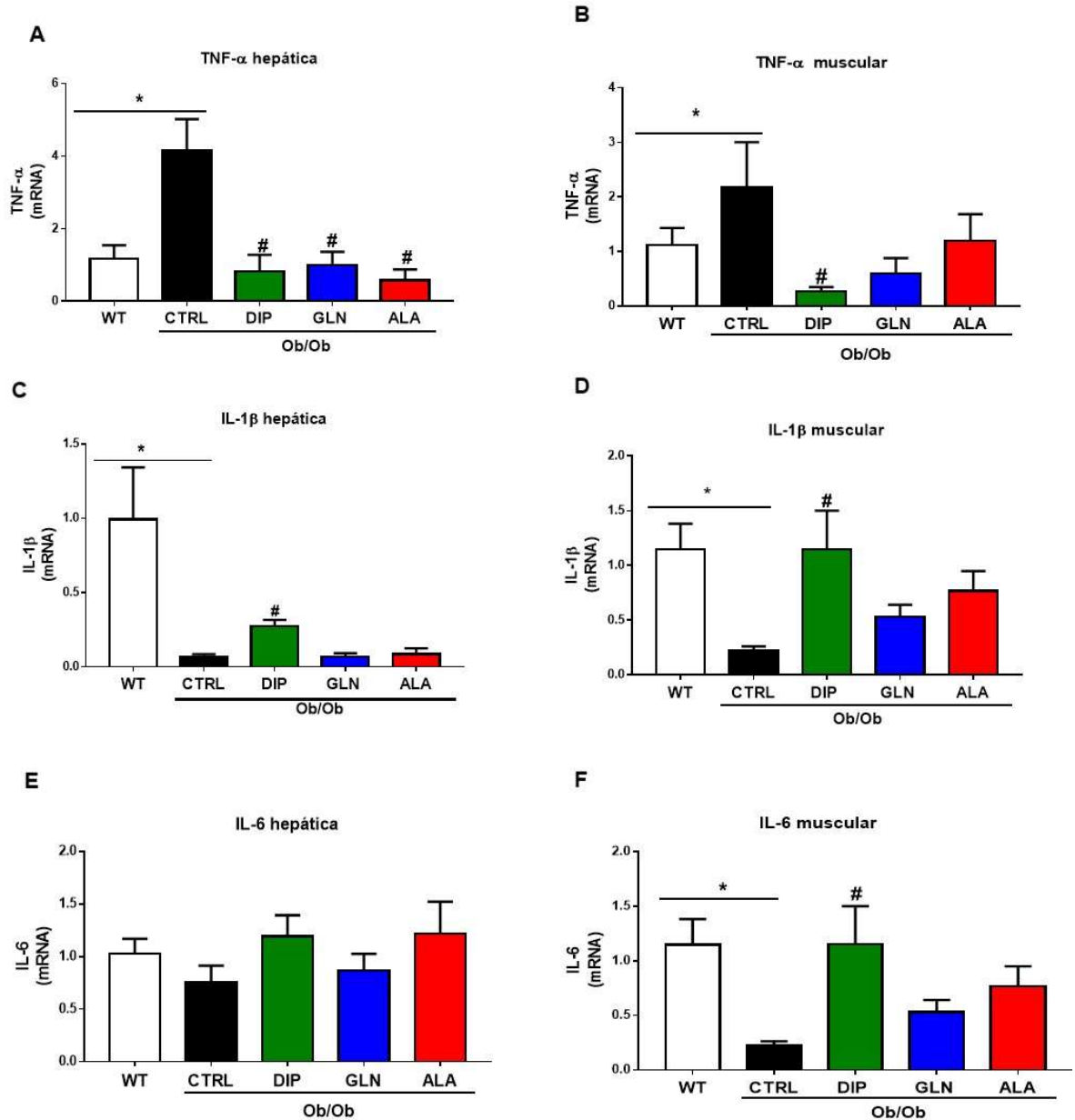
* Representa diferença estatística significativa quando comparado com WT (p<0,05, *One-way ANOVA, post-hoc Tukey*)

Representa diferença estatística significativa quando comparado com CTRL (p<0,05, *One-way ANOVA, post-hoc Tukey*)

O fator de transcrição SREBP-1c é responsável por ativar os genes que codificam enzimas necessárias para a síntese de ácidos graxos⁸⁰. De acordo com a figura 17A, como esperado a expressão gênica do fator de transcrição SRBP-1c aumentou no grupo CTRL Ob/Ob quando comparado ao controle WT ($p < 0,05$). Contudo, as três suplementações com aminoácidos foram eficazes em reduzir a expressão gênica deste fator de transcrição quando comparado ao CTRL Ob/Ob ($p < 0,05$). Já a expressão gênica do fator de transcrição ativado com aumento do consumo de carboidratos gênica do fator ChRBP reduziu significativamente nos grupos suplementados ($p < 0,05$).

Em relação a enzimas relacionadas a síntese de ácido graxo no fígado, observamos que tanto a expressão gênica da enzima Dgat- α , responsável pela conversão de diacilglicerol em triglicerídeos, quanto das enzimas-chaves para lipogênese hepática ACC e AGS, apresentaram aumentadas no grupo controle obeso quando comparado ao animal magro ($p < 0,05$ Figura 17C, D e E). E todos os grupos suplementados reduziram a expressão gênica destas enzimas lipolíticas.

Figura 18 - Expressão gênica de citocinas no fígado e músculo esquelético.



Expressão gênica das citocinas (A) TNF- α no fígado (B) TNF- α músculo (C) IL-1 β no fígado (D) IL-1 β no músculo (E) IL-6 no fígado (F) IL-6 no músculo esquelético

Camundongos C57/BL6 Ob/Ob suplementados durante 40 dias por via oral com solução contendo 4% de: Dipeptídeo (DIP) ou L-glutamina (GLN) ou L-alanina (ALA) ou água filtrada (CTRL e WT). Os resultados foram normalizados pelo constitutivo B2M e pela média do delta Ct do grupo WT. Resultados expressos em média +/- erro padrão da média (n=6 por grupo).

* Representa diferença estatística significativa quando comparado com WT ($p < 0,05$, One-way ANOVA, *post-hoc Tukey*)

Representa diferença estatística significativa quando comparado com CTRL ($p < 0,05$, One-way ANOVA, *post-hoc Tukey*)

A expressão gênica da citocina pro-inflamatória TNF- α aumentou significativamente no grupo CTRL tanto no fígado quanto no músculo esquelético (figura 18 A e B). Nos grupos suplementados, o grupo DIP reduziu significativamente a expressão gênica de TNF- α nos dois tecidos (fígado e músculo), enquanto os grupos GLN+ALA foram eficazes em reduzir a expressão gênica de TNF- α somente no fígado.

A expressão gênica da citocina IL-1 β nos tecidos músculo e fígado reduziu no grupo CTRL Ob/Ob quando comparado ao WT ($p < 0,05$) e somente a suplementação com dipeptídeo aumentou a expressão desta citocina nos dois tecidos (Figura 18C e D).

Em relação à expressão gênica da citocina IL-6 se observa no músculo redução significativa nos animais obesos controle. Nos grupos suplementados, somente no grupo DIP houve aumento significativo na expressão gênica da IL-6. Já no fígado não se observou alterações significativas na expressão gênica desta citocina (Figura 18 E e F).

5. DISCUSSÃO

As complicações da fisiopatologia da obesidade resultam em RI e desequilíbrio no metabolismo da glicose, fato que leva ao desenvolvimento da DM2². Diversas são as alterações metabólicas que ocorrem em obesos e RI, incluindo a disfunção do metabolismo de proteínas. Por exemplo, em obesos o aumento da concentração de alguns aminoácidos, tais como os aminoácidos de cadeia ramificada, é correlacionado com o desenvolvimento ou progressão do DM2⁸¹. Todavia, devido à maior oxidação de aminoácidos, estudos tanto em humanos quanto em animais demonstram que a concentração de glutamina em obesos e RI ou diabéticos pode estar reduzida quando comparada a indivíduos saudáveis^{38; 43; 44; 82; 83}. No presente estudo, o modelo animal de obesidade e resistência à insulina, Ob/Ob apresentou redução significativa na concentração de glutamina no plasma, fígado e músculo esquelético, fato que corrobora com tal fenômeno biológico observado nos indivíduos obesos e RI (Figuras 2A, 3A).

Estudos relacionando o metabolismo da glutamina no DM2 e os possíveis efeitos da suplementação são escassos e divergentes^{59; 60; 84}. No presente estudo, a suplementação com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina aumentou significativamente as concentrações de glutamina tanto no plasma quanto no fígado e músculo esquelético (Figuras 2A, 3A e 3C). Nos animais suplementados com L-glutamina na forma livre, as concentrações de glutamina aumentaram em 32% no fígado (Figura 3C), no entanto este aumento não foi estatisticamente significativo quando comparado ao grupo Ob/Ob CTRL. Estes resultados vão de encontro com outros estudos onde foi demonstrado que a suplementação com o DIP pode ser mais eficaz em restaurar a glutamina corporal quando comparada à suplementação com L-glutamina livre^{51; 85}. No intestino delgado, durante o processo de absorção da L-glutamina, aproximadamente 50% é absorvida e metabolizada no próprio enterócito, o que reduz a sua disponibilidade para a circulação. Porém, o dipeptídeo pode ser absorvido nos enterócitos pelo transportador Pept-1 e tanto pode ser hidrolisado a aminoácidos livres por hidrolases intestinais presentes no enterócito, quanto pode passar intactos pela lâmina basal e cair na circulação, sendo metabolizados no fígado⁸⁶. Por outro lado, a suplementação com L-alanina também aumentou significativamente a concentração muscular de glutamina (Figura 10A). Estudos experimentais com modelo animal submetidos com exercício intenso, também demonstrou aumento da glutamina muscular com a suplementação crônica com L-alanina^{35; 47}. Este fato pode ser

explicado considerando que a L-alanina pode ser metabolizada via alanina aminotransferase produzindo piruvato, o qual é rapidamente consumido no Ciclo de Krebs para gerar ATP. Além disso, a L-alanina também pode ser convertido a glutamato a partir de 2-oxoglutarato, que por sua vez produz glutamina^{87; 88}.

Um fato interessante é que todos os grupos suplementados aumentaram significativamente a ingestão hídrica quando comparados aos animais CTRL Ob/Ob (Tabela 2). Esta maior ingestão pode ser explicada pela maior palatabilidade dos aminoácidos suplementados. Ao avaliar a palatabilidade de diversos aminoácidos em animais, Bachmanov *et al.*⁸⁹ observaram que os aminoácidos com sabor doce, tais como L-alanina, L-glutamina e L-prolina, apresentaram maior preferência pelos animais quando comparados a outros aminoácidos.

Uma das características dos animais Ob/Ob é a hiperfagia⁹⁰. Os animais CTRL Ob/Ob apresentaram um aumento do consumo alimentar quando comparados aos animais selvagens (grupo WT, Tabela 2). Entretanto, os animais suplementados com L-glutamina e L-alanina na forma livre (GLN e ALA) apresentaram redução na ingestão alimentar, quando comparado ao CTRL Ob/Ob (Tabela 2). A L-glutamina, ao ser absorvida no enterócito, estimula a secreção de incretinas, tais como o peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1), o qual está envolvido com mecanismos centrais de saciedade. Estudos em humanos obesos e diabéticos demonstram que a suplementação aguda com 30 g de L-glutamina aumenta a secreção e concentração plasmática de GLP-1⁹¹.

A RI causada pela obesidade promove uma desregulação da homeostasia da glicose caracterizada por hiperglicemia, intolerância à glicose e à insulina^{92; 93}. Como mecanismo compensatório a desregulação da homeostasia da glicose, ocorre aumento secreção de insulina e aumento de massa das células betas pancreática, acarretando hiperinsulinemia na tentativa de manter a glicemia em níveis fisiológicos⁹⁴. Assim como já relatado na literatura, neste estudo os animais controle Ob/Ob apresentam intolerância à glicose e à insulina além de aumento aproximado de 10 vezes da insulina plasmática quando comparado ao animal WT⁹⁵. Adicionalmente, uma das características dos animais Ob/Ob é o aumento na secreção da insulina, devido resistência periférica à insulina e a ausência de leptina circulante, que é um inibidor da secreção de insulina⁹⁵. Os animais CTRL Ob/Ob apresentaram maior resposta secretória de insulina estimulada agudamente por glicose, tanto em baixa quanto em alta concentração do açúcar, quando comparados aos animais selvagens

(WT, Figura 7). De fato, na presença de 16,7 mM a relação secreção/conteúdo da insulina chegou a ser praticamente o dobro da dos controle.

Por outro lado, os animais Ob/Ob suplementados com L-glutamina e L-alanina livres reduziram significativamente a secreção de insulina em alta contração de glicose (Figura 7B). Os grupos suplementados com glutamina (*i.e.* GLN e DIP) apresentaram uma melhora na resistência periférica à insulina principalmente no músculo esquelético (Figura 6), principal órgão insulino-dependente. Este fato pode ter influenciado pela menor secreção de insulina, uma vez que, com a melhora na ação do hormônio e nos tecidos periféricos, a célula beta pancreática não necessita aumentar sua capacidade secretora como “mecanismo compensatório”⁹⁴. As suplementações com L-glutamina tanto na forma livre quanto quanto DIP reduziu glicemia basal e a insulina plasmática e aumentou a sensibilidade à insulina e tolerância à glicose.

Em dois estudos com animais obesos induzidos por dieta hiperlipídica, a suplementação com L-glutamina melhorou a glicemia, a insulina plasmática e a sensibilidade muscular e hepática à insulina^{59; 84}. Como mostra a Figura 7B, o grupo ALA também apresentou menor resposta ao estímulo da alta concentração de glicose (16,7mM), porém menor tolerância à glicose e sensibilidade à Insulina (Figura 5 E 6). Esses achados indicam que a suplementação com L-alanina não melhorou a resistência à insulina e conseqüentemente a glicemia deste animais. Esses dados são opostos àqueles observados em camundongos com obesidade induzida por glutamato monossódico nos quais a suplementação com L-alanina melhorou a tolerância à glicose e a secreção de insulina com conseqüente menor glicemia em estado alimentado⁹⁶. Porém, estudos *in vitro* com linhagem de ilhotas de ratos (BRIN-BD11) demonstram que agudamente a L-alanina é um secretago de insulina, todavia quando estimulada cronicamente (24h ou 18h) pode ter efeito oposto, reduzindo a secreção de insulina e o cálcio intracelular^{88; 97}. Em um destes estudos, o estímulo crônico com L-alanina em células BRIN-BD11 resultou em redução da secreção de insulina, pelo aumento da atividade de piruvato desidrogenase e redução na expressão de isoformas de Piruvato desidrogenase quinase (PDK)⁹⁷. Portanto, em nosso estudo a maior disponibilidade de L-alanina de forma crônica para a célula beta pode ter influenciado na menor GSSI.

Outra comorbidade muito comum na obesidade é a esteatose hepática⁹⁸. Diversos estudos em seres humanos ou em modelos animais associaram a

resistência à insulina como causa e/ou efeito da esteatose hepática. Apesar da relação de causa e/ou efeito entre o acúmulo de lipídios no fígado e a resistência à insulina ainda esteja aberta a debate, sabe-se que a resistência à insulina está intimamente ligada ao desenvolvimento e progressão da esteatose hepática^{7; 93}. No presente estudo, os animais CTRL Ob/Ob apresentaram quadro de esteatose hepática, aumento de TG hepático e plasmático (Tabela 4 e Figura 12), bem como aumento de ALT e AST plasmático (Tabela 4). Contudo, a suplementação com L-glutamina e L-alanina na forma livre ou como DIP reduziram a esteatose hepática, se comparado aos animais CTRL Ob/Ob (Figuras 9) Além disso, observou-se redução na concentração de colesterol total e triglicérides plasmáticos (Tabela 4) nestes mesmos grupos suplementados, o que indica que os aminoácidos estudados atuam no metabolismo lipídico hepático.

Além disso, os resultados encontrados indicam que as suplementações estudadas reduzem a expressão gênica de dois fatores de transcrição envolvido com a lipogênese: SRBP-1c e ChREBP (Figuras 17 A e B). O fator de transcrição SRBP-1c quando ativado é responsável pela transcrição das enzimas: AGS, ACC e DGAT- α que são responsáveis pela síntese de triglicérides no fígado. Cabe salientar que estas enzimas também apresentaram a menor expressão gênica nos grupos suplementados (Figuras 24, 26 e 27), o que demonstra que as suplementações com L-glutamina e L-alanina livre ou como DIP reduzem os triglicérides hepáticos, plasmáticos e o colesterol total através da redução da lipogênese.

Na obesidade, as alterações no metabolismo lipídico e a resistência à insulina promovem um quadro de inflamação e estresse oxidativo crônicos^{2; 99}. Em indivíduos obesos e diabéticos, o fator de transcrição NRF-2 pode estar menos ativo, o que é um fator contribuinte para a resistência periférica à insulina e esteatose hepática¹⁰⁰. No presente estudo, animais Ob/Ob CTRL apresentaram menor translocação do NRF-2 para o núcleo no fígado e músculo esquelético (Figura 10). Este efeito pode ter sido devido ao aumento da razão GSSG/GSH no músculo esquelético (Tabela 7) e aumento do biomarcador de peroxidação lipídica TBARS no dois tecidos (Tabela 6). Em um estudo, camundongos *knockout* NRF-2 com diabetes induzido por dieta hiperlipídica foi demonstrada ausência desse fator de transcrição causando estresse oxidativo e hiperglicemia quando comparados a camundongos selvagens¹⁰¹. Desta forma, pode-se inferir que o elevado estresse oxidativo muscular e hepático contribuiu

para a hiperglicemia (Figura 4A), hiperinsulinemia (Figura 4B) e resistência à insulina (Figuras 6).

Por outro lado, a suplementação com L-glutamina livre ou como DIP atenuou o estresse oxidativo por aumentar a translocação do NRF-2 para o núcleo celular (Figura 10), as concentrações de GSH (Tabelas 7) e TBARS no fígado e músculo esquelético (Tabela 6). Adicionalmente, observa-se um aumento na expressão gênica de Gpx1 no fígado do grupo suplementado com glutamina livre e DIP no músculo esquelético (Figuras 16C e D). Apesar do aumento da translocação de NRF-2 no fígado dos animais suplementados com GLN e DIP não observamos aumento significativo na expressão gênica do gene GCLC no fígado, o qual está envolvido com a síntese de glutathione (Figura 16A), sugerindo que o aumento da concentração de GSH é através da maior disponibilidade de glutamina a célula ⁷⁵.

Outro mecanismo no qual a L-glutamina pode melhorar a sensibilidade à insulina é via SIRT-1 ¹⁰². No fígado dos animais suplementados com L-glutamina livre ou como dipeptídeo houve aumento na expressão gênica de Sirt-1 (Figura 14A). Neste órgão essa desacetilase de histona exerce um papel importante na gliconeogênese hepática, por regular genes envolvidos na cascata de fosforilação de Akt e Foxo1, resultando em menor transcrição dos genes gliconeogênicos: glicose-6-fosfatase e fosfoenolpiruvato carboxiquinase ^{103; 104}. Desta forma, a maior expressão gênica de Sirt-1 nos animais suplementados com L-glutamina (DIP e GLN) pode ter influenciado no aumento significativo de glicogênio hepático nestes grupos experimentais (Figura 8).

Um fato importante a ser ressaltado que é bem divulgado na literatura é que, durante a restrição calórica, a maior ativação da SIRT-1 tem um papel importante na adaptação fisiológica, sendo correlacionado com a longevidade ¹⁰⁵. Apesar da menor ingestão de ração no grupo L-alanina (Tabela 2), não se observou uma maior expressão gênica de Sirt-1 no fígado e músculo neste grupo experimental. Somente foi observado maior expressão gênica nos grupos GLN e DIP no fígado e, somente do grupo DIP, no músculo (Figura 14). Assim, o aumento da expressão gênica de Sirt-1 advém da suplementação com L-glutamina.

Além de influenciar diretamente o metabolismo glicídico, a SIRT-1 também pode atenuar a resistência à insulina ao exercer um efeito anti-inflamatório e citoprotetor por desacetilar a subunidade RelA/p65 de NF-κB e aumentar a HSP-70 na célula ¹⁰⁶. A obesidade, hiperlipidemia e DM2 estão associadas a uma redução na

expressão das proteínas envolvidas com a citoproteção, tais como as HSPs ²⁴. Estas proteínas atuam como chaperonas e estão envolvidas com o remodelamento e função de diversas proteínas ^{107; 108; 109}. As HSPs também tem efeito anti-inflamatório por interagir com fatores de transcrição ligados à resposta inflamatória, tais como IKK β , JNK ³⁷. No fígado dos animais CTRL Ob/Ob houve redução da citoproteção por menor expressão de HSP-70 (Figura 12A) e expressão gênica de Hspab1 (Figura 15 A). Ao passo que os animais suplementados com L-glutamina tanto na forma livre ou como DIP aumentaram significativamente a expressão gênica de Hspab1 (Figura 15 A) e conteúdo proteico de HSP-70 (Figura 12A).

A glutamina aumenta a expressão de HSP por três mecanismos: 1) por aumentar a translocação nuclear de HSF-1 e sua ligação ao DNA 2) através da via das hexosaminas ¹⁰⁷ 3) via SIRT-1 por regular a ligação do HSF-1 à região promotora no DNA HSE ¹¹⁰. Entretanto, não foi observada alteração significativa na expressão de HSP-70 no músculo esquelético (Figura 12 B) porém, foi observado o aumento da expressão gênica de Hspab1 no músculo nos grupos DIP e ALA (Figura 15B). Uma das hipóteses para a não alteração das HSPs no músculo esquelético é que o estresse crônico causado pela obesidade pode auto regular as HSPs.

As Proteínas HSP- 70 e SIRT-1 podem reduzir a ativação da via do NF-kB em situações de estresses metabólico ^{2; 106; 111}. Além disso, os efeitos anti- inflamatórios da suplementação com L- glutamina, ao mediar via NF-kB estão bem elucidados ^{35; 56; 112; 113} A suplementação com Dipeptideo reduziu a translocação de P65 do NFkB no fígado e conseqüentemente houve uma maior expressão gênica de IL-6 e IL-1 β e menor expressão gênica TNF- α (Figura 18 A, C e D), o que indica a melhora da sensibilidade à insulina via redução da inflamação com a suplementação de DIP.

A melhora na resistência à insulina no fígado é correlacionada com redução da esteatose hepática, entretanto não observamos diferença na expressão de AKT fosforilada no fígado (Figura 13A). Somente nos animais suplementados com L- glutamina observamos efeito benéfico da suplementação no metabolismo glicídico (Figura 4 a 6). Adicionalmente um dos mecanismos para redução de esteatose hepática é a melhora no sistema antioxidante, principalmente os mecanismos transcricionais e pós-transcricionais envolvidos com o fator de transcrição NRF-2, o qual exerce um papel central na síntese de antioxidantes endógenos e detoxificação hepática ^{114; 115}. Em todos os grupos suplementados houve aumento da translocação do NRF-2 para núcleo no fígado (Figura 10A), além de redução do TG no fígado e

plasma, indicando o possível papel da suplementação com L-glutamina e/ou L-alanina na atenuação da esteatose hepática em camundongos obesos via NRF-2 e sistema antioxidante.

No grupo suplementado com DIP houve redução da translocação para o núcleo do p65 do NF- κ B (Figura 11A), o que regulou a expressão dos genes envolvidos com as vias inflamatórias. As citocinas pró- inflamatória, tais como TNF- α possui a capacidade de induzir a morte celular de hepatócitos e inibir a proliferação de hepatócitos, além de apresentar um papel crítico no desenvolvimento da RI por reduzir a expressão do transportador GLUT4^{116; 117}. Nos animais suplementados com L-glutamina e L-alanina (DIP, GLN e ALA) a expressão de TNF- α foi reduzida no fígado (Figura 18A), o que indica esta menor inflamação influenciou na redução da esteatose hepática desde animais e progressão para NASH. Além disso, em todos os grupos suplementados não observamos alteração na expressão gênica de IL-6 (Figura 18B). O papel da IL-6 no controle do metabolismo hepático parece ser mais complexo¹¹⁸. Em animais knockout para IL-6 a regeneração hepática é prejudicada. Entretanto altos níveis séricos de IL-6 foram relatados em várias patologias hepáticas que predisõem ao desenvolvimento de doenças crônicas hepáticas, incluindo hepatite aguda, cirrose alcoólica e cirrose biliar primária ^{118; 119}.

Portanto, as suplementações com L-glutamina livre ou como dipeptídeo em modelo experimental de obesidade e RI reduzem a glicemia basal e a resistência periférica à insulina e regulam a secreção de insulina. Estes efeitos foram mediados através da maior capacidade antioxidante, mediado pelo NRF-2 e eixo glutamina/glutathione, bem como por via de a inflamação e citoproteção mediadas por SIRT1 e HSP-70 e NF- κ B . Adicionalmente, a suplementação com L-glutamina e/ou L-alanina demonstrou atuar no metabolismo lipídico reduzindo a esteatose hepática via SRBP-1c.

Cabe salientar que no presente estudo, os grupos suplementados com aminoácidos tanto na forma livre quanto como DIP ingeriram quantidades suprafisiológicas de aminoácidos diariamente. Apesar de não terem sido observadas alterações em biomarcadores de lesão hepática (Tabela 3) e renal (Tabela 4) o presente estudo tem caráter experimental. Nesse sentido, novos estudos em obesos e RI são necessário para confirmar os potenciais efeitos encontrados em modelo animal Ob/Ob, bem como avaliar se estes efeitos podem ser obtidos com doses não suprafisiológicas (e.g. <1g/Kg de peso corporal)^{39; 120; 121}.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que as suplementações com L-glutamina livre ou como dipeptídeo em modelo animal de obesidade e RI reduz a glicemia basal, resistência periférica à insulina e quadro de hiperinsulinemia. Adicionalmente, a suplementação com L-glutamina e/ou L-alanina demonstrou atuar no metabolismo lipídico reduzindo a esteatose hepática. Este efeito foi mediado pela maior translocação do NRF-2 e eixo glutamina/glutathione, reduzindo a inflamação mediada pela via do NF- κ B e aumentando a citoproteção através da via da HSP-70 no fígado e músculo esquelético.

Este estudo representa um avanço para pesquisa com suplementação com L-glutamina como um agente coadjuvante terapêutico em obesos e RI. Entretanto, por se tratar de um estudo experimental, novos estudos em humanos são necessários a fim de confirmar os efeitos terapêuticos, bem como a quantidade e frequência de administração de glutamina em pacientes obesos e RI.

8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 DEVARSHI, P. P.; MCNABNEY, S. M.; HENAGAN, T. M. Skeletal Muscle Nucleo-Mitochondrial Crosstalk in Obesity and Type 2 Diabetes. **Int J Mol Sci**, v. 18, n. 4, Apr 2017. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28420087> >.
- 2 KEANE, K. N. et al. Molecular Events Linking Oxidative Stress and Inflammation to Insulin Resistance and β -Cell Dysfunction. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2015, p. 181643, 2015. ISSN 1942-0994. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26257839> >.
- 3 JAACKS, L. M. et al. The obesity transition: stages of the global epidemic. **Lancet Diabetes Endocrinol**, v. 7, n. 3, p. 231-240, Mar 2019. ISSN 2213-8595. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30704950> >.
- 4 ASRANI, S. K. et al. Burden of liver diseases in the world. **J Hepatol**, v. 70, n. 1, p. 151-171, 01 2019. ISSN 1600-0641. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30266282> >.
- 5 KEANE, K. N. et al. **Molecular events linking oxidative stress and inflammation to insulin resistance and β -cell dysfunction**: no prelo 2015.
- 6 PRADHAN, A. Obesity, metabolic syndrome, and type 2 diabetes: inflammatory basis of glucose metabolic disorders. **Nutr Rev**, v. 65, n. 12 Pt 2, p. S152-6, Dec 2007. ISSN 0029-6643 (Print)0029-6643 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18240540> >.Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1111/j.1753-4887.2007.tb00354.x/asset/j.1753-4887.2007.tb00354.x.pdf?v=1&t=hjgol8te&s=15652a76fec01df9b957022b14fb47be82a13d16> >.
- 7 JUNG, U. J.; CHOI, M. S. 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**, v. 15, n. 4, p. 6184-223, Apr 2014. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24733068> >.
- 8 ASSOCIATION, A. D. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: **Diabetes Care**, v. 43, n. Suppl 1, p. S14-S31, Jan 2020. ISSN 1935-5548. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31862745> >.
- 9 NEWSHOLME, P.; DE BITTENCOURT, P. I., JR. The fat cell senescence hypothesis: a mechanism responsible for abrogating the resolution of

- inflammation in chronic disease. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 17, n. 4, p. 295-305, Jul 2014. ISSN 1473-6519 (Electronic)1363-1950 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24878874> >.
- 10 KOO, S. H. Nonalcoholic fatty liver disease: molecular mechanisms for the hepatic steatosis. **Clin Mol Hepatol**, v. 19, n. 3, p. 210-5, Sep 2013. ISSN 2287-285X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24133660> >.
- 11 GEISLER, C. E.; RENQUIST, B. J. Hepatic lipid accumulation: cause and consequence of dysregulated glucoregulatory hormones. **J Endocrinol**, v. 234, n. 1, p. R1-R21, Jul 2017. ISSN 1479-6805. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28428362> >.
- 12 NEWSHOLME, P. et al. Reactive oxygen and nitrogen species generation, antioxidant defenses, and β -cell function: a critical role for amino acids. **J Endocrinol**, v. 214, n. 1, p. 11-20, Jul 2012. ISSN 1479-6805. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22547566> >.
- 13 _____. Nutrient regulation of insulin secretion and action. **J Endocrinol**, v. 221, n. 3, p. R105-20, Jun 2014. ISSN 1479-6805 (Electronic)0022-0795 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24667247> >.
- 14 MORALES-GONZÁLEZ, J. A. et al. What is Known Regarding the Participation of Factor Nrf-2 in Liver Regeneration? **Cells**, v. 4, n. 2, p. 169-77, May 2015. ISSN 2073-4409. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26010752> >.
- 15 JIMÉNEZ-OSORIO, A. S.; GONZÁLEZ-REYES, S.; PEDRAZA-CHAVERRI, J. Natural Nrf2 activators in diabetes. **Clin Chim Acta**, v. 448, p. 182-192, Jul 2015. ISSN 1873-3492. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26165427> >.
- 16 MATZINGER, M.; FISCHHUBER, K.; HEISS, E. H. Activation of Nrf2 signaling by natural products-can it alleviate diabetes? **Biotechnol Adv**, v. 36, n. 6, p. 1738-1767, 11 2018. ISSN 1873-1899. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29289692> >.
- 17 CALABRESE, V. et al. Oxidative stress, glutathione status, sirtuin and cellular stress response in type 2 diabetes. **Biochim Biophys Acta**, v. 1822, n. 5, p. 729-36, May 2012. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22186191> >.
- 18 SADI, G.; BOZAN, D.; YILDIZ, H. B. Redox regulation of antioxidant enzymes: post-translational modulation of catalase and glutathione peroxidase activity by

- resveratrol in diabetic rat liver. **Mol Cell Biochem**, v. 393, n. 1-2, p. 111-22, Aug 2014. ISSN 1573-4919. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24740756> >.
- 19 ELSHORBAGY, A. K. et al. The association of fasting plasma sulfur-containing compounds with BMI, serum lipids and apolipoproteins. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, v. 22, n. 12, p. 1031-8, Dec 2012. ISSN 1590-3729. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21550220> >.
- 20 _____. The association of cysteine with obesity, inflammatory cytokines and insulin resistance in Hispanic children and adolescents. **PLoS One**, v. 7, n. 9, p. e44166, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22984471> >.
- 21 TIWARI, B. K. et al. Markers of Oxidative Stress during Diabetes Mellitus. **J Biomark**, v. 2013, p. 378790, 2013. ISSN 2090-8660. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26317014> >.
- 22 PATSOURIS, D. et al. Insulin resistance is associated with MCP1-mediated macrophage accumulation in skeletal muscle in mice and humans. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. e110653, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25337938> >.
- 23 XU, L. et al. Roles of Chemokines and Chemokine Receptors in Obesity-Associated Insulin Resistance and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Biomolecules**, v. 5, n. 3, p. 1563-79, 2015. ISSN 2218-273X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26197341> >.
- 24 GUO, S. Insulin signaling, resistance, and the metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms. **J Endocrinol**, v. 220, n. 2, p. T1-T23, Feb 2014. ISSN 1479-6805. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24281010> >.
- 25 SILVEIRA, E. M. et al. Acute exercise stimulates macrophage function: possible role of NF-kappaB pathways. **Cell Biochem Funct**, v. 25, n. 1, p. 63-73, Jan-Feb 2007. ISSN 0263-6484 (Print)0263-6484 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16906627> >.
- 26 KHODABANDEHLOO, H. et al. Molecular and cellular mechanisms linking inflammation to insulin resistance and β -cell dysfunction. **Transl Res**, v. 167, n. 1, p. 228-56, Jan 2016. ISSN 1878-1810. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26408801> >.

- 27 SABIO, G.; DAVIS, R. J. cJun NH2-terminal kinase 1 (JNK1): roles in metabolic regulation of insulin resistance. **Trends Biochem Sci**, v. 35, n. 9, p. 490-6, Sep 2010. ISSN 0968-0004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20452774> >.
- 28 MILIĆ, S.; LULIĆ, D.; ŠTIMAC, D. Non-alcoholic fatty liver disease and obesity: biochemical, metabolic and clinical presentations. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 28, p. 9330-7, Jul 2014. ISSN 2219-2840. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25071327> >.
- 29 PREYAT, N.; LEO, O. Sirtuin deacylases: a molecular link between metabolism and immunity. **J Leukoc Biol**, v. 93, n. 5, p. 669-80, May 2013. ISSN 1938-3673. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23325925> >.
- 30 ZHOU, S.; TANG, X.; CHEN, H. Z. Sirtuins and Insulin Resistance. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 9, p. 748, 2018. ISSN 1664-2392. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30574122> >.
- 31 LIANG, F.; KUME, S.; KOYA, D. SIRT1 and insulin resistance. **Nat Rev Endocrinol**, v. 5, n. 7, p. 367-73, Jul 2009. ISSN 1759-5037. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19455179> >.
- 32 DING, R. B.; BAO, J.; DENG, C. X. Emerging roles of SIRT1 in fatty liver diseases. **Int J Biol Sci**, v. 13, n. 7, p. 852-867, 2017. ISSN 1449-2288. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28808418> >.
- 33 CRUZAT, V. F. et al. Alanyl-glutamine improves pancreatic β -cell function following ex vivo inflammatory challenge. **J Endocrinol**, v. 224, n. 3, p. 261-71, Mar 2015. ISSN 1479-6805. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25550445> >.
- 34 HENSTRIDGE, D. C. et al. Activating HSP72 in rodent skeletal muscle increases mitochondrial number and oxidative capacity and decreases insulin resistance. **Diabetes**, v. 63, n. 6, p. 1881-94, Jun 2014. ISSN 1939-327X (Electronic)0012-1797 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24430435> >. Disponível em: < <http://diabetes.diabetesjournals.org/content/63/6/1881.long> >. Disponível em: < <http://diabetes.diabetesjournals.org/content/63/6/1881.full.pdf> >.
- 35 RAIZEL, R. et al. Determination of the anti-inflammatory and cytoprotective effects of l-glutamine and l-alanine, or dipeptide, supplementation in rats submitted to resistance exercise. **Br J Nutr**, v. 116, n. 3, p. 470-9, Aug 2016. ISSN 1475-2662. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27215379> >.

- 36 DREW, B. G. et al. HSP72 is a mitochondrial stress sensor critical for Parkin action, oxidative metabolism, and insulin sensitivity in skeletal muscle. **Diabetes**, v. 63, n. 5, p. 1488-505, May 2014. ISSN 1939-327X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24379352> >.
- 37 GEIGER, P. C.; GUPTA, A. A. Heat shock proteins are important mediators of skeletal muscle insulin sensitivity. **Exerc Sport Sci Rev**, v. 39, n. 1, p. 34-42, Jan 2011. ISSN 1538-3008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21088604> >.
- 38 MENGE, B. A. et al. Selective amino acid deficiency in patients with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. **Regul Pept**, v. 160, n. 1-3, p. 75-80, Feb 25 2010. ISSN 1873-1686 (Electronic)0167-0115 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19695292> >. Disponível em: < http://ac.els-cdn.com/S0167011509001827/1-s2.0-S0167011509001827main.pdf?_tid=f38008fa-b1bb-11e2-af2c-00000aab0f26&acdnat=1367343337_725119ba5eaf27c04d8282ec91a12650 >.
- 39 CRUZAT, V. et al. Glutamine: Metabolism and Immune Function, Supplementation and Clinical Translation. **Nutrients**, v. 10, n. 11, Oct 2018. ISSN 2072-6643. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30360490> >.
- 40 CURI, R. et al. Glutamine, gene expression, and cell function. **Frontiers in Bioscience**, v. 12, p. 344-357, Jan 1 2007. ISSN 1093-9946. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000243745000025 >.
- 41 CRUZAT, V. F.; PETRY, E. R.; TIRAPÉGUI, J. Glutamine: Biochemical, Metabolic, Molecular Aspects and Supplementation. **Revista Brasileira De Medicina Do Esporte**, v. 15, n. 5, p. 392-397, Sep-Oct 2009. ISSN 1517-8692. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000271570600015 >. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-86922009000600015&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt >.
- 42 NEWSHOLME, P. et al. Glutamine and glutamate as vital metabolites. **Braz J Med Biol Res**, v. 36, n. 2, p. 153-63, Feb 2003. ISSN 0100-879X (Print)0100-879X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12563517> >. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/bjmbr/v36n2/4678.pdf> >.
- 43 CHENG, S. et al. Metabolite profiling identifies pathways associated with metabolic risk in humans. **Circulation**, v. 125, n. 18, p. 2222-31, May 2012.

- ISSN 1524-4539. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22496159> >.
- 44 TAI, E. S. et al. Insulin resistance is associated with a metabolic profile of altered protein metabolism in Chinese and Asian-Indian men. **Diabetologia**, v. 53, n. 4, p. 757-67, Apr 2010. ISSN 1432-0428. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20076942> >.
- 45 MA, W. et al. Dietary glutamine, glutamate and mortality: two large prospective studies in US men and women. **Int J Epidemiol**, Nov 2017. ISSN 1464-3685. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29140419> >.
- 46 CRUZAT, V. F. et al. Oral supplementations with free and dipeptide forms of L-glutamine in endotoxemic mice: effects on muscle glutamine-glutathione axis and heat shock proteins. **J Nutr Biochem**, v. 25, n. 3, p. 345-52, Mar 2014. ISSN 1873-4847 (Electronic)0955-2863 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24524905> >.
- 47 LEITE, J. S. et al. L-glutamine and L-alanine supplementation increase glutamine-glutathione axis and muscle HSP-27 in rats trained using a progressive high-intensity resistance exercise. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 41, n. 8, p. 842-849, Aug 2016. ISSN 1715-5320. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27447686> >.
- 48 ZUHL, M. et al. The effects of acute oral glutamine supplementation on exercise-induced gastrointestinal permeability and heat shock protein expression in peripheral blood mononuclear cells. **Cell Stress Chaperones**, v. 20, n. 1, p. 85-93, Jan 2015. ISSN 1466-1268. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25062931> >.
- 49 BORGES-SANTOS, M. D. et al. Plasma glutathione of HIV⁺ patients responded positively and differently to dietary supplementation with cysteine or glutamine. **Nutrition**, v. 28, n. 7-8, p. 753-6, Jul 2012. ISSN 1873-1244. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22261571> >.
- 50 KIM, M.; WISCHMEYER, P. E. Glutamine. **World Rev Nutr Diet**, v. 105, p. 90-6, 2013. ISSN 1662-3975 (Electronic)0084-2230 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23075590> >. Disponível em: < <http://www.karger.com/Article/PDF/341276> >. Disponível em: < <http://www.karger.com/Article/Abstract/341276> >.
- 51 NEWSHOLME, P. Why is L-glutamine metabolism important to cells of the immune system in health, postinjury, surgery or infection? **J Nutr**, v. 131, n. 9 Suppl, p. 2515S-22S; discussion 2523S-4S, Sep 2001. ISSN 0022-3166

- (Print)0022-3166 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11533304> >.
- 52 CRUZAT, V. F.; KRAUSE, M.; NEWSHOLME, P. Amino acid supplementation and impact on immune function in the context of exercise. **J Int Soc Sports Nutr**, v. 11, n. 1, p. 61, 2014. ISSN 1550-2783. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25530736> >.
- 53 PETRY, E. R. et al. Alanyl-glutamine and glutamine plus alanine supplements improve skeletal redox status in trained rats: involvement of heat shock protein pathways. **Life Sci**, v. 94, n. 2, p. 130-6, Jan 17 2014. ISSN 1879-0631 (Electronic)0024-3205 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24269578> >.
- 54 CRUZAT, V. F.; ROGERO, M. M.; TIRAPEGUI, J. Effects of supplementation with free glutamine and the dipeptide alanyl-glutamine on parameters of muscle damage and inflammation in rats submitted to prolonged exercise. **Cell Biochemistry and Function**, v. 28, n. 1, p. 24-30, Jan 2010. ISSN 0263-6484. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000273691200003 >. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1002/cbf.1611/asset/1611ftp.pdf?v=1&t=he4tkzzb&s=5d1031f7f1715e408cf8e017cea8c3d3718ca87d> >.
- 55 PETRY, E. R. et al. L-glutamine Supplementations Enhance Liver Glutamine-Glutathione Axis and Heat Shock Factor-1 Expression in Endurance-Exercise Trained Rats. **Int J Sport Nutr Exerc Metab**, v. 25, n. 2, p. 188-97, Apr 2015. ISSN 1543-2742 (Electronic)1526-484X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25202991> >.
- 56 CRUZAT, V. F. et al. Oral free and dipeptide forms of glutamine supplementation attenuate oxidative stress and inflammation induced by endotoxemia. **Nutrition**, v. 30, n. 5, p. 602-11, May 2014. ISSN 1873-1244 (Electronic)0899-9007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24698353> >.
- 57 RAGHUPATHY, V. et al. Enteral glutamine differentially regulates Nrf 2 along the villus-crypt axis of the intestine to enhance glutathione levels. **J Gastroenterol Hepatol**, Jun 2015. ISSN 1440-1746. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26095579> >.
- 58 WANG, A. L. et al. Glutamine ameliorates intestinal ischemia-reperfusion Injury in rats by activating the Nrf2/Are signaling pathway. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 8, n. 7, p. 7896-904, 2015. ISSN 1936-2625. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26339354> >.

- 59 PRADA, P. O. et al. L-glutamine supplementation induces insulin resistance in adipose tissue and improves insulin signalling in liver and muscle of rats with diet-induced obesity. **Diabetologia**, v. 50, n. 9, p. 1949-59, Sep 2007. ISSN 0012-186X (Print)0012-186X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17604977> >. Disponível em: < <http://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs00125-007-0723-z.pdf> >.
- 60 BOCK, P. M. et al. Oral supplementations with L-glutamine or L-alanyl-L-glutamine do not change metabolic alterations induced by long-term high-fat diet in the B6.129F2/J mouse model of insulin resistance. **Mol Cell Biochem**, v. 411, n. 1-2, p. 351-62, Jan 2016. ISSN 1573-4919. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26530165> >.
- 61 LAVIANO, A. et al. Glutamine supplementation favors weight loss in nondieting obese female patients. A pilot study. **Eur J Clin Nutr**, v. 68, n. 11, p. 1264-6, Nov 2014. ISSN 1476-5640. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25226827> >.
- 62 BARROS, C. C. et al. Efficient method for obtaining Lep(ob)/Lep(ob)-derived animal models using adipose tissue transplantations. **Int J Obes (Lond)**, v. 33, n. 8, p. 938-44, Aug 2009. ISSN 1476-5497. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19528967> >.
- 63 LACY, P. E.; KOSTIANOVSKY, M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. **Diabetes**, v. 16, n. 1, p. 35-9, Jan 1967. ISSN 0012-1797 (Print)0012-1797 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5333500> >. Disponível em: < <http://diabetes.diabetesjournals.org/content/16/1/35.full.pdf> >.
- 64 KINASIEWICZ, A. et al. Pancreatic islets isolation using different protocols with in situ flushing and intraductal collagenase injection. **Physiol Res**, v. 53, n. 3, p. 327-33, 2004. ISSN 0862-8408 (Print)0862-8408 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15209541> >.
- 65 LUND , P. Determination of glutamine with glutaminase and glutamate dehydrogenase. **Methods of Enzymatic Analysis**, p. . 357-363, 1985.
- 66 DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods Enzymol**, v. 186, p. 421-31, 1990. ISSN 0076-6879 (Print)0076-6879 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2233309> >.
- 67 FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **J Biol Chem**, v.

- 226, n. 1, p. 497-509, May 1957. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13428781> >.
- 68 VAN DER VIES, J. Two methods for the determination of glycogen in liver. **Biochem J**, v. 57, n. 3, p. 410-6, Jul 1954. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13181850> >.
- 69 LAEMMLI, U. K.; BEGUIN, F.; GUJER-KELLENBERGER, G. A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. **J Mol Biol**, v. 47, n. 1, p. 69-85, Jan 14 1970. ISSN 0022-2836 (Print)0022-2836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5413343> >.
- 70 CATTAPRETA, M. et al. A critical analysis of three quantitative methods of assessment of hepatic steatosis in liver biopsies. **Virchows Arch**, v. 459, n. 5, p. 477-85, Nov 2011. ISSN 1432-2307. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21901430> >.
- 71 MEHLEM, A. et al. Imaging of neutral lipids by oil red O for analyzing the metabolic status in health and disease. **Nat Protoc**, v. 8, n. 6, p. 1149-54, Jun 2013. ISSN 1750-2799. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23702831> >.
- 72 COBBINA, E.; AKHLAGHI, F. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) - pathogenesis, classification, and effect on drug metabolizing enzymes and transporters. **Drug Metab Rev**, v. 49, n. 2, p. 197-211, May 2017. ISSN 1097-9883. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28303724> >.
- 73 HU, M. et al. Steatosis and NASH in type 2 diabetes. **Biochimie**, Oct 2017. ISSN 1638-6183. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29097281> >.
- 74 GOMES, E. C.; SILVA, A. N.; DE OLIVEIRA, M. R. Oxidants, antioxidants, and the beneficial roles of exercise-induced production of reactive species. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2012, p. 756132, 2012. ISSN 1942-0994 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22701757> >.
- 75 RUTTEN, E. P. et al. Skeletal muscle glutamate metabolism in health and disease: state of the art. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 8, n. 1, p. 41-51, Jan 2005. ISSN 1363-1950 (Print)1363-1950 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15585999> >.
- 76 CHARTOUMPEKIS, D. V. et al. Hepatic gene expression profiling in Nrf2 knockout mice after long-term high-fat diet-induced obesity. **Oxid Med Cell**

- Longev**, v. 2013, p. 340731, 2013. ISSN 1942-0994. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23710285> >.
- 77 ROGERO, M. M.; CALDER, P. C. Obesity, Inflammation, Toll-Like Receptor 4 and Fatty Acids. **Nutrients**, v. 10, n. 4, Mar 2018. ISSN 2072-6643. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29601492> >.
- 78 GIRIDHARAN, S.; SRINIVASAN, M. Mechanisms of NF- κ B p65 and strategies for therapeutic manipulation. **J Inflamm Res**, v. 11, p. 407-419, 2018. ISSN 1178-7031. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30464573> >.
- 79 SI, F. L. et al. HSP superfamily of genes in the malaria vector *Anopheles sinensis*: diversity, phylogenetics and association with pyrethroid resistance. **Malar J**, v. 18, n. 1, p. 132, Apr 2019. ISSN 1475-2875. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30975215> >.
- 80 KIM, C. W. et al. Acetyl CoA Carboxylase Inhibition Reduces Hepatic Steatosis but Elevates Plasma Triglycerides in Mice and Humans: A Bedside to Bench Investigation. **Cell Metab**, v. 26, n. 2, p. 394-406.e6, Aug 2017. ISSN 1932-7420. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28768177> >.
- 81 GANNON, N. P.; SCHNUCK, J. K.; VAUGHAN, R. A. BCAA Metabolism and Insulin Sensitivity - Dysregulated by Metabolic Status? **Mol Nutr Food Res**, v. 62, n. 6, p. e1700756, 03 2018. ISSN 1613-4133. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29377510> >.
- 82 ETGEN, G. J.; OLDHAM, B. A. Profiling of Zucker diabetic fatty rats in their progression to the overt diabetic state. **Metabolism**, v. 49, n. 5, p. 684-8, May 2000. ISSN 0026-0495. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10831184> >.
- 83 WANG, S. M. et al. Identification of serum metabolites associated with obesity and traditional risk factors for metabolic disease in Chinese adults. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, Oct 2017. ISSN 1590-3729. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29122443> >.
- 84 ABBOUD, K. Y. et al. Oral Glutamine Supplementation Reduces Obesity, Pro-Inflammatory Markers, and Improves Insulin Sensitivity in DIO Wistar Rats and Reduces Waist Circumference in Overweight and Obese Humans. **Nutrients**, v. 11, n. 3, Mar 2019. ISSN 2072-6643. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30832230> >.

- 85 ROGERO, M. M. et al. Effect of alanyl-glutamine supplementation on plasma and tissue glutamine concentrations in rats submitted to exhaustive exercise. **Nutrition**, v. 22, n. 5, p. 564-71, May 2006. ISSN 0899-9007 (Print)0899-9007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16472983> >.
- 86 BROER, S. Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia. **Physiol Rev**, v. 88, n. 1, p. 249-86, Jan 2008. ISSN 0031-9333 (Print)0031-9333 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18195088> >.
- 87 BATTEZZATI, A. et al. Splanchnic utilization of enteral alanine in humans. **Metabolism**, v. 48, n. 7, p. 915-21, Jul 1999. ISSN 0026-0495 (Print)0026-0495 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10421236> >.
- 88 CUNNINGHAM, G. A. et al. L-Alanine induces changes in metabolic and signal transduction gene expression in a clonal rat pancreatic beta-cell line and protects from pro-inflammatory cytokine-induced apoptosis. **Clin Sci (Lond)**, v. 109, n. 5, p. 447-55, Nov 2005. ISSN 0143-5221. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16045439> >.
- 89 BACHMANOV, A. A. et al. Genetics of Amino Acid Taste and Appetite. **Adv Nutr**, v. 7, n. 4, p. 806S-22S, Jul 2016. ISSN 2156-5376. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27422518> >.
- 90 YAZDI, F. T.; CLEE, S. M.; MEYRE, D. Obesity genetics in mouse and human: back and forth, and back again. **PeerJ**, v. 3, p. e856, 2015. ISSN 2167-8359. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25825681> >.
- 91 GREENFIELD, J. R. et al. Oral glutamine increases circulating glucagon-like peptide 1, glucagon, and insulin concentrations in lean, obese, and type 2 diabetic subjects. **Am J Clin Nutr**, v. 89, n. 1, p. 106-113, Jan 2009. ISSN 1938-3207. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19056578> >.
- 92 BLÜHER, M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. **Nat Rev Endocrinol**, v. 15, n. 5, p. 288-298, 05 2019. ISSN 1759-5037. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30814686> >.
- 93 FINCK, B. N. Targeting Metabolism, Insulin Resistance, and Diabetes to Treat Nonalcoholic Steatohepatitis. **Diabetes**, v. 67, n. 12, p. 2485-2493, 12 2018. ISSN 1939-327X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30459251> >.
- 94 BOLAND, B. B.; RHODES, C. J.; GRIMSBY, J. S. The dynamic plasticity of insulin production in β -cells. **Mol Metab**, v. 6, n. 9, p. 958-973, Sep 2017. ISSN

- 2212-8778. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28951821> >.
- 95 DUBUC, P. U. The development of obesity, hyperinsulinemia, and hyperglycemia in ob/ob mice. **Metabolism**, v. 25, n. 12, p. 1567-74, Dec 1976. ISSN 0026-0495 (Print)0026-0495 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/994838> >.
- 96 ARAUJO, T. R. et al. Benefits of L-alanine or L-arginine supplementation against adiposity and glucose intolerance in monosodium glutamate-induced obesity. **Eur J Nutr**, v. 56, n. 6, p. 2069-2080, Sep 2017. ISSN 1436-6215. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27317126> >.
- 97 MCCLENAGHAN, N. H. et al. Prolonged L-alanine exposure induces changes in metabolism, Ca(2+) handling and desensitization of insulin secretion in clonal pancreatic beta-cells. **Clin Sci (Lond)**, v. 116, n. 4, p. 341-51, Feb 2009. ISSN 1470-8736. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18702613> >.
- 98 KITADE, H. et al. Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Insulin Resistance: New Insights and Potential New Treatments. **Nutrients**, v. 9, n. 4, Apr 2017. ISSN 2072-6643. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28420094> >.
- 99 FURUKAWA, S. et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. **J Clin Invest**, v. 114, n. 12, p. 1752-61, Dec 2004. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15599400> >.
- 100 LIU, Z. et al. Deletion of Nrf2 leads to hepatic insulin resistance via the activation of NF-κB in mice fed a high-fat diet. **Mol Med Rep**, v. 14, n. 2, p. 1323-31, Aug 2016. ISSN 1791-3004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27315552> >.
- 101 YOH, K. et al. Hyperglycemia induces oxidative and nitrosative stress and increases renal functional impairment in Nrf2-deficient mice. **Genes Cells**, v. 13, n. 11, p. 1159-70, Nov 2008. ISSN 1365-2443. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19090810> >.
- 102 CRUZAT, V. F. et al. Alanyl-glutamine improves pancreatic beta-cell function following ex vivo inflammatory challenge. **J Endocrinol**, v. 224, n. 3, p. 261-71, Mar 2015. ISSN 1479-6805 (Electronic)0022-0795 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25550445> >.

- 103 WANG, R. H. et al. Hepatic Sirt1 deficiency in mice impairs mTorc2/Akt signaling and results in hyperglycemia, oxidative damage, and insulin resistance. **J Clin Invest**, v. 121, n. 11, p. 4477-90, Nov 2011. ISSN 1558-8238. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21965330> >.
- 104 CARON, A. Z. et al. The SIRT1 deacetylase protects mice against the symptoms of metabolic syndrome. **FASEB J**, v. 28, n. 3, p. 1306-16, Mar 2014. ISSN 1530-6860. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24297700> >.
- 105 GUARENTE, L. Calorie restriction and sirtuins revisited. **Genes Dev**, v. 27, n. 19, p. 2072-85, Oct 2013. ISSN 1549-5477. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24115767> >.
- 106 MENDES, K. L.; LELIS, D. F.; SANTOS, S. H. S. Nuclear sirtuins and inflammatory signaling pathways. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 38, p. 98-105, Dec 2017. ISSN 1879-0305. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29132743> >.
- 107 LEITE, J. S. M.; CRUZAT, V. F.; KRAUSE, M. B. J., PAULO IVO. **Physiological regulation of the heat shock response by glutamine: implications for chronic low-grade inflammatory diseases in age-related conditions:** Nutrire. 41: 17 p. 2016.
- 108 AKERFELT, M.; MORIMOTO, R. I.; SISTONEN, L. Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 11, n. 8, p. 545-55, Aug 2010. ISSN 1471-0080 (Electronic)1471-0072 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20628411> >. Disponível em: < <http://www.nature.com/nrm/journal/v11/n8/pdf/nrm2938.pdf> >.
- 109 CHUNG, J. et al. HSP72 protects against obesity-induced insulin resistance. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 5, p. 1739-44, Feb 5 2008. ISSN 1091-6490 (Electronic)0027-8424 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18223156 >.
- 110 WESTERHEIDE, S. D. et al. Stress-inducible regulation of heat shock factor 1 by the deacetylase SIRT1. **Science**, v. 323, n. 5917, p. 1063-6, Feb 2009. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19229036> >.
- 111 YUAN, Y. et al. Regulation of SIRT1 in aging: Roles in mitochondrial function and biogenesis. **Mech Ageing Dev**, v. 155, p. 10-21, Mar 2016. ISSN 1872-6216. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26923269> >.

- 112 PRADA, P. O. et al. L-glutamine supplementation induces insulin resistance in adipose tissue and improves insulin signalling in liver and muscle of rats with diet-induced obesity. **Diabetologia**, v. 50, n. 9, p. 1949-1959, Sep 2007. ISSN 0012-186X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000248771800020 >.Disponível em: < http://download.springer.com/static/pdf/827/art%253A10.1007%252Fs00125-007-0723-z.pdf?auth66=1364147170_81054660a3530446fd9212c6d2994938&ext=.pdf >.
- 113 DE URBINA, J. J. O. et al. Effects Of Oral Glutamine on Inflammatory and Autophagy Responses in Cancer Patients Treated With Abdominal Radiotherapy: A Pilot Randomized Trial. **Int J Med Sci**, v. 14, n. 11, p. 1065-1071, 2017. ISSN 1449-1907. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29104459> >.
- 114 LI, B. et al. Liver injury attenuation by curcumin in a rat NASH model: an Nrf2 activation-mediated effect? **Ir J Med Sci**, v. 185, n. 1, p. 93-100, Feb 2016. ISSN 1863-4362. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25385666> >.
- 115 HARDWICK, R. N. et al. Diversity in antioxidant response enzymes in progressive stages of human nonalcoholic fatty liver disease. **Drug Metab Dispos**, v. 38, n. 12, p. 2293-301, Dec 2010. ISSN 1521-009X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20805291> >.
- 116 WULLAERT, A. et al. Hepatic tumor necrosis factor signaling and nuclear factor-kappaB: effects on liver homeostasis and beyond. **Endocr Rev**, v. 28, n. 4, p. 365-86, Jun 2007. ISSN 0163-769X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17431229> >.
- 117 AKASH, M. S. H.; REHMAN, K.; LIAQAT, A. Tumor Necrosis Factor-Alpha: Role in Development of Insulin Resistance and Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. **J Cell Biochem**, v. 119, n. 1, p. 105-110, 01 2018. ISSN 1097-4644. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28569437> >.
- 118 SCHMIDT-ARRAS, D.; ROSE-JOHN, S. IL-6 pathway in the liver: From physiopathology to therapy. **J Hepatol**, v. 64, n. 6, p. 1403-15, 06 2016. ISSN 1600-0641. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26867490> >.
- 119 ALEKSANDROVA, K. et al. Inflammatory and metabolic biomarkers and risk of liver and biliary tract cancer. **Hepatology**, v. 60, n. 3, p. 858-71, Sep 2014. ISSN

1527-3350. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24443059> >.

120 WISCHMEYER, P. E. et al. Parenteral glutamine supplementation in critical illness: a systematic review. **Crit Care**, v. 18, n. 2, p. R76, 2014. ISSN 1466-609X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24745648> >.

121 ZIEGLER, T. R. et al. Efficacy and Safety of Glutamine-supplemented Parenteral Nutrition in Surgical ICU Patients: An American Multicenter Randomized Controlled Trial. **Ann Surg**, v. 263, n. 4, p. 646-55, Apr 2016. ISSN 1528-1140. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26501700> >.