

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE – ICBS
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FISIOLOGIA

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE GLUTAMINA E DIPEPTÍDEO L-ALANIL-
L-GLUTAMINA SOBRE A EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DE CHOQUE
TÉRMICO DE 70 kDa (HSP70) E A SINALIZAÇÃO DA INSULINA EM
CAMUNDONGOS TRATADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA**

Patrícia Martins Bock

PORTO ALEGRE

2015

Patrícia Martins Bock

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE GLUTAMINA E DIPEPTÍDEO L-ALANIL-L-GLUTAMINA SOBRE A EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO DE 70 kDa (HSP70) E A SINALIZAÇÃO DA INSULINA EM CAMUNDONGOS TRATADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Fisiologia.

Orientador: Paulo Ivo Homem de Bittencourt Jr.

PORTO ALEGRE

2015

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, Carlos Silveira Bock e Olinda Cecília Bock, um pedreiro e uma costureira que valorizaram a educação das filhas, possibilitando a graduação de ambas na Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Agradecimentos

Aos meus pais, pelas oportunidades que me deram na vida, e por terem me ensinado desde criança que estudar é prazeroso.

À minha irmã Adriana, pelo apoio incondicional e por todas as conversas pedagógicas e científicas.

À Juliana, minha afilhada maravilhosa, por “me levar” ao cinema para assistir desenhos e por sempre ser uma companhia fantástica.

Ao Fabiano, pelo carinho, pela companhia, pela paciência, pela ajuda na instalação dos inúmeros programas para a análise dos dados, mas principalmente, por acreditar em minha capacidade sempre, algumas vezes até mais do que eu.

Aos amigos (muitos, não vou nomear pois posso esquecer alguém), pelos momentos de descontração, de dança, de corrida, de botecos: vocês salvaram minha vida.

Ao professor Paulo Ivo, por ter aceitado ser meu orientador, mesmo que eu estivesse voltando para fazer doutorado 11 anos após ter terminado o mestrado, obrigada por me permitir aprender com um gênio.

Aos meus co-orientadores não oficiais, Maurício e Hilton, pelas ideias, por estarem sempre prontos a ajudar, tanto nos experimentos quanto nas discussões de resultados e na leitura e correções da tese e do artigo. Um agradecimento especial ao Maurício, por ser um exemplo de profissional e de pessoa, e pelos bilhetes de incentivo toda manhã no café, eles foram muito importantes, particularmente aquele: “Hoje tudo vai dar certo, até a eletroforese”.

Às queridas Gabriela Hahn e Helena Schroeder, que trabalharam durante a iniciação científica neste trabalho, agradeço pela ajuda interminável nos experimentos, desde toda a limpeza do biotério, procriação e sexagem dos animais, preparo de ração, infundáveis gavagens, até todo o processamento e análise das amostras: vocês são incríveis, minhas biomédicas favoritas.

Aos colegas do Fiscel que ajudaram em experimentos: Cínthia, Inês, Maciel, Luiz, Grazi. Sem vocês eu não teria conseguido.

Aos colegas que me ensinaram muito sobre o trabalho no Fiscel: Rossana, Cinthia, Claudinha, Maciel e Sofia. Obrigada pela paciência.

Aos demais colegas do Fiscel, que simplesmente dividiram momentos de dificuldades, alegrias, lanches, conversas ou discussões científicas: Victor,

Dona Ritinha, Nelson, Patricia, Vinícius, Joli, Leandro, Bolívar, Ana, Aline, Maycon, Ítalo, Thiago, Tati, Antônio, Mirna, Míriam, Guilherme. Obrigada pela parceria e apoio.

Aos “vizinhos” e amigos do LEAO, professora Adriane Belló-Klein, professor Alex Araújo, Tânia, meus colegas de doutorado, e todos os integrantes do laboratório, obrigada por terem as portas sempre abertas.

Ao Programa de Pós Graduação em Fisiologia da UFRGS, pela oportunidade de fazer este trabalho, aos seus professores e funcionários, pelo constante aprendizado e convivência, particularmente aos professores Alex Araújo e Maria Flávia pelas dicas e palavras de incentivo.

Aos membros da banca, por aceitarem o convite.

Fontes de Financiamento

Os estudos aqui apresentados foram financiados com recursos públicos provenientes dos seguintes editais do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq): MCT/ CNPq/ CT-Bio/ CT-Saúde/ MS/ SCTIE/ DECIT (processos nº 551097/2007-8 e nº 563870/2010-9) e Ciência sem Fronteiras (processos nº 402364/2012-0 e nº 402626/2012-5). O trabalho contou ainda com apoio financeiro das Pró-Reitorias de Planejamento (PROPLAN), de Pós-Graduação (PROPG, Programa CAPES-PROAP) e de pesquisa (PROPESQ) da UFRGS.

“Nada na vida deve ser temido, somente compreendido. Agora é hora de compreender mais para temer menos”

Marie Curie

Sumário

Lista de figuras	xi
Lista de abreviaturas	xv
Resumo	xvii
Abstract	xviii
1. Introdução.....	1
1.1 Dieta Hiperlipídica	2
1.1.1 Obesidade, Tecido Adiposo e Senescência Celular	4
1.1.2 Ácidos Graxos e Resposta Inflamatória.....	5
1.1.3 Inflamação e Resistência à Insulina.....	8
1.2 Proteínas de Choque Térmico (HSPs).....	11
1.2.1 HSPs, Inflamação e <i>Diabetes Mellitus</i>	13
1.3 A Glutamina na Obesidade e no Diabetes	18
1.3.1 Glutamina e HSP	20
2. Hipótese.....	23
3. Objetivos.....	24
3.1 Objetivos Gerais.....	24
3.2 Objetivos Específicos.....	24
4. Materiais e Métodos.....	25
4.1 Local de Realização dos Experimentos	25
4.2 Considerações Éticas.....	25
4.3 Cálculo do Tamanho Amostral	25
4.4 Características Relacionadas à Biossegurança	26
4.5 Animais	27
4.5.1 Morte dos Animais	27
4.6 Delineamento do Experimento 1	28
4.6.1 Linha Temporal.....	30
4.7 Delineamento do Experimento 2	30
4.8 Determinação de Peso dos Animais e Consumo de Ração.....	31
4.9 Determinação do Índice de Lee	31
4.10 Teste Oral de Tolerância à Glicose (O-GTT)	31

4.11	Teste de Tolerância Intraperitoneal à Glicose (IP-GTT)	32
4.12	Teste de Tolerância à Insulina (ITT)	33
4.13	Obtenção do plasma.....	34
4.14	Determinação de triglicerídeos plasmáticos.....	34
4.15	Determinação de colesterol total plasmático.....	34
4.16	Determinação de Glutamina	35
4.17	Determinação de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico.....	36
4.18	Determinação de Proteínas Totais nas Amostras.....	36
4.19	Determinação de Glicogênio Hepático.....	37
4.20	Determinação de Glutamina Total Hepática	38
4.21	Análise da Expressão de Proteínas por Western Blotting.....	38
4.22	Análise estatística	40
5.	Resultados.....	41
5.1	Resultados do Experimento 1	41
5.1.1	Peso dos Animais Pré-Suplementação.....	42
5.1.2	Glicemia de Jejum Pré-Suplementação.....	43
5.1.3	O-GTT Pré-Suplementação	43
5.1.4	Consumo de Ração Semanal Durante a Suplementação.....	44
5.1.5	Variação de Peso dos Animais Durante a Suplementação.....	45
5.1.6	Gordura Abdominal Total.....	46
5.1.7	Teste Oral de Tolerância à Glicose Após a Suplementação.....	47
5.1.8	Teste Intraperitoneal de Tolerância à Glicose Após a Suplementação	50
5.1.9	Teste de Tolerância à Insulina Após a Suplementação	51
5.1.10	Triglicerídeos Plasmáticos	52
5.1.11	Colesterol Total Plasmático	52
5.1.12	Concentração de Glutamina Muscular.....	53
5.1.13	Efeito da HFD e Suplementação de Aminoácidos na Expressão de HSP70 no Músculo Esquelético.....	54
5.1.14	Efeito da HFD e Suplementação de Aminoácidos na Expressão de TLR4 no Músculo Esquelético	55
5.1.15	Efeito da HFD e Suplementação de Aminoácidos na Expressão de Akt-P no Músculo Esquelético	56
5.1.16	Efeito da HFD e Suplementação de Aminoácidos na Expressão de IR-P no Músculo Esquelético.....	57

5.1.17 TBA-RS no fígado.....	58
5.1.18 Glutathiona Total Hepática	59
5.1.19 Glicogênio Hepático.....	60
5.1.20 Efeito da HFD e Suplementação de Aminoácidos na Expressão de HSP70 Hepática	60
5.1.21 Efeito da HFD e Suplementação de Aminoácidos na Expressão de TLR4 Hepático.....	61
5.1.22 Efeito da HFD e Suplementação de Aminoácidos na Expressão de Akt-P Hepática.....	62
5.1.23 Efeito da HFD e Suplementação de Aminoácidos na Expressão e Fosforilação de Receptor de Insulina Hepático	63
5.2 Resultados do Experimento 2	64
5.2.1 Variação de Peso dos Animais	64
5.2.2 Consumo de Ração Semanal	65
5.2.3 Teste Oral de Tolerância à Glicose.....	66
5.2.4 Gordura Abdominal Total.....	69
5.2.5 Triglicerídeos Plasmáticos	69
5.2.6 Colesterol Total Plasmático	70
6. Discussão	71
Conclusão	87
Perspectivas.....	88
Referências Bibliográficas	89
Material Complementar	xvii
Documento Comprobatório da Submissão do Artigo	xvii
Cópia do Arquivo Eletrônico do Artigo Submetido para Publicação.....	xvii

Lista de figuras

Figura 1: Inflamação do Tecido Adiposo Relacionada com o Aumento de Ácidos Graxos Plasmáticos. Fonte: O autor.....	8
Figura 2: Mecanismos de redução da sinalização da insulina por ácidos graxos intracelulares e citocinas pró-inflamatórias. Fonte: O autor.	9
Figura 3: Efeitos das HSP intracelulares em células responsivas à insulina. Fonte: O autor.	17
Figura 4: Desenvolvimento do experimento 1.	30
Figura 5: Peso dos animais B6129SF2-J antes do início da suplementação. Dados expressos em média + epm, n=11-13 por grupo. ANOVA de uma via seguida de SNK. F=11,09. * representa valores significativos nos grupos HFD em relação à dieta padrão em cada mês (P<0,001).....	42
Figura 6: Representação de animal B6129SF2-J que recebeu HFD juntamente com animal que recebeu dieta padrão.	42
Figura 7: Glicemia de jejum dos camundongos B6129SF2-J. São representados os valores de glicemia de jejum nos grupos experimentais Dieta Padrão e HFD no mês 5 de administração de dieta. Dados expressos em média + epm, n=11 por grupo. Teste T (P=0,3687).	43
Figura 8: Teste de tolerância à glicose oral nos camundongos B6129SF2-J. São representadas as áreas sob a curva (AUC) nos grupos experimentais Dieta Padrão e HFD. Dados expressos em média + epm, n=11-13 por grupo. ANOVA de medidas repetidas (P=0,1136; F=1,996).	44
Figura 9: Consumo de ração durante o período de suplementação. Dados expressos em Joules por semana (kJ/peso de animal/semana). Os grupos com suplementação de aminoácidos apresentaram menor consumo do que o grupo controle. ANOVA de medidas repetidas (P<0,0001).	44
Figura 10: Variação de peso dos animais B6129SF2-J. São representados os valores de peso nos grupos experimentais, ao início e ao final do período de suplementação. Dados expressos em média + epm, n=11-12 por grupo. ANOVA de uma via, seguida por SNK (P=0,9692).	45
Figura 11: Índice de Lee dos animais B6129SF2-J. Índice de Lee nos grupos experimentais, ao início, no final do primeiro mês e ao final do período de suplementação. Dados expressos em média + epm, n=5 por grupo. ANOVA de uma via, seguida por SNK.....	46
Figura 12: Peso dos animais B6129SF2-J após o período de 7 meses de HFD. Dados expressos em média + epm, n=12-15 por grupo. Teste T. * representa valores significativos no grupo HFD em relação à dieta padrão (P=0,0317)....	46
Figura 13: Peso da gordura abdominal total dos camundongos B6129SF2-J. Resultados expressos em média + epm, n= 11-15 por grupo. ANOVA de uma via, seguida por SNK. F=5,085 * representa valores significativos em relação à dieta padrão (p<0,0005).	47

Figura 14: Teste de tolerância à glicose oral dos camundongos B6129SF2-J. Na parte superior/menor, respectiva área sob a curva. Resultados expressos em média + epm, n= 11-13 por grupo. ANOVA de uma via, seguida por SNK. F=2,110, P=0,0751.....	48
Figura 15: Glicemia de jejum dos camundongos B6129SF2-J nos grupos dieta padrão e HFD ao final de 7 meses de tratamento. Dados expressos em média + epm, n=10-11 por grupo. Teste T. * representa valores significativos em relação à dieta padrão (P=0,0162).....	49
Figura 16: Glicemia de jejum nos grupos experimentais ao final do período de suplementação. Dados expressos em média + epm, n=11-13 por grupo. ANOVA de uma via, seguida por SNK. F=0,1292, P=0,9710.....	49
Figura 17: Teste de tolerância à glicose intraperitoneal dos camundongos B6129SF2-J. Na parte superior/menor, respectiva área sob a curva. Resultados expressos em média + epm, n= 4-10 por grupo. ANOVA de uma via, seguida por SNK. F=4,211, P= 0,065.....	50
Figura 18: Teste de tolerância à insulina dos camundongos B6129SF2-J. Na parte superior, área sob a curva. Resultados expressos em média + epm, n= 3-7. * valores significativos em relação à dieta padrão. ANOVA de uma via, seguida por SNK. F=25,14, p<0,0001.....	51
Figura 19: Triglicérides plasmáticos dos camundongos B6129SF2-J. Resultados expressos em média + epm, n= 11-15 por grupo. ANOVA de uma via, seguida por SNK. F=0,2636. p=0,9312.....	52
Figura 20: Colesterol total plasmático dos camundongos B6129SF2-J. Resultados expressos em média + epm, n= 11-15 por grupo. ANOVA de uma via, seguida por SNK. F=10,73 * representa valores significativos em relação à dieta padrão (p<0,0001).....	53
Figura 21: Concentração de glutamina muscular dos camundongos B6129SF2-J. Resultados expressos em média + epm, n= 4-5 por grupo. ANOVA de uma via, seguida por SNK. F=0,3489. p=0,8415.....	54
Figura 22: Imunodeteção de HSP70 no músculo sóleo de camundongos B6129SF2-J. Resultados expressos em média + epm, n= 4 por grupo. ANOVA de uma via, seguida por SNK. F=0,6729. Não houve diferença estatística entre os grupos (p=0,6492).....	55
Figura 23: Imunodeteção de TLR4 no músculo sóleo de camundongos B6129SF2-J. Resultados expressos em média + epm, n= 5 por grupo. ANOVA de uma via, seguida por SNK. F=1,937. Não houve diferença estatística entre os grupos (p=0,1253).....	56
Figura 24: Imunodeteção de Akt-P no músculo sóleo de camundongos B6129SF2-J. Resultados expressos em média + epm, n= 6 por grupo. ANOVA de uma via, seguida por SNK. F=1,170. Não houve diferença estatística entre os grupos (p=0,3469).....	57
Figura 25: Imunodeteção de IR-P no músculo sóleo de camundongos B6129SF2-J. Resultados expressos em média + epm, n= 6 por grupo. ANOVA	

de uma via, seguida por SNK. F=1,024. Não houve diferença estatística entre os grupos (p=0,4129).	58
Figura 26: TBA-RS no fígado de camundongos B6129SF2-J. Resultados em eq. de MDA e expressos em média + epm, n= 5-8 por grupo. ANOVA de uma via, seguida por SNK. F=0,9759. * representa valores significativos em relação ao grupo que recebeu dieta padrão (p=0,4461).	59
Figura 27: Glutathiona total hepática de camundongos B6129SF2-J. Resultados representados em nMol/grama de tecido, e expressos em média + epm, n= 4-5 por grupo. ANOVA de uma via, seguida por SNK. F=0,9926. Não houve diferença estatística entre os grupos (p=0,4512)	59
Figura 28: Glicogênio hepático de camundongos B6129SF2-J. Resultados em mg de glicogênio/grama de tecido, e expressos em média + epm, n= 5-7 por grupo. ANOVA de uma via, seguida por SNK. F=1,354. Não houve diferença estatística entre os grupos (p=0,2684).	60
Figura 29: Imunodeteção de HSP70 no fígado de camundongos B6129SF2-J. Resultados expressos em média + epm, n= 6 por grupo. ANOVA de uma via, seguida por SNK. F=2,592. * representa valores significativos em relação ao grupo que recebeu dieta padrão (p=0,0373).	61
Figura 30: Imunodeteção de TLR4 no fígado de camundongos B6129SF2-J. Resultados expressos em média + epm, n= 4 por grupo. ANOVA de uma via, seguida por SNK. F=0,6598. Não houve diferença estatística entre os grupos (p=0,6606).	62
Figura 31: Imunodeteção de Akt-P no fígado de camundongos B6129SF2-J. Resultados expressos em média + epm, n= 7 por grupo. ANOVA de uma via, seguida por SNK. F=0,6522. Não houve diferença estatística entre os grupos (p=0,6617).	63
Figura 32: Imunodeteção de IR-P e IR total no fígado de camundongos B6129SF2-J. Resultados expressos em média + epm, n= 5 por grupo. ANOVA de uma via, seguida por SNK. F=1,908. Não houve diferença estatística entre os grupos (p=0,1304).	64
Figura 33: Peso dos animais C57BL/6J recebendo dieta padrão e HFD. Dados expressos em média + epm, n=10 por grupo. ANOVA de medidas repetidas. * representa valores significativos nos grupos HFD em relação à dieta padrão em cada mês, # representa valores significativos em relação à cada dieta no mês anterior (P<0,0001).	65
Figura 34: Consumo de ração dos animais C57BL/6J durante o período de administração de dieta padrão e HFD. Dados expressos em a) gramas por semana (gramas/animal/semana) e b) kJoules por semana (kJ/animal/semana) nos grupos experimentais Teste t pareado (p<0,0005).	66
Figura 35: Teste oral de tolerância à glicose (C57BL/6J). a) Tempo zero p=0,2516. b) HFD 4 semanas p=0,0014 c) HFD 8 semanas p=0,0007 d) HFD 12 semanas p=0,0243 e) HFD 16 semanas p<0,0001. Parte superior, área sob a curva. Média + epm, n= 10 por grupo. Teste T.	68

Figura 36: Peso da gordura abdominal total de camundongos C57BL/6J. Resultados expressos em média + epm, n= 10 por grupo. Teste T * representa valores significativos no grupo HFD em relação à dieta padrão ($p < 0,0001$). ... 69

Figura 37: Triglicérides plasmáticos de camundongos C57BL/6J. Resultados expressos em média + epm, n= 10 por grupo. Teste T. $p = 0,2403$ 70

Figura 38: Colesterol total plasmático de camundongos C57BL/6J. Resultados expressos em média + epm, n= 8 por grupo. Teste T. * representa valores significativos no grupo HFD em relação à dieta padrão ($p < 0,0001$). 70

Lista de abreviaturas

Akt - proteína cinase B
ANOVA - análise de variância
AUC - área sob a curva
BHT - butil hidroxil tolueno
CREAL - Centro de Reprodução e Experimentação em Animais de Laboratório
DM - *diabetes mellitus*
DTNB - ácido 5,5'- ditiobis-[2-nitrobenzóico]
eHSP72 - HSP72 extracelular
epm - erro padrão da média
GDH - glutamato desidrogenase
GFAT - frutose-6-amidotransferase
GLP-1 - peptídeo 1 similar ao glucagon
GLP-1 - peptídeo 1 semelhante ao glucagon
GSK3 - glicogênio sintase cinase 3
HDL-C - lipoproteína de alta densidade
HFD - *high fat diet*
HSE - elementos regulatórios de choque térmico
HSF - fatores de choque térmico
HSP – proteínas de choque térmico
I κ B - inibidores de NF κ B
IAUC - área incremental sob a curva
IFN γ - interferon γ
IKK - I κ B cinase
IL - interleucina
IMC - índice de massa corporal
IP-GTT - tolerância intraperitoneal à glicose
IRS - substratos do receptor de insulina
ITT - tolerância à insulina
JNK - cinase amino terminal c-Jun
LDL-C - lipoproteína de baixa densidade
LPL - lipoproteína lipase
LPO - lipoperoxidação

LPS - lipopolissacarídeos
MDA - malondialdeído
MyD88 - proteína de resposta à diferenciação mielóide 88
NAD⁺ - nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada
NADH - nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NF-κB - fator nuclear κB
OGT - polipeptídeo-*O*-β-acetilglucosaminiltransferase
O-GTT - teste oral de tolerância à glicose
PEPT1 - cotransportador H⁺/peptídeo Slc15a1
PI3-K - fosfatidilinositol 3-cinase
PKC - proteína cinase C
PKCε - proteína cinase C do tipo ε
PMSF - Fluoreto de Fenil-Metil Sulfonila
SDS - dodecil sulfato de sódio
SGLT1 - cotransportador de sódio e glicose
SIRT1 - sirtuína 1
SM - síndrome metabólica
SNK - Student Newman Keuls
SREBP - proteína ligadora do elemento de resposta a esteróides
TBA-RS - substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA - ácido tricloroacético
TIR - domínios de sinalização de receptores Toll/interleucina 1
TIRAP - domínio TIR contendo a proteína adaptadora similar a MyD88
TLCK - cloridrato de N-Tosil-L-Lisina Clorometil Cetona
TLRs - *Toll-like receptors*
TNF-α - fator de necrose tumoral alfa
TRIF - indutor de adaptador de interferon-β
UDP-GlcNAc - uridina difosfato-N-acetilglicosamina
WHO - Organização Mundial da Saúde

Resumo

Os lipídeos da dieta desempenham um importante papel na obesidade, e a ingestão excessiva está relacionada com problemas de saúde. A presença crônica de ácidos graxos saturados na dieta pode induzir um estado de inflamação sistêmica de baixo grau, característica da obesidade, do diabetes e das doenças cardiovasculares. A HSP70 é um regulador chave da inflamação (atuando como uma molécula anti-inflamatória) e da sensibilidade à insulina. Interessantemente, alguns nutrientes, tais como a glutamina e a alanil-glutamina, podem potencializar a expressão de HSP70. Assim, a suplementação de aminoácidos poderia ser uma estratégia útil para aumentar a expressão de HSP70, diminuir a inflamação e melhorar a sensibilidade à insulina. Este trabalho teve como objetivos investigar os efeitos de longo prazo da suplementação com glutamina e alanil-glutamina em camundongos B6129SF2-J alimentados com uma dieta rica em lipídeos (HFD), sobre a sensibilidade à insulina, estresse oxidativo, metabolismo e expressão de HSP70, bem como comparar a resposta metabólica de camundongos das linhagens B6129SF2-J e C57BL/6J recebendo HFD. Camundongos B6129SF2-J foram alimentados com uma dieta padrão com baixo teor de gordura (PAD) ou HFD durante 20 semanas. Na 21ª semana, camundongos do grupo HFD foram alocados em cinco grupos e receberam suplementação por 8 semanas adicionais: grupo HFD controle (HFD-Con), grupo HFD + dipeptídeo alanil-glutamina (HFD-Dip), grupo HFD + alanina (HFD-Ala), grupo HFD + glutamina (HFD-Gln) e grupo HFD alanina + glutamina (nas suas formas livres) (HFD-Ala + Gln). Em adição, camundongos C57BL/6J foram alimentados com PAD ou HFD durante 16 semanas. A administração de HFD induziu um aumento de peso corporal, gordura corporal total, glicose em jejum e colesterol total em comparação com o grupo PAD. A suplementação de aminoácidos não induziu quaisquer alterações nestes parâmetros. Dados de teste de tolerância à insulina (ITT), indicam resistência à insulina em todos os grupos HFD, no entanto, a suplementação de aminoácidos não melhorou a sensibilidade à insulina. Não houve diferença significativa na expressão das proteínas IR, Akt e TLR4. Notavelmente, a expressão de HSP70 total (HSP72 + Hsp73) no fígado foi acentuadamente maior no grupo HFD-Con em comparação com o grupo PAD. Em conclusão, a suplementação com glutamina e dipeptídeo alanil-glutamina não reverteu as alterações metabólicas induzidas por administração prévia de HFD. Aparentemente, ao contrário dos camundongos C57BL/6J, que são geneticamente predispostos para se tornarem obesos e desenvolverem hiperglicemia frente a HFD, camundongos B6129SF2-J são mais resistentes aos efeitos nocivos de HFD, por meio de um mecanismo que pode incluir a adaptação intestinal, por reduzida absorção de nutrientes, incluindo aminoácidos, o que pode explicar parcialmente nossos resultados.

Abstract

Dietary fat plays a major role in obesity and great intake is linked with the development of health problems, and the chronic presence of saturated fatty acids on the diet can induce a state of low-grade inflammation which is a hallmark in obesity, diabetes and cardiovascular diseases. Heat shock protein 70 is a key regulator of inflammation (by acting as an anti-inflammatory molecule) and insulin sensitivity. Interestingly, some nutrients, such as glutamine and alanyl-glutamine were shown to potentiate the expression of HSP70. Thus, amino acid supplementation may be a useful tool to enhance HSP70 expression, decrease inflammation and improve insulin sensitivity. In this work we aimed to investigate the effects of long term glutamine and alanyl-glutamine supplementation on High-Fat Diet-Fed B6129SF2-J mice over the insulin sensitivity response and signaling, oxidative stress markers, metabolism and HSP70 expression, and to compare B6129SF2-J and C57BL/6J in terms of high-fat diet (HFD) metabolic response. B6129SF2-J mice were fed in a standard low-fat diet (STA) or a HFD for 20 weeks. On the 21th week, mice from the HFD group were allocated in five groups and supplemented for additional 8 weeks with different amino acids: HFD control group (**HFD-Con**), HFD + dipeptide L-alanyl-L-glutamine group (**HFD-Dip**), HFD + alanine group (**HFD-Ala**), HFD + glutamine group (**HFD-Gln**) and the HFD alanine + glutamine (in their free forms) group (**HFD-Ala+Gln**). In addition, C57BL/6J mice were fed in a standard low-fat diet (STA) or a HFD for 16 weeks. HFD induced higher body weight, fat pad, fasted glucose and total cholesterol in comparison with the STA group. Amino acid supplementation did not induce any modifications in these parameters. ITT data indicates insulin resistance in all HFD groups, however, amino acid supplementation did not improve insulin sensitivity. There was no significant difference in protein content of IR, Akt and TLR4 expression. Notably, total HSP70 (HSP72+HSP73) protein contents in liver is markedly increased in HFD-Con group compared with STA group. In conclusion, glutamine and dipeptide alanyl-glutamine supplementation fails to improve metabolic changes induced by prior long term High-Fat Diet. Apparently, unlike the C57BL/6J mice, that are genetically predisposed to become overweight and develop hyperglycemia if raised on a HFD, B6129SF2-J mice are more resistant to the harmful effects of HFD through a mechanism that may include gut adaptation, reducing nutrients absorption, including amino acids, which may explain the lack of improvements in our intervention.

1. Introdução

A prevalência de obesidade vem aumentando rapidamente no mundo, e atualmente há mais que o dobro da quantidade de indivíduos afetados por esta doença em relação a 1980. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO), em 2014 existiam mais de 1,9 bilhões de adultos com sobrepeso (39% da população mundial), e mais de 600 milhões de obesos (13% da população mundial) (WHO, 2015). No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, em um levantamento realizado com 54 mil brasileiros no ano de 2013, foi mostrado que 50,8% da população estavam acima do peso, apresentando índice de massa corporal (IMC) acima de 25 kg/m^2 , e 17,5% eram obesas, apresentando IMC acima de 30 kg/m^2 . Em 2006, esta proporção era de 42,6% para excesso de peso e 11,8% para obesidade, demonstrando que trata-se de uma epidemia em constante crescimento (BRASIL, 2013).

A obesidade está relacionada a vários problemas crônicos de saúde, dentre eles destaca-se a síndrome metabólica (SM), que é caracterizada por uma constelação de disfunções como a resistência à insulina, hiperglicemia, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, hipertensão arterial sistêmica, *diabetes mellitus* (DM) e circunferência abdominal elevada (Cho, 2011).

As comorbidades observadas nesta doença podem ser consequência de um processo inflamatório crônico de baixo grau, mediado pela infiltração de células imunes no tecido adiposo, bem como pelos próprios adipócitos (Jin e Flavell, 2013). Em roedores e humanos magros, macrófagos constituem cerca de 5% das células do tecido adiposo, no entanto o aumento da adiposidade confere um acúmulo destas, sendo que em obesos a infiltração pode chegar a 50% do total (Ferrante, 2013).

O ganho de peso observado nos indivíduos com sobrepeso e obesos é relacionado a fatores ambientais, genéticos e metabólicos. Dentre os fatores ambientais ligados ao aumento desta doença, encontra-se o consumo crônico de uma dieta rica em lipídeos e carboidratos (Cheung e Mao, 2012). Indivíduos com dieta rica nestes macronutrientes e pobre em micronutrientes, como zinco, magnésio, cromo, cobre, manganês, dentre outros (Kaur e Henry, 2014), podem apresentar obesidade e resistência à insulina, o que é relacionado,

dentre outros fatores, ao acúmulo de tecido adiposo visceral (Kassi *et al.*, 2011).

1.1 Dieta Hiperlipídica

Dentre as dietas ricas em macronutrientes, encontram-se as dietas hiperlipídicas, ou, do inglês, *high fat diet* (HFD), que fornecem acima de 30% das calorias totais do consumo na forma de lipídeos, principalmente triacilgliceróis, também denominados triglicerídeos, proporcionando um aumento na oferta energética deste macronutriente (Schwingshackl e Hoffmann, 2014). Além do armazenamento no tecido adiposo, tal dieta pode acarretar em um excesso de ácidos graxos circulantes, o que promove uma deposição ectópica em tecidos não adiposos, como o fígado (Trauner, Arrese e Wagner, 2010), coração (Wende, Symons e Abel, 2012), endotélio (Li *et al.*, 2011), sistema nervoso (Martínez de Morentin *et al.*, 2010), pâncreas e músculo esquelético, dentre outros, além de prejudicar a função destes órgãos por meio de diferentes mecanismos (van Herpen e Schrauwen-Hinderling, 2008).

A deposição ectópica leva a um processo de lipotoxicidade, que consiste em um acúmulo inapropriado e excessivo de lipídeos em órgãos periféricos, comprometendo sua capacidade funcional. Este processo leva a prejuízos em processos de sinalização celular, acúmulo de metabólitos lipotóxicos como as ceramidas e diacilglicerol, bem como disfunção mitocondrial (Symons e Abel, 2013; Saponaro, Gaggini e Gastaldelli, 2015). Metabólitos como o diacilglicerol, quando em excesso, ativam a proteína cinase C do tipo ϵ (PKC ϵ), o que resulta em redução da sinalização da insulina. A lipotoxicidade também ocasiona estresse do retículo endoplasmático e aumento da produção de espécies reativas ao oxigênio, com consequente aumento do processo inflamatório (Sahini e Borlak, 2014).

As HFDs podem apresentar diferenças qualitativas e quantitativas em sua composição, sendo que a quantidade e a qualidade da gordura ingerida estão relacionadas com diferentes respostas em relação ao metabolismo lipídico, hepático e na secreção de citocinas e hormônios (Oller do Nascimento, Ribeiro e Oyama, 2009). O conteúdo relativo de ácidos graxos saturados,

monoinsaturados e poliinsaturados, incluindo os ácidos graxos essenciais, é o aspecto mais relacionado a respostas fisiopatológicas, e existem evidências de que dietas com altos teores de ácidos graxos saturados promovem alterações que aumentam o risco de doenças cardiovasculares e DM do tipo II (Schwab *et al.*, 2014). Dentre as alterações observadas, encontra-se o aumento de lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) (Schwab e Uusitupa, 2015).

Além da quantidade e da qualidade dos lipídeos, outros fatores podem desencadear modificações nas respostas metabólicas, uma vez que outros nutrientes presentes na dieta podem modular as respostas encontradas. Um bom exemplo disso é a variedade das proteínas presentes na dieta. A proteína de soja, por exemplo, pode alterar o ganho de peso e deposição de gordura em roedores de maneira diferenciada a outras proteínas (Lai, Chandrasekera e Barnard, 2014). Da mesma forma, a presença de frutose também gera resultados diversos aos encontrados em uma dieta contendo apenas alto teor de lipídeos. Em ratos que receberam HFD durante 9 semanas, não foram observadas diferenças na glicemia em jejum em relação a animais que receberam dieta padrão, porém, com a adição de frutose à HFD, os animais desenvolveram hiperglicemia (Peredo *et al.*, 2015).

Em relação às respostas metabólicas encontradas, observa-se que uma ingesta elevada de gordura total é associada a um aumento de insulina plasmática e redução da sensibilidade a este hormônio em humanos, principalmente com o aumento da ingesta de ácidos graxos saturados (Rahati *et al.*, 2014). Por outro lado, uma revisão sistemática e metanálise observou que pacientes diabéticos ou resistentes à insulina seguindo dietas hiperlipídicas por mais de 12 meses, podem apresentar efeitos favoráveis de redução de triacilgliceróis, e aumento de lipoproteína de alta densidade (HDL-C), o que pode estar relacionado com a redução da ingesta de carboidratos e pelo aumento da ingesta de lipídeos poliinsaturados (Schwingshackl e Hoffmann, 2014), o que é corroborado por dados que demonstram que em modelo animal de camundongos alimentados com HFD rica em óleo de peixe ocorre prevenção de ganho de peso e melhora na sinalização da insulina (Bargut, Mandarin-de-Lacerda e Aguila, 2015).

1.1.1 Obesidade, Tecido Adiposo e Senescência Celular

A função primordial do tecido adiposo branco é o armazenamento de triglicerídeos sob condições de excesso de calorias, e liberação dos mesmos durante períodos de necessidade do organismo, como por exemplo situações de jejum. Porém, este tecido também é um órgão endócrino, já que os adipócitos são capazes de liberar uma gama de moléculas bioativas, denominadas adipocinas. Estas contribuem para a regulação do apetite e da saciedade, secreção e sensibilidade à insulina, gasto energético e inflamação, dentre outros processos de manutenção da homeostasia. Alterações na secreção de adipocinas podem contribuir para o desenvolvimento de doenças relacionadas à obesidade, e é importante salientar que alterações na quantidade de tecido adiposo acumulado podem determinar o perfil de secreção de adipocinas, situação em que a expansão do tecido adiposo facilita a formação de um perfil secretório pró-inflamatório (Fasshauer e Blüher, 2015).

É importante observar que a massa de tecido adiposo não é a única influência na proporção de adipocinas secretadas. Outros fatores alteram esta proporção, como a limitação da capacidade funcional do tecido adiposo para o acúmulo de lipídeos, particularmente em indivíduos cronicamente obesos, em que os depósitos subcutâneos estão com expansão limitada, e os depósitos viscerais tem aumento de depósitos (Moreno-Indias e Tinahones, 2015).

Outro aspecto importante é a disfunção do tecido adiposo, resultado de hipóxia tecidual causada por angiogênese insuficiente durante o progressivo desenvolvimento da obesidade, e de aumento excessivo do diâmetro dos adipócitos de modo a exceder a distância de difusão normal do oxigênio através dos tecidos. (Goossens e Blaak, 2015).

A alteração da secreção de adipocinas, juntamente com outras alterações metabólicas observadas na obesidade, pode resultar em resistência à insulina e doenças metabólicas crônicas, bem como doenças cardiovasculares. Dentre as principais citocinas alteradas encontram-se a leptina e a adiponectina, que apresentam efeitos opostos na inflamação subclínica e resistência à insulina (López-Jaramillo *et al.*, 2014).

A leptina, ao ligar-se ao seu receptor hipotalâmico, ativa o metabolismo e reduz o apetite. Os níveis circulantes de leptina são maiores em indivíduos

obesos do que em indivíduos magros, devido ao aumento da massa de tecido adiposo, e estão relacionados com aumento de pressão arterial e possivelmente com o desenvolvimento de aterosclerose. Já a adiponectina é negativamente correlacionada com alterações cardiovasculares e metabólicas, e seus níveis plasmáticos são inversamente proporcionais à adiposidade. A adiponectina apresenta múltiplos papéis no sistema cardiovascular, incluindo proteção contra estresse oxidativo, aterosclerose e outros processos inflamatórios (Ghantous *et al.*, 2015).

Outra consequência da obesidade e da ingestão de dieta hiperlipídica para os adipócitos, é o envolvimento de adaptações celulares similares ao envelhecimento celular, o que desencadeia processos de senescência prematura. Uma vez que a senescência bloqueia a replicação de pré-adipócitos, este mecanismo poderia constituir uma defesa contra o excesso de deposição lipídica, porém, na obesidade, um estado similar à senescência pode ser observado também em adipócitos diferenciados, bem como em macrófagos teciduais (Tchkonia *et al.*, 2010).

A senescência do tecido adiposo pode estar relacionada a mudanças substanciais em sua função metabólica, com declínio na resposta à insulina, à mobilização de lipídeos e ativação de um estado pró-inflamatório. Tais processos podem estar interligados com a redução na expressão e atividade de sirtuína 1 (SIRT1) (Newsholme e de Bittencourt, 2014). A SIRT1 é uma enzima pertencente à família de histonas deacetilases da classe III, que consome uma molécula de NAD^+ em cada ciclo de deacetilação, e influencia a expressão gênica por meio de mecanismos epigenéticos. Como esta enzima é dependente de NAD^+ , ela funciona como um sensor energético nas células. Assim, reduções nas concentrações de NAD^+ , observadas no envelhecimento e obesidade, também levam a prejuízos na ação da SIRT1 (Chang e Guarente, 2014).

1.1.2 Ácidos Graxos e Resposta Inflamatória

O excesso de nutrientes ingerido, como os lipídeos, especialmente os ácidos graxos saturados, podem ativar mecanismos de inflamação nas diversas células do organismo por meio da ligação aos receptores de

reconhecimento inatos, como os *Toll-like receptors* (TLRs), particularmente dos tipos 2 e 4. Ambos são ativados por ácidos graxos, e podem ter efeitos de aumento da sinalização inflamatória em um processo denominado inflamação metabólica (Jin e Flavell, 2013). Além disso, os ácidos graxos podem mediar estímulos inflamatórios por uma via independente de TLRs, por meio de ativação do estresse oxidativo celular (Teng *et al.*, 2014).

Os TLRs são receptores de reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos, incluindo lipopolissacarídeos (LPS), peptídeoglicanos e outras moléculas essenciais para a sobrevivência de micro-organismos. Entretanto, também reconhecem sinais endógenos, como os próprios ácidos graxos. O TLR4 é altamente expresso nas células, incluindo o tecido adiposo. No desenvolvimento da obesidade ocorre infiltração de maior número de células imunes neste tecido, particularmente macrófagos, e estes apresentam aumento de expressão de TLR4 (Watanabe, Nagai e Takatsu, 2013).

Estes receptores são caracterizados por possuírem domínios de sinalização Toll/interleucina 1 (TIR), com repetições extracelulares ricas em leucina (Martin e Wesche, 2002). O TLR4 é complexado a um co-receptor MD2, local onde ocorre a ligação a ácidos graxos (Botos, Segal e Davies, 2011). Quando ocorre a ligação com seus ligantes específicos, os TLRs recrutam proteínas adaptadoras, como a proteína de resposta à diferenciação mielóide 88 (MyD88), que envolve o domínio TIR contendo a proteína adaptadora similar a MyD88 (TIRAP) ou as proteínas adaptadoras independentes de MyD88, como a domínio TIR contendo indutor de adaptador de interferon- β (TRIF) (Takeda e Akira, 2004). A dimerização com o TLR6 é necessária para a ativação funcional dos TLR2, e concentrações elevadas de glicose, como por exemplo as encontradas em indivíduos diabéticos, podem induzir heterodimerização com o TLR6 (Dasu, Ramirez e Isseroff, 2012).

Após a ligação dos ligantes, como os ácidos graxos, a estes receptores, principalmente com o TLR4, ocorre a ativação do fator de transcrição denominado fator nuclear κ B (NF- κ B) (Wajchenberg *et al.*, 2009). Este fator faz parte de uma família de fatores de transcrição nucleares encontrados em todos os tipos celulares, e sua atividade é controlada por proteínas regulatórias, denominadas inibidores de NF- κ B (I κ B), cuja fosforilação em serina por I κ B

cinase (IKK) ativa o NF- κ B. A superativação do NF- κ B é relacionada com o desenvolvimento de DM (Patel e Santani, 2009), e em células β parece promover a morte celular, como demonstrado em modelo de camundongos transgênicos com ativação prolongada desta proteína por IKK. Após o período de 24 semanas, os animais desenvolvem diabetes, com severa hiperglicemia e hipoinsulinemia, além de um microambiente pró-inflamatório com recrutamento de células imunes (Salem *et al.*, 2014).

O NF- κ B apresenta uma variedade de papéis no sistema imune e na resposta inflamatória, e pode ser ativado pela via de sinalização do TLR, do receptor de IL-1 β e do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Sua ativação induz a rápida transcrição de genes que regulam a inflamação, sobrevivência celular, proliferação e diferenciação. É importante salientar que apenas a ativação sustentada por aproximadamente 100 minutos é capaz de induzir genes alvo pró-inflamatórios (Hayden e Ghosh, 2014).

Dentre os genes cuja transcrição é estimulada pelo NF- κ B, encontram-se citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1 β . Assim, a ativação de NF- κ B leva à promoção de um aumento da secreção destas citocinas, que induzem um processo inflamatório sistêmico de baixo grau (Wajchenberg *et al.*, 2009; Cho *et al.*, 2012). A ativação do NF- κ B ativa a cinase amino terminal c-Jun (JNK), enzima também relacionada ao processo inflamatório (Zhu e Mohan, 2010).

A ativação de JNK leva a um aumento de citocinas inflamatórias como TNF- α e IL-1 β , que por sua vez promovem a ativação de NF- κ B em ilhotas pancreáticas, levando à sua disfunção. Desta forma, é induzido um ciclo vicioso de disfunção das células β induzida por inflamação, que por sua vez perpetua o processo inflamatório. Assim, diminuir o processo inflamatório em diabetes pode reduzir as complicações da doença (Agrawal e Kant, 2014).

Além do TLR4, também pode ocorrer a ligação dos ácidos graxos saturados com o TLR2, aumentando a expressão de citocinas como TNF- α , IL-6 e IL-1 β , além de estimular a fosforilação e consequente ativação de JNK e do NF- κ B (Jang *et al.*, 2013).

O processo de inflamação do tecido adiposo desencadeado por altas concentrações plasmáticas de ácidos graxos, promove a secreção ativa de

citocinas pró-inflamatórias, responsáveis por desempenhar um papel importante na sensibilidade à insulina (figura 1).

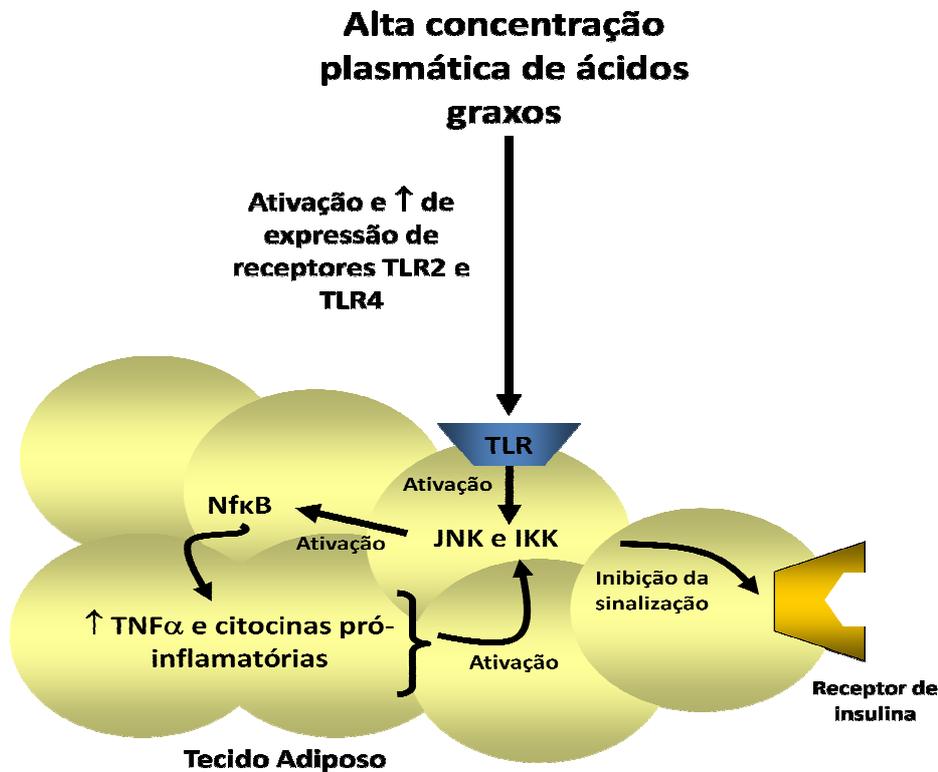


Figura 1: Inflamação do Tecido Adiposo Relacionada com o Aumento de Ácidos Graxos Plasmáticos. Fonte: O autor.

1.1.3 Inflamação e Resistência à Insulina

A insulina produzida pelas células β pancreáticas é um hormônio com amplos efeitos no organismo, desencadeados por uma cascata de sinalização ativada pela ligação ao seu receptor, o que promove auto-fosforilação do mesmo em resíduos de tirosina e posterior fosforilação de substratos do receptor de insulina (IRSs), também em tirosina. Quando fosforilados, os IRSs ativam uma cascata de sinalização que envolve a proteína cinase B (Akt) e fosfatidilinositol 3-cinase (PI3-K), o que desencadeia os efeitos fisiológicos da insulina. Entretanto, moléculas pró-inflamatórias ativam serina ou treonina cinases, como JNK e proteína cinase C (PKC), que atenuam a sinalização da insulina por fosforilação de proteínas em resíduos de serina ou treonina (Hameed *et al.*, 2015).

Os tecidos dos pacientes insulino-resistentes são constantemente expostos a altas concentrações de ácidos graxos saturados, que são conhecidos por interferir com a sinalização da insulina em PI3-K via mecanismos que envolvem maior estresse oxidativo, ativação da via NFκβ e da PKC, resultando em resistência à insulina particularmente no fígado e músculo esquelético (Li *et al.*, 2011).

A resistência à insulina em músculos esqueléticos, induzida por uma dieta com alto teor de lipídios, está relacionada com a ativação de JNK e IKK, o que ativa NF-κB e acarreta maior produção de citocinas inflamatórias, em um processo de retroalimentação positiva (Gupte *et al.*, 2009). Outros mecanismos de redução da sinalização da insulina podem incluir disfunção mitocondrial, redução da expressão e atividade do receptor de insulina, redução da fosforilação de substratos do receptor de insulina (IRS) em tirosina e ativação de outras cinases além de JNK, que fosforilam os IRSs em resíduos de serina, inibindo sua atividade (Martins *et al.*, 2012).

Os mecanismos envolvidos na redução da sinalização da insulina por ácidos graxos intracelulares e citocinas pró-inflamatórias estão representados na figura 2.

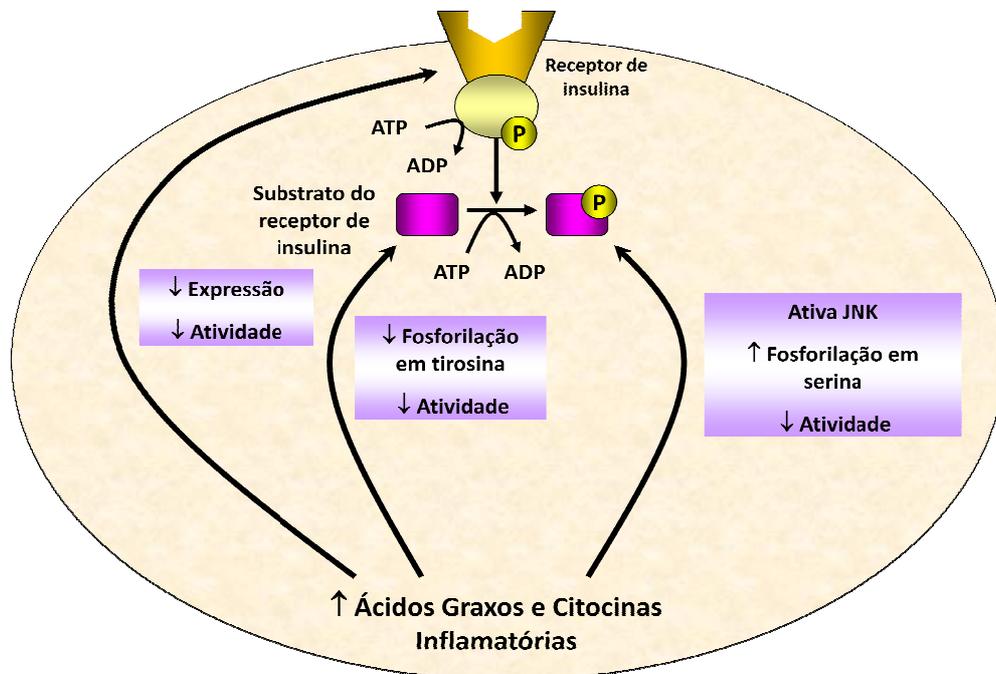


Figura 2: Mecanismos de redução da sinalização da insulina por ácidos graxos intracelulares e citocinas pró-inflamatórias. Fonte: O autor.

Adicionalmente, podem ser observadas diferenças entre gêneros, já que uma dieta hiperlipídica em fêmeas de ratos Wistar prejudica a sinalização hepática de insulina de maneira mais pronunciada do que nos machos, por meio da redução da expressão de receptor de insulina e Akt, além de aumento da fosforilação em serina dos mesmos (Nadal-Casellas *et al.*, 2012).

Assim, quando são mantidas altas concentrações teciduais de ácidos graxos, estes têm ação direta sobre a sinalização muscular e hepática da insulina, reduzindo as respostas normais a este hormônio, isto é, diminuem a incorporação de glicose pelo músculo esquelético e aumentam a gliconeogênese e o fornecimento de glicose do fígado para a circulação (Cusi, 2009).

Corroborando estes resultados, em um modelo animal TLR4 deficiente, se observa uma diminuição da ativação de cascatas inflamatórias e da resistência a insulina no músculo esquelético e tecido adiposo, o que demonstra a participação deste receptor como mediador na resposta inflamatória (Tsukumo *et al.*, 2007). Além disto, indivíduos homocigotos com variações genéticas em TLR4 apresentam uma diminuição nos níveis séricos de insulina e menor resistência à insulina, podendo este ser considerado um polimorfismo protetor para a síndrome metabólica (Cuda *et al.*, 2011).

Também é observado que em monócitos isolados de pacientes com DM do tipo II recentemente diagnosticados, a expressão de proteína de membrana e mRNA de TLR2 e TLR4 é elevada comparada aos indivíduos controles, além de ocorrer maior formação do heterodímero TLR2/TLR6. A fosforilação de MyD88, TRIF, e outras proteínas relacionadas com a cascata de sinalização de TLRs mostra-se aumentada, sugerindo ativação da mesma. Consequentemente, ocorre aumento da ativação de NF κ B, com aumento de mediadores pró-inflamatórios (Dasu *et al.*, 2010).

Analisando-se o papel dos TLRs em células β -pancreáticas de camundongos com bloqueio de TRIF, é observado um aumento significativo da glicemia, com aumento da massa de células β , mas com menor secreção de insulina. Este fato mostra que a deficiência de TRIF induz uma redução da tolerância à glicose e disfunção de células β , sugerindo um papel da sinalização via TLR na manutenção da função de células β e da glicemia (Hutton *et al.*, 2010).

O estímulo via TLR também possui um efeito sobre a via da Akt. Foi observado que a ativação de TLR4 ativa esta via, e a inibição desta resposta leva a um perfil pró-inflamatório. Em macrófagos, o estímulo com LPS aumenta a fosforilação de Akt a 30 e 60 minutos (Luo *et al.*, 2014), e em células de músculo liso vascular, a estimulação com LPS induz ativação de Akt depois de 15, 30 e 60 minutos. Porém, após 120 minutos, a fosforilação de Akt é diminuída aos valores similares a 15 minutos (Jiang *et al.*, 2014). Existem relações entre a ativação de TLRs, de JNK e Akt. A ativação de TLR4 inibe a proliferação de enterócitos por reduzir a fosforilação e expressão de Akt (Sodhi *et al.*, 2010).

Tais resultados sugerem a existência de um efeito bifásico de estimulação pelos TLRs, em que uma ativação aguda poderia estar relacionada com efeitos protetores, enquanto uma ativação crônica poderia levar a prejuízos celulares, já que a ativação de JNK por meio de vias de sinalização dependentes de TLR4 está envolvida em morte da célula β e de células da linhagem de insulino de rato INS1 tratadas com palmitato, depois de 12 a 16 h do estímulo dos TLRs (Lee *et al.*, 2011).

Em síntese, a elevação na circulação de ácidos graxos livres é uma característica metabólica do estado insulino-resistente e das dietas hiperlipídicas, o que pode promover resistência à insulina por meio de vários mecanismos, destacando dentre estes a ativação dos TLRs e a resposta inflamatória crônica.

1.2 Proteínas de Choque Térmico (HSPs)

As proteínas de choque térmico (HSP) são uma grande família de proteínas conservadas entre as espécies, e usualmente divididas em duas classes, de acordo com seu peso molecular: as pequenas HSPs, com peso molecular menor que 40 kDa, e as HSPs com alto peso molecular, entre 60 e 100 kDa. Estas proteínas são expressas em uma grande variedade de células, como músculo (Venojärvi *et al.*, 2007) e células β pancreáticas (Krause *et al.*, 2014). Apresentam baixa expressão sob condições basais (HSPs constitutivas) e são aumentadas em resposta a fatores estressores (HSPs induzíveis) (Velichko *et al.*, 2013), como calor (Ruell *et al.*, 2004) ou exercício (Heck,

Schöler e de Bittencourt, 2011). A transcrição destas pode ser potencializada por nutrientes, dentre eles a glutamina (Jang *et al.*, 2008).

HSPs, particularmente as HSP70 e HSP90, são conhecidas como chaperonas moleculares, e contribuem para a promoção do correto enovelamento de proteínas recentemente sintetizadas, bem como o reenovelamento de proteínas que foram desenoveladas (Niforou, Cheimonidou e Trougakos, 2014), protegendo as mesmas da desnaturação e inibindo cascatas de sinalização relacionadas com dano celular (Tytell e Hooper, 2001).

Além destas funções clássicas, as HSPs podem atuar ligando-se a proteínas mal enoveladas, o que impede a formação de agregados (função “holdase”). Também podem agir sobre agregados protéicos já estabilizados, promovendo sua conversão às proteínas nativas, além de manterem proteínas no estado desenovelado, desta forma, permitem processos de translocação de proteínas entre organelas celulares. Adicionalmente, preparam substratos para a ação de chaperonas subsequentes, como a HSP90 (Mattoo e Goloubinoff, 2014; Clerico *et al.*, 2015).

As chaperonas moleculares, como a HSP70, exercem seu mecanismo de ação por meio da ligação das sequências hidrofóbicas de um polipeptídeo ao seu domínio de ligação ao substrato, cuja afinidade é modulada alostericamente pela ligação de um nucleotídeo ao seu domínio N-terminal. Quando ocorre a ligação de ATP a afinidade é reduzida, e quando o ADP é ligado, a afinidade ao substrato é aumentada. Assim, para que a HSP70 exerça sua função, ocorre consumo de ATP, e quanto mais fortemente ligados estiverem os peptídeos, mais alta será a taxa de hidrólise de ATP. (Clerico *et al.*, 2015).

A expressão de HSP está principalmente sob o controle de fatores de transcrição chamados fatores de choque térmico (HSF), de 1 a 4, que se ligam aos elementos regulatórios de choque térmico (HSE), localizados nas regiões promotoras de alguns genes. Em eucariotos superiores, a ativação do HSF1 ocorre por meio de sua trimerização sob condições de estresse, nas quais HSP70 e HSP90, que são ligadas ao HSF em condições normais, liberam o HSF, conseqüentemente estimulando sua própria expressão. Modificações pós-traducionais nos HSFs, como fosforilação, também regulam sua ligação ao HSE (Velichko *et al.*, 2013). O HSF1 é inibido pela fosforilação induzida por

glicogênio sintase cinase 3 (GSK3) (Hooper, 2007). Esta enzima é constitutivamente ativa, mas pode ser inativada pela fosforilação por Akt na posição serina 21 α /9 β , e ativada por fosforilação da posição Tyr 279 α /216 β (Rayasam *et al.*, 2009).

As HSPs produzidas na célula podem exercer sua função no meio intracelular, ou podem ser liberadas pelas células por um processo secretório ativo, ou passivo, secundário à morte celular e lise. Quando liberadas, podem ligar-se a receptores de superfície, iniciando processos de sinalização extracelular (De Maio, 2011). Diferentemente do papel protetor desempenhado pelas HSPs intracelulares, a presença de HSPs no meio extracelular pode ativar diferentes respostas, de forma aguda ou crônica, que variam em relação a aspectos da função celular, particularmente em relação à resposta imune (Sloane *et al.*, 2010).

1.2.1 HSPs, Inflamação e *Diabetes Mellitus*

Em diversas situações patológicas podemos observar um aumento de HSPs extracelulares, como por exemplo diabetes e obesidade. Indivíduos obesos com diabetes do tipo 2 mostram valores maiores de HSP72 plasmática quando comparados aos controles obesos e diabéticos do tipo 2 não obesos, enquanto o oposto é observado em músculo esquelético, em que HSP72 e HSF1 foram ambos reduzidos. Assim, a composição corporal parece influenciar o conteúdo de HSP72 intracelular e sua liberação (Rodrigues-Krause *et al.*, 2012).

Além da composição corporal, valores de HSP70 séricos são inversamente correlacionados com a glicemia de jejum (Nakhjavani *et al.*, 2010). A duração da doença também pode alterar os valores plasmáticos de HSP, uma vez que concentrações de HSP70 séricas em pacientes diabéticos do tipo 2 recentemente diagnosticados apresentam valores maiores que indivíduos não diabéticos (Dasu *et al.*, 2010), porém são menores do que naqueles com a doença há mais de 5 anos (Nakhjavani *et al.*, 2010).

De maneira complementar, anticorpos anti HSP70 em diabéticos do tipo 1 com 21,5 anos de doença foram maiores em indivíduos com complicações micro e macrovasculares, em uma associação inversa que poderia significar

uma ação como biomarcador (Gruden *et al.*, 2009). Adicionalmente, um estudo de caso-controle em crianças diabéticas do tipo 1, mostrou que durante crises metabólicas de cetoacidose diabética, a HSP72 extracelular é maior antes do tratamento que nas crianças controle (Oglesbee *et al.*, 2005).

As proteínas de choque térmico podem agir como um sinal inato de perigo, pois HSP 60 e 70 extracelulares ligam-se a receptores TLR 2 e 4, podendo ativar o sistema imunológico inato e a resposta imunológica adaptativa (Sloane *et al.*, 2010). A cascata de sinalização dos TLRs desencadeia a ativação de NF- κ B e JNK (Zhu e Mohan, 2010), podendo estar envolvida com o processo inflamatório relacionado à resistência à insulina, uma vez que existe uma correlação positiva entre HSP72 extracelular (eHSP72) e a resistência à insulina em indivíduos idosos, bem como existe correlação com o estado inflamatório. Adicionalmente, há correlação positiva entre eHSP72 e a razão leptina/adiponectina, indicando que os altos níveis de eHSP72 podem ser relacionados à obesidade. Em linhagens de células β a administração de eHSP72 reduz a secreção de insulina e o consumo de glicose, além de diminuir a viabilidade celular (Krause *et al.*, 2014).

As HSPs intracelulares, por sua vez, podem ter uma função protetora em indivíduos diabéticos, por desempenharem um papel fundamental no controle da inflamação, uma vez que tem a habilidade de promover citoproteção, por meio da redução da ativação de JNK, prevenindo sua fosforilação (Henstridge, Whitham e Febbraio, 2014), bem como redução da ativação do NF- κ B (McCarty, 2006).

Além disso, a elevada expressão de HSP70 em ilhotas, reduz a morte celular induzida por citocinas, promovendo proteção às células β e consequentemente minimizando o bloqueio de secreção de insulina que pode ser observado pelo processo inflamatório de DM do tipo II (Mokhtari *et al.*, 2009).

Em ilhotas de ratos tratadas com choque térmico ou inibidores da síntese de óxido nítrico (NO), a liberação de insulina estimulada por glicose não é afetada na presença de IL-1 β , enquanto em ilhotas sem choque térmico a liberação de insulina é diminuída, sugerindo que a produção de NO é parcialmente reduzida por estresse térmico (Takeda *et al.*, 2001).

Possivelmente, estes dados estão relacionados com o aumento de HSP, uma vez que o choque térmico induz resistência em células de ilhotas pancreáticas contra estreptozotocina, espécies reativas de oxigênio e NO, pela expressão de HSP70 (Bellmann *et al.*, 1995). Na linhagem celular de insulinoma de rato RINm5F, o tratamento com choque térmico e transfecção com o gene de HSP70 humano reduz a lise celular induzida por NO ou radicais de oxigênio, com aumentada produção de HSP70 e HSP25 (Bellmann *et al.*, 1996).

Outro estudo que reforça o papel protetor da HSP70, é o fato de que a linhagem de células β humana CM com aumentada expressão desta proteína, tem resistência aumentada contra necrose induzida por NO e espécies reativas de oxigênio. Quando a expressão de HSP70 é suprimida, a resistência é abolida, sugerindo que HSP70 é um protetor natural contra a lesão por NO (Burkart *et al.*, 2000). Esta ideia é corroborada pelo fato de que ilhotas de ratos mostram menor expressão de iNOS induzida por IL-1, degradação de I κ B e translocação nuclear de NF- κ B após choque térmico (Scarim, Heitmeier e Corbett, 1998).

Além disso, camundongos transgênicos com superprodução de HSP27, tem a razão insulina/proteína 44% maior do que camundongos selvagens, e os transgênicos também mostram proteção contra diabetes induzida por estreptozotocina, com as ilhotas protegidas contra apoptose, mostrando que a superexpressão de HSP27 confere proteção para a célula β . Interessantemente, a HSP27 da ilhota coprecipita com IKK, regulando a ativação de NF- κ B (Dai *et al.*, 2009), que é relacionado a uma via apoptótica e resulta em mudanças da expressão de genes de resposta ao estresse (Lai *et al.*, 2009).

Entretanto, as ilhotas podem representar distintos estágios de maturação, uma vez que ratos com a idade de 6 a 90 dias, respondem ao choque térmico com mais indução de HSP70 do que ratos mais jovens, de 3 dias de idade (Wachlin *et al.*, 2002). Levando em consideração a base para este comportamento diferencial, o mesmo poderia ser comparado com a DM do tipo I, com diagnóstico mais frequente em crianças.

Interessantemente, quando as células β pancreáticas compensam a resistência à insulina produzindo e secretando um excesso de insulina, o

estresse do retículo endoplasmático (ER) pode ser desenvolvido, causando disfunção da célula β . Camundongos transgênicos superproduzindo a proteína de 78kDa regulada por glicose (GRP78) em células β pancreáticas, uma chaperona com numerosos papéis no ER, são protegidos contra a intolerância a glicose causada por dieta hiperlipídica, porque as ilhotas mantêm uma estrutura mais normal e melhor função que em animais controles (Teodoro-Morrison *et al.*, 2013).

HSPs intracelulares podem estar relacionadas não apenas com a proteção de células β , permitindo a manutenção da secreção de insulina, mas também podem prevenir a resistência à insulina. Em ratos alimentados com uma dieta hiperlipídica por 12 semanas, o aumento da expressão de HSPs (72, 25 e 60) pelo aumento da temperatura corporal de até 41,5 °C por vinte minutos uma vez por semana, em músculos esqueléticos, tecido adiposo e fígado de rato promoveu a redução da ativação de JNK e IKK (Gupte *et al.*, 2009).

Outra ação das HSPs intracelulares é a prevenção da reciclagem de receptores de insulina e sua consequente destruição, mantendo o receptor de insulina estável frente a estressores (Zacharyus, Benatmane e Plas, 1996). Além disso, tais proteínas podem aumentar a sensibilidade à insulina, como foi demonstrado em músculo esquelético de humanos não diabéticos, porém com sobrepeso. Observou-se correlação inversa entre HSP72 e percentual de gordura corporal, e direta com sensibilidade à insulina (Henstridge *et al.*, 2010).

HSPs também são capazes de estabilizar e prevenir a inativação de Akt, pela formação de um complexo Akt-HSP (Liao e Hung, 2010), o que em consequência aumenta a eficiência da incorporação de glicose em músculos esqueléticos e tecido adiposo (Kurabe *et al.*, 2010). Os efeitos intracelulares da HSP em células como músculo e tecido adiposo são resumidos na figura 3.

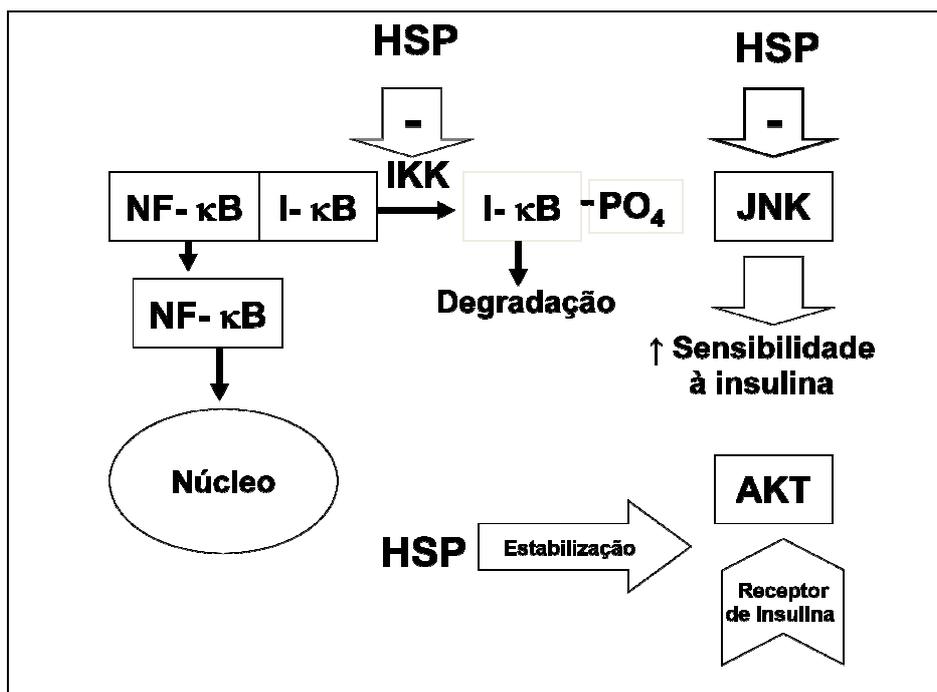


Figura 3: Efeitos das HSP intracelulares em células responsivas à insulina. Fonte: O autor.

O papel das HSPs intracelulares na melhora da resistência à insulina é reforçado por observações de que indivíduos diabéticos apresentam redução destas proteínas, bem como de HSF (Hooper e Hooper, 2005), redução do mRNA das mesmas com reduzida captação de glicose (Kurucz *et al.*, 2002), reduzida expressão de HSP, com melhora da tolerância à glicose por meio do restabelecimento das concentrações de HSP (Kavanagh *et al.*, 2011). Além da redução da expressão de HSP72, observa-se aumento da fosforilação de JNK em humanos com resistência à insulina. Adicionalmente, tratamento de ratos com choque térmico a 41,5 °C por quinze minutos pode induzir a expressão de HSP72 em músculo, fígado e tecido adiposo, melhorando parâmetros relacionados com resistência à insulina por redução da fosforilação de JNK (Chung *et al.*, 2008), bem como ativação de IKK (Hooper, 2009).

Em síntese, aumentos de HSP intracelular podem promover maior proteção às células, permitindo que as mesmas mantenham sua função normal. Na tentativa de minimizar o prejuízo da secreção e sinalização da insulina induzido pela dieta hiperlipídica, o aumento da expressão das HSP70 pode ter papel chave. Por esta razão, a busca por terapias que resultem na indução destas proteínas, ou até mesmo na manutenção de sua síntese

normal, são essenciais. Interessantemente, alguns nutrientes, como o aminoácido glutamina, são capazes de potencializar a expressão das HSP70.

1.3 A Glutamina na Obesidade e no Diabetes

A glutamina é o aminoácido livre mais abundante na circulação, com uma concentração entre 500 e 900 $\mu\text{mol/L}$. Sob determinadas condições patológicas, sua concentração pode ser menor que a demanda metabólica, e este aminoácido passa a ser condicionalmente essencial (Pierre *et al.*, 2013). Ela é ativamente transportada para as células, e suas concentrações hepáticas e musculares variam entre 5 e 20 mmol/L . A concentração intracelular depende não somente do transporte feito contra o gradiente de concentração, mas também é determinada por processos metabólicos, como síntese de novo da glutamina e degradação de proteínas na célula (Soeters e Grecu, 2012).

Este aminoácido pode atuar como combustível metabólico para células em processo de divisão, particularmente linfócitos e enterócitos, e é precursor de glutatona, bem como de arginina, através do transporte inter órgãos de citrulina. Outras funções incluem o transporte de nitrogênio na circulação, e a participação na síntese de purinas e pirimidinas. Por ação da enzima glutaminase a glutamina origina glutamato, que sofre adicional desaminação para produzir α -cetoglutarato, desta forma a glutamina tem função anaplerótica, fornecendo intermediários do ciclo de Krebs (Kim, 2011).

Em pacientes diabéticos pode ser observada redução de glutamina e arginina plasmáticas, o que poderia estar relacionado com a patogenia da doença (Menge *et al.*, 2010; Newsholme *et al.*, 2011). Em contraste, pacientes com resistência à insulina apresentam aumento de glutamina com níveis reduzidos de glutamato, o que não é observado em pacientes diabéticos. Tal aumento de glutamina poderia ser uma resposta compensatória durante o período de resistência à insulina, que seria perdida durante a transição para diabetes (Xu *et al.*, 2013).

Uma vez que a disponibilidade de glutamina está modificada na obesidade e no diabetes, a suplementação deste aminoácido nesta população parece justificável.

Para aumentar a disponibilidade de glutamina, em situações de estresse fisiológico ou patológico, como a obesidade, resistência à insulina e diabetes, podem ser empregados suplementos dietéticos com este aminoácido, tanto na forma livre como na forma de dipeptídeo, o que poderia aumentar de forma não invasiva a glutamina plasmática, permitindo a manutenção da homeostasia.

Em relação à suplementação em pacientes com DM do tipo II, com menos de cinco anos de diagnóstico, foi observado que a administração de 30 gramas de glutamina por dia, juntamente com a refeição, reduz a glicemia pós prandial, aumenta a resposta à insulina e a concentração de peptídeo 1 semelhante ao glucagon (GLP-1) (Samocha-Bonet *et al.*, 2011). A mesma dose de glutamina durante seis semanas não é capaz de alterar parâmetros de perfil lipídico, porém reduz a glicemia, a circunferência da cintura e o percentual de gordura em pacientes com DM do tipo II (Mansour *et al.*, 2015).

Outro parâmetro que pode ser modulado com a suplementação deste aminoácido é a diversidade da microbiota intestinal, que pode estar alterada na obesidade, com aumento da proporção de Firmicutes em relação a Bacteroidetes, quando é feita a comparação com indivíduos magros. A suplementação em indivíduos com índice de massa corporal (IMC) superior a 25, que receberam 30 g/dia de glutamina ou alanina durante 14 dias, não mostrou diferenças entre peso corporal, IMC ou glicose em jejum, porém a glutamina reduziu a quantidade do filo de Firmicutes (Zambom de Souza *et al.*, 2015).

Já em relação a modelos animais, em ratos com diabetes induzida por estreptozotocina (um modelo de diabetes do tipo 1 amplamente utilizado), a suplementação diária de glutamina durante quatro meses, nas doses de 500 e 1000 mg/kg de peso corporal, reduz a glicose plasmática, bem como previne a perda de peso e o dano cardíaco, principalmente quando utilizada a dose mais alta de glutamina (Badole *et al.*, 2014). Ainda, a suplementação diária de glutamina durante quinze dias, na dose de 1000 mg/kg de peso corporal, no mesmo modelo animal, aumenta a fosforilação de Akt, no músculo dos animais diabéticos ao mesmo nível que nos controles, além de aumentar duas vezes o mRNA desta enzima (Lambertucci *et al.*, 2012).

Em ratos com deficiência relativa de produção de insulina, obtida por meio da utilização de nicotinamida para a proteção das células β pancreáticas

contra a toxicidade induzida pela estreptozotocina, a suplementação de glutamina na ração por oito semanas, na proporção de 25% do conteúdo nitrogenado, não altera a glicemia dos animais, porém reduz as concentrações plasmáticas de proteína C reativa. A glutamina não mostrou reduzir outros marcadores inflamatórios, possivelmente porque o modelo de diabetes utilizado não apresenta características inflamatórias (Tsai, Yeh, *et al.*, 2012). O mesmo grupo observou também aumento da capacidade antioxidante obtida pela suplementação com glutamina (Tsai, Liu, *et al.*, 2012).

As alterações em cascatas de sinalização por meio das quais a glutamina poderia regular a glicemia e outros parâmetros metabólicos em situações de dieta hiperlipídica, resistência à insulina e diabetes ainda não são completamente elucidados. A glutamina poderia estimular a secreção de insulina por aumentar a disponibilidade de glutamato nas células β pancreáticas, ou por amplificar diretamente a despolarização da membrana (Jenstad e Chaudhry, 2013).

Outra hipótese existente para explicar as alterações observadas na obesidade induzida por HFD, é que a glutamina poderia induzir resistência à insulina no tecido adiposo, uma vez que este modelo apresenta maior resistência no músculo e fígado. Ratos recebendo HFD suplementados com glutamina na concentração de 4% na água de beber, mais gavagem na mesma concentração três vezes por semana, durante dois meses, apresentaram menor peso corporal que os animais que não receberam glutamina, somente a dieta hiperlipídica. A glutamina não induziu redução da glicemia de repouso, porém reduziu a insulina e marcadores inflamatórios plasmáticos e teciduais, bem como reverteu a resistência à insulina em músculo e fígado, mas não no tecido adiposo, reduzindo a deposição de gordura nos animais e melhorando a sensibilidade geral à insulina (Prada *et al.*, 2007).

1.3.1 Glutamina e HSP

A suplementação de aminoácidos, como a glutamina, poderia acarretar em um aumento de HSP intracelular, o que poderia modular alterações de resistência à insulina. Os mecanismos moleculares pelos quais a glutamina poderia modular alterações de resistência à insulina são múltiplos, incluindo a

potenciação de produção de HSPs no meio intracelular, com consequente redução das citocinas pró-inflamatórias. Interessantemente, a glutamina aumenta a expressão de HSP72 (induzível), mas não de HSP73 (constitutiva), demonstrando que este aminoácido tem efeitos específicos sobre proteínas induzidas por estresse, ao invés de potencializar a síntese protéica global (Curi *et al.*, 2005).

Os mecanismos pelos quais a glutamina pode aumentar HSP70 envolvem a ativação do HSF-1 ou o aumento de sua expressão. O tratamento de ratos com glutamina na concentração de 0,75 g/kg/dia por 7 dias, aumenta a expressão de HSP e HSF em epitélio colônico. Em cultura de células epiteliais colônicas de rato imortalizadas, a glutamina aumenta a trimerização do HSF e sua translocação ao núcleo, bem como sua fosforilação na serina 230, que promove ativação e consequente ligação ao elemento de resposta nuclear, além de aumentar sua expressão, em um mecanismo relacionado com a ativação transcripcional mediada por fatores de transcrição controlados por aminoácidos (Xue, Slavov e Wischmeyer, 2012).

A indução da expressão de HSP70 pela glutamina também pode ser relacionada com a via das hexosaminas. Glutamina é o doador de grupo amino para a formação da hexosamina uridina difosfato-N-acetilglicosamina (UDP-GlcNAc), reagindo com frutose-6P com a catálise pela frutose-6-amidotransferase (GFAT). A UDP-GlcNAc formada pode mediar modificações pós-traducionais em diversas proteínas, por meio de ortoglicosilação em resíduos de serina e treonina de proteínas como os fatores de transcrição sp1 e HSF-1. Esta reação de ortoglicosilação é catalisada pela enzima polipeptídeo-O- β -acetilglicosaminiltransferase (OGT), e os fatores ortoglicosilados são translocados ao núcleo e se ligam ao promotor nuclear, aumentando a expressão de HSP 70 (Hamiel *et al.*, 2009).

Por outro lado, a reação de ortoglicosilação pode ocorrer também com proteínas pertencentes à cascata de sinalização da insulina, tanto com a utilização de glutamina (Prada *et al.*, 2007), como diretamente pela própria dieta hiperlipídica, mediando a resistência à insulina, onde maiores quantidades de UDP-GlcNAc levam à maior resistência insulínica, o que pode ser tecido-dependente (Cooksey e McClain, 2011).

Além do aminoácido glutamina poder ser utilizado em sua forma livre, o mesmo pode ser administrado na forma de dipeptídeo. A suplementação do dipeptídeo L-alanil-L-glutamina na concentração de 1,5 g/kg de peso corporal/dia durante 21 dias em ratos treinados, promoveu aumento de HSP70 e HSF-1 em músculo sóleo (Petry *et al.*, 2014). Como a glutamina possui baixa estabilidade e baixa solubilidade em água, ela pode ser administrada na forma de dipeptídeo.

Pacientes com sepse com idade entre 1 mês e 14 anos, recebendo nutrição parenteral por ao menos 5 dias, foram suplementados com o dipeptídeo alanil-glutamina na concentração de 0,5 g/kg/dia. As concentrações de glutamina plasmática não foram alteradas com a suplementação, em relação ao grupo que recebeu nutrição parenteral padrão, porém os níveis de HSP70 plasmática mostraram-se aumentados ao final dos 5 dias de tratamento, sugerindo um aumento da expressão desta proteína estimulado por glutamina (Jordan *et al.*, 2015).

Assim, a suplementação de glutamina em sua forma livre ou na forma de dipeptídeo poderia modular parâmetros metabólicos em diferentes situações fisiopatológicas.

2. Hipótese

A administração de dieta hiperlipídica pode alterar o pool plasmático e intracelular do aminoácido glutamina, reduzindo as concentrações corporais deste aminoácido. Como a dieta hiperlipídica aumenta o estresse oxidativo, pode induzir a uma depleção de glutatona, o que poderia aumentar ainda mais o consumo de glutamina.

A administração de dieta hiperlipídica a animais experimentais aumenta a produção de citocinas pró-inflamatórias como interferon γ (IFN γ), fator de necrose tumoral α (TNF α) e interleucina 1 β (IL-1 β), e provoca ativação de NF κ B. O processo inflamatório, associado a uma possível redução de antioxidantes na célula, pode levar à redução de proteínas de choque térmico intracelulares, levando a um prejuízo na sinalização da insulina, com consequente resistência a este hormônio.

A suplementação de glutamina ou do dipeptídeo L-alanil-L-glutamina pode aumentar o pool intracelular deste aminoácido, ativando a via das glicosaminas e consequentemente HSF-1, o que acarreta em um aumento de HSP. O aumento da expressão de HSP70 induzido por glutamina pode reduzir a ativação de NF κ B, minimizando os efeitos inflamatórios intracelulares, consequentemente reduzindo a ativação de JNK, e a fosforilação em serina de proteínas que participam da cascata de sinalização da insulina, como o receptor de insulina, substratos do receptor de insulina e Akt. Assim, pode minimizar a resistência à insulina induzida pela dieta hiperlipídica.

Como a glutamina influencia o funcionamento celular, o conhecimento dos níveis fisiologicamente adequados deste aminoácido e de seus possíveis mecanismos citoprotetores, pode ser pensado como alternativa de tratamento não farmacológico por meio de suplementação.

3. Objetivos

3.1 Objetivos Gerais

Determinar o efeito da L-glutamina e do dipeptídeo L-alanil-Lglutamina sob parâmetros metabólicos e de resistência à insulina induzida por dieta hiperlipídica em camundongos.

3.2 Objetivos Específicos

Observar os efeitos da suplementação dos aminoácidos L-glutamina e do dipeptídeo L-alanil-Lglutamina sobre:

- O padrão de consumo de ração;
- O ganho de peso corporal mensal;
- A sensibilidade à insulina por meio dos teste de tolerância à glicose (oral e intraperitoneal) e teste de tolerância à insulina;
- O perfil lipídico plasmático;
- A concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico no fígado;
- O conteúdo de glutathiona no fígado;
- O conteúdo de glicogênio hepático;
- A expressão das proteínas HSP, TLR4, receptor de insulina e Akt (em suas formas fosforiladas e não fosforiladas, quando pertinente), no fígado e no músculo sóleo;

4. Materiais e Métodos

4.1 Local de Realização dos Experimentos

O presente projeto foi realizado no Laboratório de Fisiologia Celular (FisCel) do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), localizado no campus central da UFRGS (Av. Sarmiento Leite nº 500, 2º andar, laboratório 02, 90050-170 Porto Alegre, RS).

4.2 Considerações Éticas

O projeto de pesquisa foi previamente aprovado pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA/UFRGS), sob nº 21293, de 08 de julho de 2011, após prévia revisão realizada por parecerista *ad hoc* nomeado para o projeto por comissão específica do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas/Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Todos os experimentos foram realizados de acordo com os procedimentos para o uso científico de animais, estabelecidos pela Lei nº 11794, Lei Arouca (BRASIL, 2008), e pelas resoluções normativas 12 e 13 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) (BRASIL, 2013).

4.3 Cálculo do Tamanho Amostral

O tamanho da amostra foi calculado utilizando o programa Minitab versão 15, tendo como base para cálculo os resultados dos protocolos experimentais de nosso laboratório e de outros grupos de pesquisa. Neste contexto, o tamanho de amostra foi utilizado para detectar a menor diferença esperada entre os grupos (de acordo com a literatura 20 ± 10 ng/ml para a principal variável crítica do estudo, a expressão de HSP70. (Febbraio *et al.*, 2004; Krause *et al.*, 2014). Foi utilizado para o cálculo um poder estatístico de 80% para nível de significância de 0,05%.

Considerados estes parâmetros o número de animais por grupo foi de 5, porém, como o volume de sangue e pesos dos tecidos de cada animal seriam

insuficientes para a realização de todas as análises (cada animal fornece cerca de 500µL de sangue, e eram necessários cerca de 1500µL para as análises), foi utilizado um tamanho amostral de 15 animais por grupo. O número de animais (15 por grupo) utilizados para a execução do projeto foi o mínimo possível para produzir o resultado conclusivo, poupando-se, ao máximo, o animal de sofrimento. Desta forma, foram utilizados 6 grupos de animais machos da linhagem B6129SF2-J, totalizando 90 camundongos, e 2 grupos de animais machos da linhagem C57BL/6J, totalizando 30 camundongos.

4.4 Características Relacionadas à Biossegurança

O Laboratório de Fisiologia Celular (FisCel) da UFRGS dispõe de uma área total de 134 m² e conta com várias áreas isoladas para procedimentos específicos. Para a realização dos experimentos foram utilizadas as seguintes áreas: laboratório de procedimentos bioquímicos comuns, área reservada a experimentos com biologia molecular, câmara escura destinada a revelações fotográficas, laboratório de procedimentos com animais, área de preparação de rações animais, setor de autoclavagem e lavagem de materiais, biotério específico para camundongos nocaute ou geneticamente modificados, secretaria, sala de seminários e copa com centro de convivência integrado à sala de estudos.

Todos os procedimentos com animais e manipulação de reagentes foram realizados com o uso de equipamentos de proteção individual adequado ao procedimento (avental, luva de procedimentos, máscara, propé, etc), levando-se em consideração os devidos cuidados necessários para proteção e segurança dos animais e pesquisadores envolvidos.

Materiais tóxicos voláteis foram utilizados em capela de exaustão. Resíduos de reagentes e de géis de poliacrilamida foram tratados como lixo químico, e encaminhados para o Centro de Gestão e Tratamento de Resíduos Químicos da UFRGS para sua correta eliminação.

Em relação ao descarte de animais, após a morte, os animais foram colocados em sacos plásticos brancos identificados com o símbolo de risco biológico, congelados em freezer -20°C destinado para este objetivo no próprio Laboratório de Fisiologia Celular. Com a utilização de cronograma semanal,

este material biológico foi levado ao biotério do ICBS - UFRGS- (Centro de experimentação de animais de laboratório – CREAL), onde foi recolhido pela empresa terceirizada licitada pela Universidade, responsável pelo serviço de coleta de material contaminado, que foi autoclavado e destinado a aterros sanitários conforme a legislação em vigor.

4.5 Animais

Foram utilizados 90 camundongos machos (*Mus musculus*) linhagem B6129SF2-J, adultos com idade de três meses, conforme descrito na sequência experimental e no cálculo do tamanho amostral, e 30 camundongos machos (*Mus musculus*) linhagem C57BL/6J.

Os animais foram obtidos junto ao Biotério Setorial de Camundongos do Laboratório de Fisiologia do ICBS/UFRGS, pertencente ao Centro de Reprodução e Experimentação em Animais de Laboratório (CREAL) do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS, que se encontra no prédio do ICBS. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno de 33 x 17 x 40 cm, com 3-4 animais cada, com o assoalho recoberto com serragem sob iluminação com sistema de LEDs controladas eletronicamente, com ciclo de claro/escuro de 12 h, temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa do ar de 50 a 60%.

4.5.1 Morte dos Animais

Os animais foram mortos por decapitação em guilhotina para roedores, sem anestesia, para obtenção do sangue e tecidos, e posterior realização das análises.

O método escolhido para eutanásia baseia-se no fato deste ser um método rápido e eficaz, que induz a perda imediata de reflexos, além de produzir mudanças fisiológicas mínimas nos tecidos. Considerando a necessidade de obtenção de sangue periférico e realização de análises celulares e bioquímicas, nenhum anestésico ou outra substância foi injetado nos animais por ocasião da decapitação. A morte dos animais sob anestesia, apesar de desejável, é incompatível com nossos experimentos porque todos os

anestésicos comumente utilizados em estudos com animais experimentais levam a uma intensa hiperglicemia em roedores, afetando fatores estudados (Febbraio *et al.*, 2004; Brown *et al.*, 2005), a morte dos animais deve ser executada sem anestesia. O índice de severidade para a morte é sem recuperação.

A sala onde ocorreu a decapitação foi distinta da outra onde ficaram os demais animais a serem submetidos à eutanásia. O ambiente possui exaustão e a sala é composta de mesa central para coleta de material e de bancada lateral com pia, sobre a qual se encontra a guilhotina. Entre a morte de um animal e outro, a guilhotina, a pia e todo o restante do material foi completamente higienizado com água, detergente e álcool, evitando-se assim, maior estresse para os animais. A decapitação, executada em guilhotina para roedores, foi sempre efetuada pela doutoranda, de forma a ser um procedimento muito rápido e o mínimo estressante possível para os animais. Os animais foram decapitados no período da manhã.

4.6 Delineamento do Experimento 1

Os camundongos B6 linhagem B6129SF2-J adultos, com idade de 3 meses, foram divididos em dois grupos. Um grupo recebeu dieta padrão de laboratório (Nuvilab Quimtia SA) durante 5 meses, e outro foi submetido a HFD com duração de 5 meses. Com base na quantidade de calorias ingeridas pelos animais, a dieta HFD consistiu de 58% de gordura a partir de banha de porco, 25,6% de carboidrato e 16,4% de proteína (total 23,4 kJ/g) (Winzell e Ahrén, 2004). A alimentação comercial padrão continha aproximadamente 52% de carboidratos, 21% de proteínas e 4% de lípidos. Os ingredientes na HFD, exceto carboidratos e gordura, foram ajustados para fornecer quantidades similares de nutrientes da dieta controle (tabela 1).

Componente	gramas	% peso total	kcal	kJ	% calorias	kJ/kg ração
RAÇÃO (10% das calorias em Gord., 22%P, 67%C)	100,00	49,57	397,60	1.663,55	36,20	
BANHA	66,00	32,72	600,60	2.512,90	54,68	
CASEÍNA/ALBUMINA	23,30	11,55	93,20	389,95	8,48	
COLESTEROL 0%	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
AMINOMIX	10,80	5,35	6,10	25,53	0,56	
PÓ-TETRA	1,62	0,80	0,92	3,83	0,08	
Total	201,72	100,00	1.098,42	4.595,76	100,00	22.782,85
Previsão de colesterol (% do peso da ração):	0,00					
% de calorias em GORDURAS metabolizáveis:	58,30					
% de calorias em PROTEÍNAS:	16,45					
% de calorias em CARBOIDRATOS:	24,25					

Tabela 1: Composição da dieta hiperlipídica.

Todos os animais receberam água *ad libitum*. O índice de severidade para o manuseio e administração de dietas é considerado como leve, já que os animais não são forçados a nenhuma intervenção além da dieta. A ingestão de alimentos foi mensurada uma vez por semana e o peso corporal total uma vez por mês.

Um teste de tolerância à glicose oral (O-GTT) foi realizado mensalmente em todos os grupos experimentais.

Após o período de 5 meses, os animais recebendo HFD foram divididos em cinco grupos experimentais, que receberam a suplementação (ou água) por gavagem seis vezes por semana, durante 2 meses. O volume administrado durante a gavagem foi calculado de acordo com a dose necessária para o peso do animal, e não ultrapassou 500µL. O índice de severidade para o procedimento de gavagem foi considerado moderado.

Os grupos experimentais foram os seguintes:

- HFD Controle: foi administrada água potável, no volume de 450µL para cada animal.
- HFD Dipeptídeo L-Alanil-L-Glutamina: foi administrada a dose de 1,5 g/kg de peso corporal do animal.
- HFD Glutamina: foi administrada a dose de 1,51 g/kg de peso corporal do animal.
- HFD Alanina: foi administrada a dose de 1,85 g/kg de peso corporal do animal.

- HFD Glutamina + Alanina: foi administrada a dose de 1,0 g/kg de peso corporal do animal de glutamina e de 0,62 g/kg de peso corporal do animal de alanina.

Todas as doses foram calculadas de forma a apresentarem conteúdo isonitrogenado, e todos os aminoácidos foram diluídos em água potável para administração. As doses foram escolhidas de acordo com estudos prévios de nosso grupo de pesquisa, e a alanina foi escolhida como controle primário por seu catabolismo corporal e segurança, além de não ser precursora de glutamina (Petry *et al.*, 2014).

Nos seis grupos, foi realizado o teste de tolerância à glicose oral (O-GTT), tolerância à glicose intraperitoneal (IP-GTT) e tolerância à insulina (ITT) ao final do período de tratamento.

4.6.1 Linha Temporal

Na figura 4 é representada a linha temporal de desenvolvimento do experimento 1.

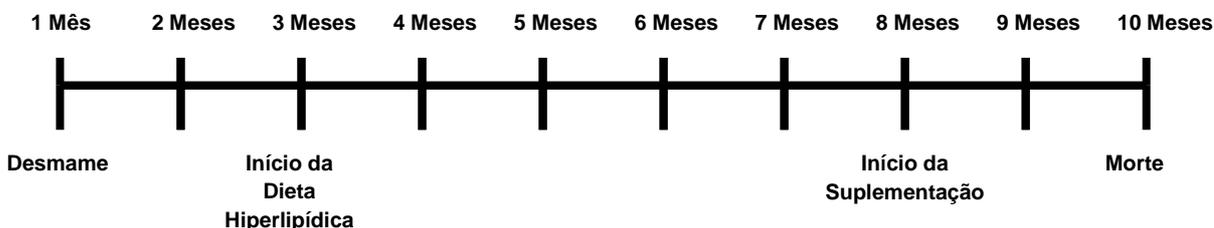


Figura 4: Desenvolvimento do experimento 1.

4.7 Delineamento do Experimento 2

Baseando-se nos resultados obtidos com os camundongos da linhagem B6129SF2-J (descritos na seção de resultados), novos grupos de camundongos foram testados para verificar a eficiência da dieta hiperlipídica na indução da resistência à insulina.

Camundongos da linhagem C57BL/6J recém desmamados, com idade de 28 dias, foram divididos em dois grupos. Um grupo recebeu dieta padrão de laboratório, e outro foi submetido a HFD. Com base na quantidade de calorias

ingeridas pelos animais, a dieta HFD consistiu de 58% de gordura a partir de banha de porco, 25,6% de carboidrato e 16,4% de proteína (total 23,4 kJ/g (Winzell e Ahrén, 2004). O índice de severidade para a administração da dieta HDF é considerado leve.

Nos dois grupos, foi realizado o teste de tolerância à glicose oral (O-GTT) mensalmente. Os grupos foram mortos quando o grupo que recebeu HFD desenvolveu resistência à insulina, ao final do quarto mês de administração da dieta.

4.8 Determinação de Peso dos Animais e Consumo de Ração

Para a determinação do ganho de peso mensal dos animais, os camundongos foram contidos em embalagens plásticas de 175x132 mm, com altura de 115 mm, e pesados individualmente em balança digital *Bel Engineering*, com precisão de $\pm 0,01$ g.

Para a determinação do consumo de ração, a ração das caixas foi pesada 1 x por semana em balança digital *Bel Engineering*, com precisão de $\pm 0,01$ g. O consumo total da caixa foi analisado pelo peso de cada animal, para a avaliação do consumo semanal por peso do animal.

4.9 Determinação do Índice de Lee

Para a determinação do índice de Lee, os animais foram pesados em balança digital *Bel Engineering*, com precisão de $\pm 0,01$ g, e o comprimento naso-anal foi medido com o auxílio de uma régua. O índice foi determinado pelo seguinte cálculo: $(1/3 \text{ do peso/comprimento naso-anal}) \times 100$ (Bernardis e Patterson, 1968).

4.10 Teste de Tolerância à Glicose Oral (O-GTT)

A evolução de alterações da glicemia foi confirmada por meio de teste de tolerância à glicose oral (O-GTT). O índice de severidade para os testes de tolerância à glicose, que envolvem a manipulação, gavagem de glicose e coleta de 5 amostras de sangue da cauda do animal (nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120

min após a gavagem de glicose) foi considerado moderado, pois envolveu repetidas intervenções no animal, apesar de quase indolores.

Para a realização deste teste, os animais foram mantidos em jejum de 12 horas. Foi preparada uma solução de glicose a 50% (m/v) em água, administrada na concentração de 10 g/kg de peso corpóreo, por gavagem de cerca de 500µL de solução, conforme o peso de cada animal. O valor da glicemia em jejum foi mensurado após os animais permanecerem no laboratório por no mínimo 30 minutos antes da primeira coleta (tempo zero).

O sangue para a análise da glicemia nos tempos acima descritos foi coletado com o auxílio de um lancetador automático (tipo caneta) com grau de profundidade calibrável (Accu-Chek modelo MultiClix, Roche). Para tanto, amostras de cerca de 1µL de sangue da parte distal da cauda do animal foram coletadas. As medidas de glicemia foram feitas usando aparelho de leitura glicêmica capilar (glicosímetro) *On Call Plus, Acon Laboratories Inc.*

O cálculo da área sob a curva (AUC), usado na comparação entre os grupos, foi gerado pelo programa estatístico Graph Pad Prism 5, incluindo-se as áreas abaixo da linha de jejum (tempo zero).

4.11 Teste de Tolerância à Glicose Intraperitoneal (IP-GTT)

A evolução de alterações da glicemia foi confirmada por meio de teste de tolerância à glicose intraperitoneal (IP-GTT). O índice de severidade para os testes de tolerância à glicose, que envolvem a manipulação, injeção intraperitoneal de glicose e coleta de 5 amostras de sangue da cauda do animal (nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 min após a administração de glicose) foi considerado moderado, pois envolveu repetidas intervenções no animal, apesar de quase indolores.

Para a realização deste teste, os animais foram mantidos em jejum de 12 horas. Foi preparada uma solução de glicose a 80% (m/v) em PBS (NaCl 136,8 mMol/L, KCl 2,7 mMol/L, KH₂PO₄ 0,9 mMol/L, Na₂HPO₄ 6,4 mMol/L), administrada na concentração de 1 g/kg de peso corpóreo, por injeção intraperitoneal de cerca de 50µL de solução, conforme o peso de cada animal.

O valor da glicemia em jejum foi mensurado após os animais permanecerem no laboratório por no mínimo 30 minutos antes da primeira coleta (tempo zero).

O sangue para a análise da glicemia nos tempos acima descritos foi coletado com o auxílio de um lancetador automático (tipo caneta) com grau de profundidade calibrável (Accu-Chek modelo MultiClix, Roche). Para tanto, amostras de cerca de 1 μ L de sangue da parte distal da cauda do animal foram coletadas. As medidas de glicemia foram feitas usando aparelho de leitura glicêmica capilar (glicosímetro) *On Call Plus, Acon Laboratories Inc.*

O cálculo da área sob a curva, usado na comparação entre os grupos, foi gerado pelo programa estatístico Graph Pad Prism 5, incluindo-se as áreas abaixo da linha de jejum (tempo zero).

4.12 Teste de Tolerância à Insulina (ITT)

A evolução de alterações da glicemia frente à administração de insulina foi confirmada por meio de teste de tolerância intraperitoneal à insulina (ITT). O índice de severidade para este teste, que envolve a manipulação, injeção intraperitoneal de insulina e coleta de amostras de sangue da cauda do animal nos tempos 0, 15, 30 e 45 min após a administração de insulina foi considerado moderado, pois envolveu repetidas intervenções no animal, apesar de quase indolores.

Para a realização deste teste, os animais foram mantidos em jejum de 6 horas. Foi utilizada insulina humana *Novolin® R Novo Nordisk A/S* 100 UI/mL preparada em PBS (NaCl 136,8 mMol/L, KCl 2,7 mMol/L, KH₂PO₄ 0,9 mMol/L, Na₂HPO₄ 6,4 mMol/L), administrada na concentração de 0,75 UI/kg de peso corpóreo, por injeção intraperitoneal (Rong *et al.*, 2009). O valor da glicemia em jejum foi mensurado após os animais permanecerem no laboratório por no mínimo 30 minutos antes da primeira coleta (tempo zero).

O sangue para a análise da glicemia nos tempos acima descritos foi coletado com o auxílio de um lancetador automático (tipo caneta) com grau de profundidade calibrável (Accu-Chek modelo MultiClix, Roche). Para tanto, amostras de cerca de 1 μ L de sangue da parte distal da cauda do animal foram coletadas. As medidas de glicemia foram feitas usando aparelho de leitura glicêmica capilar (glicosímetro) *On Call Plus, Acon Laboratories Inc.*

O cálculo da área sob a curva, usado na comparação entre os grupos, foi gerado pelo programa estatístico Graph Pad Prism 5, incluindo-se as áreas abaixo da linha de jejum (tempo zero).

4.13 Obtenção do plasma

O sangue troncular foi obtido por decapitação em guilhotina para roedores, sem anestesia, e coletado em microtubos contendo 10 μ L de heparina sódica *Heptar*® *Eurofarma* 5000 UI/mL. Em seguida, o sangue heparinizado foi centrifugado a 850 x g por 10 minutos, a 4 °C, em centrífuga *Hettich Universal 320 R*, e o plasma foi separado para análises posteriores.

4.14 Determinação de triglicerídeos plasmáticos

A determinação dos triglicerídeos, ou triacilgliceróis, baseia-se na hidrólise dos mesmos pela lipoproteína lipase, o que promove a liberação de glicerol, que é fosforilado pela enzima glicerol cinase. O produto, glicerol-3-fosfato, é oxidado a dihidroxiacetona fosfato pela enzima glicerol fosfato oxidase, formando peróxido de hidrogênio. Este reage com a 4-aminoantipirina e com o p-clorofenol, pela ação da enzima peroxidase, formando 3,5-dicloro-2-hidroxibenzenosulfonato e quinoneimina, que é o composto cromógeno que absorve luz no comprimento de onda de 500 nm. A quantidade de quinoneimina formada é proporcional à concentração de triacilgliceróis na amostra analisada.

Para esta determinação foi utilizado o Kit comercial *Bioclin Triglicérides Monoreagente*®.

4.15 Determinação de colesterol total plasmático

A determinação da concentração do colesterol plasmático total se baseia na hidrólise dos ésteres de colesterol presentes nas lipoproteínas por esterases, o que promove a liberação de colesterol livre, que é oxidado pela enzima colesterol oxidase, liberando peróxido de hidrogênio. Este reage com a 4-aminoantipirina e com o p-clorofenol, pela ação da enzima peroxidase,

formando 3,5-dicloro-2-hidroxibenzenosulfonato e quinoneimina, que é o composto cromógeno que absorve luz no comprimento de onda de 500 nm. A quantidade de quinoneimina formada é proporcional à concentração de colesterol na amostra analisada.

Para esta determinação foi utilizado o Kit comercial *Bioclin Colesterol Monoreagente*®.

4.16 Determinação de Glutamina

Após a obtenção cirúrgica, o músculo gastrocnêmio dos animais foi pesado e congelado em nitrogênio líquido com auxílio de um *freeze-clamp*. O tecido foi processado por meio de homogeneização em ácido tricloroacético (TCA) 5%, à razão de 6 mL por grama de tecido, com homogeneizador de facas (UltraTurrax). Imediatamente após a homogeneização em TCA, as amostras foram centrifugadas a 16.000 x g por 2 minutos a 4°C. Volumes conhecidos dos sobrenadantes foram transferidos para tubos limpos e foram adicionados 6 µL de Na₂CO₃ para cada 100 µL de sobrenadante, fazendo com que o pH das amostras chegasse a 6,5.

Inicialmente, a L-glutamina das amostras foi desamidada enzimaticamente, por meio da enzima glutaminase, gerando quantidades estequiométricas de amônio e L-glutamato. Em seguida, o L-glutamato foi desidrogenado e convertido a α-cetoglutarato, pela enzima glutamato desidrogenase (GDH), na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada (NAD⁺). As quantidades de L-glutamina das amostras são proporcionais à quantidade de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH) formada, que foi medida a 340 nm em leitora de microplacas. Foi feita uma curva de glutamina com concentrações conhecidas, e os resultados foram expressos em mMol de glutamina por g de tecido (Lund, 1986; Grossie *et al.*, 1993).

Para esta determinação foi utilizado o Kit comercial *GLN-1 Glutamine and Glutamate Determination kit*® - Sigma.

4.17 Determinação de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

Após a obtenção cirúrgica, o fígado dos animais foi congelado em nitrogênio líquido com auxílio de um *freeze-clamp*. O tecido foi processado por meio de homogeneização em KCl 1,15% à razão de 900 µL para cada 100 mg de tecido (1:10), com homogeneizador de facas (UltraTurrax). Imediatamente após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 20.000 x g por 5 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram transferidos para tubos limpos e armazenados em freezer -80 °C.

A determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) é bastante utilizada para medir a lipoperoxidação (LPO), pois o ácido tiobarbitúrico reage com os produtos desta, dentre eles o malondialdeído e outros aldeídos, formando bases de Schiff, que possuem coloração rosada e podem ser medidas espectrofotometricamente a 532 nm.

A técnica consistiu em aquecer, durante uma hora em banho-maria fervente, o material biológico a ser testado (sobrenadantes de fígado), na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS) 8,1%, ácido acético 20% a pH 3,5, butil hidroxi tolueno (BHT) 4,5 mMol/L em etanol, e ácido tiobarbitúrico 0,8%. A mistura foi então resfriada à temperatura ambiente e centrifugada a 900 x g por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi retirado, e a leitura da absorbância realizada a 532 nm em leitora de microplacas. Foi feita uma curva de calibração com malondialdeído, e os resultados foram expressos em nmoles de TBA-RS por mg de proteína (Buege e Aust, 1978).

4.18 Determinação de Proteínas Totais nas Amostras

A concentração de proteínas foi determinada pelo método espectrofotométrico baseado na ligação de proteínas das amostras a azul de comassie brilhante G-250 0,01% (m/v) em ácido fosfórico 8,5% (m/v) e etanol 4,7% (m/v), com formação de um complexo que absorve a 595 nm. Foi utilizada curva padrão de albumina (1; 0,8; 0,4; 0,2; 0,1 e 0,05 mg/mL) sendo o resultado expresso em mg de proteína por mL (Bradford, 1976).

4.19 Determinação de Glicogênio Hepático

Após a obtenção cirúrgica, o fígado dos animais foi congelado em nitrogênio líquido com auxílio de um *freeze-clamp*. As amostras de tecido hepático foram fervidas por 20 minutos em tubos de ensaio contendo KOH a 30%, na proporção de 100 a 200 mg de tecido em 1 mL de KOH. Após, a mistura foi resfriada a temperatura ambiente, e foram acrescentados 3,1 mL de álcool etílico absoluto, com inversão dos tubos. Os tubos foram aquecidos em banho-maria a 65 °C por 10 minutos, e posteriormente foram resfriados em gelo por 20 minutos. A seguir, o material foi centrifugado a 1000 x g, por 5 minutos, sendo o sobrenadante descartado. O precipitado foi novamente solubilizado, em álcool etílico 70%, agitado e centrifugado a 1000 x g, por 5 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado e as amostras diluídas em 1 mL de água destilada.

No momento da dosagem do glicogênio foi feita uma curva de glicogênio a partir de uma solução estoque de 1 mg/mL. As amostras e a curva de glicogênio foram misturadas a ácido clorídrico 4N, na proporção de 1:1 e aquecidas, a 100 °C por 60 minutos. Concluída a hidrólise ácida do glicogênio, os tubos foram resfriados a temperatura ambiente. Em seguida foi efetuada a neutralização com Na₂CO₃ 2 M, seguida de centrifugação a 1000 x g por 1 minuto (Van Handel, 1965).

Após, procedeu-se à dosagem da glicose com o Kit para determinação da glicose por metodologia enzimática-colorimétrica *Analisa*®. Foi utilizado o método de ponto final, preconizado pelo fabricante, em que a glicose é oxidada pela ação da enzima glicose oxidase, formando ácido glicônico e peróxido de hidrogênio. Subsequentemente o peróxido de hidrogênio reage com a 4-aminoantipirina e com o fenol e pela enzima peroxidase formando antipirilquinonimina, de cor vermelha, que é medida espectrofotometricamente e é proporcional a concentração de glicose presente na amostra.

A absorbância das amostras e do padrão foi medida em leitora de microplacas com um comprimento de onda de 505 nm. A concentração de glicose na amostra foi representada em mg/dL.

4.20 Determinação de Glutathiona Total Hepática

Após a obtenção cirúrgica, o fígado dos animais foi congelado em nitrogênio líquido com auxílio de um *freeze-clamp*. O tecido foi processado por meio de homogeneização em ácido metafosfórico 5%, em gelo, à razão de 1 mL/100 mg de tecido. A seguir, o material foi centrifugado a 15.000 x g, por 5 minutos, a 4 °C, sendo o sobrenadante coletado para a determinação.

A análise cinético-espectrofotométrica foi realizada pelo método de reciclagem utilizando o ácido 5,5'- ditiobis-[2-nitrobenzóico] (DTNB, Sigma), NADPH (Sigma, dissolvido em 0.5% (m/v) de NaHCO₃ como agente estabilizador) e GSSG redutase. O ensaio consiste na determinação de glutathiona total (GSH+GSSG) medido em equivalentes de GSH, por meio da oxidação da GSH em GSSG com formação do ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB) e posterior restituição da GSH, pela redução altamente específica da GSSG redutase (EC 1.6.4.2) na presença de NADPH. Portanto, a taxa de formação de TNB é proporcional a soma inicial de GSH e GSSG monitorada a 415 nm em um leitor de microplacas.

Juntamente com as amostras, foi feita uma curva com várias concentrações de GSH. As amostras e curva foram plotadas contra as velocidades máximas, dadas em unidades de variação de absorbância por minuto (Δ UA/min), e os valores foram expressos em nMols de glutathiona total por g de tecido (Kolberg *et al.*, 2006).

4.21 Análise da Expressão de Proteínas por Western Blotting

Após a obtenção cirúrgica, os tecidos dos animais foram congelados em nitrogênio líquido com auxílio de um *freeze-clamp*. Os tecidos foram processados por meio de homogeneização em tampão de extração contendo inibidores de proteases e fosfatases, composto de dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,1%, leupeptina 2 µg/mL, aprotinina 2 µg/mL, cloridrato de N-Tosil-L-Lisina Clorometil Cetona (TLCK) 20 µMol/L, Fluoreto de Fenil-Metil Sulfonila (PMSF) 100 µMol/L, ortovanadato de sódio 1 mMol/L, molibdato de sódio 1 mMol/L e β glicerofosfato 1 mMol/L. A homogeneização foi realizada em gelo, à razão de 900 µL de tampão para cada 100 mg de tecido hepático e 400 µL de

tampão para cada 100 mg de tecido muscular. A seguir, o material foi centrifugado a 15.000 x g, por 5 minutos, a 4 °C, e o sobrenadante foi coletado para a determinação de proteínas, conforme descrito anteriormente.

Alíquotas de amostras do homogenato foram misturadas com tampão de amostra Laemmli, de forma a obter-se a concentração de proteínas de 2 µg/µL. As amostras foram então fervidas por 5 min a 100°C. Alíquotas contendo 40 µg de proteínas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10% (Laemmli, 1970), utilizando tampão de corrida (tris base 25 mMol/L, glicina 0,19 Mol/L, SDS 0,1%). Como marcador de peso molecular foi utilizada a mistura de padrões de pesos moleculares previamente coloridos (BIO-RAD Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Standards #161-0375) com os seguintes pesos moleculares: 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15 e 10 kDa. As proteínas fracionadas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Millipore), em sistema refrigerado BIO-RAD Blot Cell, utilizando tampão de transferência (tris base 25 mMol/L, glicina 1,92 Mol/L, metanol 20%), e tensão de 100 V. A transferência foi avaliada por coloração com Ponceau-S. As membranas foram incubadas com solução bloqueadora contendo albumina bovina 2% em tampão TBS-T (tris base 200 mMol/L, NaCl 5 mMol/L, Tween 20 0,05%) durante 1 hora, e em seguida incubadas durante uma noite a 4°C com diluições adequadas do anticorpo primário para as proteínas em estudo. Posteriormente, as membranas foram lavadas 3 x por 10 minutos com tampão TBS-T.

Para determinar a expressão de HSP70 foi utilizado o anticorpo primário monoclonal anti-HSP70 (Sigma H5147), que reconhece tanto a forma induzível de 72 kDa quanto a forma constitutiva de 73 kDa. Em seguida, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase (Sigma A9044) por 1 h em temperatura ambiente. Posteriormente, as membranas foram lavadas 3 x por 10 minutos com tampão TBS-T.

Para determinar a expressão de GAPDH, utilizado como normalizadores para as proteínas em estudo, foi utilizado o anticorpo primário anti-GAPDH (Sigma G9545). Em seguida, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase (Sigma A0545) por 1 h em temperatura ambiente. Posteriormente, as membranas foram lavadas 3 x por 10 minutos com tampão TBS-T.

Para determinar a expressão de Akt fosforilada foi utilizado o anticorpo primário anti-Akt-P (Sigma SAB4300574), para o receptor de insulina total o anticorpo primário anti-IR total (Sigma SAB4501555), para o receptor de insulina fosforilado o anticorpo primário anti IR-P (Sigma I1783) e para TLR4 o anticorpo primário anti-TLR4 (Sigma PRS3141). Em seguida as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário biotilado (Sigma B8895) por 1 h em temperatura ambiente. Posteriormente, as membranas foram lavadas 3 x por 10 minutos com tampão TBS-T. Em sequência, as membranas foram incubadas com estreptavidina-HRP (Sigma S2438) por 1 h em temperatura ambiente, e foram lavadas 3 x por 10 minutos com tampão TBS-T.

Após as lavagens, as membranas foram tratadas com os reagentes quimioluminescentes ácido p-coumárico (2 nMol) e luminol (0,01 nMol), na presença de peróxido de hidrogênio e reveladas no equipamento (Amersham Pharmacia Biotech) Video Documentation System de aquisição digital e processamento de imagens Image Quant 350 com software Image Quant TL 7.0 para Windows. As intensidades das bandas foram quantificadas por densitometria óptica pelo uso do programa Image J (Frederich, Maryland, EUA), e os dados foram apresentados como unidades arbitrárias da razão obtida entre o volume de pixels de cada banda de interesse pela quantidade de pixels detectada nas respectivas bandas da proteína normalizadora.

4.22 Análise estatística

O tratamento estatístico foi desenvolvido no programa estatístico GraphPad Prism 5.0. Foi realizado teste de normalidade de Shapiro-Wilk, e como os dados apresentavam distribuição normal, foram apresentados por procedimentos descritivos, em que a medida de tendência central utilizada foi a média e a medida de dispersão o erro padrão da média (epm). A análise inferencial utilizada foi a análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Student Newman Keuls (SNK), ANOVA de medidas repetidas ou teste T. As diferenças foram consideradas significativas para um nível de significância de, pelo menos, 5%.

5. Resultados

Conforme descrito na seção de materiais e métodos, o presente trabalho foi dividido em dois experimentos principais:

1) Efeitos da HFD e da suplementação de aminoácidos, conforme descrito no delineamento do experimento 1, em que camundongos adultos, com 3 meses de idade, da linhagem B6129SF2-J receberam HFD durante 5 meses, e nos dois meses seguintes receberam HFD juntamente com a suplementação de aminoácidos, totalizando 7 meses de tratamento.

2) Efeitos da HFD, conforme descrito no delineamento do experimento 2, em que camundongos da linhagem C57BL/6J, recém desmamados, receberam HFD durante 4 meses.

Dessa forma, os resultados de ambos os experimentos serão apresentados nessa seção separadamente. Os valores apresentados são a média de cada grupo \pm epm. Para cada parâmetro estudado há uma figura, para melhor visualização dos dados.

5.1 Resultados do Experimento 1

Foram analisados, mensalmente, parâmetros de peso dos animais e tolerância à glicose durante o período de administração da HFD e antes do início da administração dos aminoácidos. Durante os dois meses de administração dos aminoácidos, foi avaliado o consumo de ração dos animais semanalmente, e o peso dos animais ao início e ao final do tratamento, com o objetivo de avaliar mudanças relacionadas ao consumos dos aminoácidos analisados.

Ao final do tratamento, foram realizados os testes de O-GTT, IP-GTT e ITT, bem como a glicemia de jejum. Após a morte dos animais, a gordura abdominal total foi pesada, e foram dosados os triglicerídeos e o colesterol plasmáticos. No músculo foi dosada a concentração de glutamina, e no tecido hepático foram dosados TBA-RS, catalase, glutathiona total e glicogênio. Adicionalmente foram analisadas, no músculo e fígado a expressão das proteínas HSP70, AKT fosforilada, IR total, IR fosforilado e TLR4.

5.1.1 Peso dos Animais Pré-Suplementação

Para avaliar o efeito da HFD sobre o peso corporal dos animais, foram realizadas medidas mensais, conforme representado na figura 5. Os resultados mostram que animais recebendo HFD mostram maior peso do que animais recebendo a dieta padrão, com exceção do mês 4.

Foi realizada também a ANOVA de medidas repetidas, separadamente para os grupos em dieta padrão e em HFD. O grupo recebendo dieta padrão não mostrou variação de peso ao longo dos 5 meses de tratamento ($P=0,0794$; $F=2,262$), e o grupo recebendo HFD mostrou aumento de peso no segundo mês em relação ao primeiro, mas a partir do segundo mês não mostrou maior aumento de peso ($P=0,0005$; $F=6,29$).

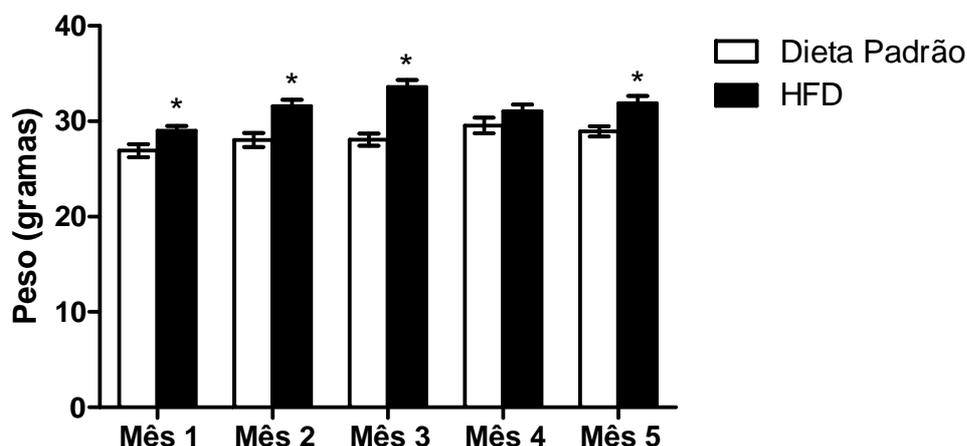


Figura 5: Peso dos animais B6129SF2-J antes do início da suplementação. Dados expressos em média + epm, $n=11-13$ por grupo. ANOVA de uma via seguida de SNK. $F=11,09$. * representa valores significativos nos grupos HFD em relação à dieta padrão em cada mês ($P<0,001$)

Interessantemente, menos de 10% dos animais desenvolveram obesidade severa ao longo do tratamento, conforme representado na figura 6.



Figura 6: Representação de animal B6129SF2-J que recebeu HFD juntamente com animal que recebeu dieta padrão.

5.1.2 Glicemia de Jejum Pré-Suplementação

Para avaliar o efeito da HFD sobre a glicemia de jejum dos animais, foi realizada a análise ao final de 5 meses de dieta, conforme representado na figura 7. Os resultados mostram que animais que receberam HFD não apresentam diferenças na glicemia de jejum, em relação aos animais que receberam dieta padrão.

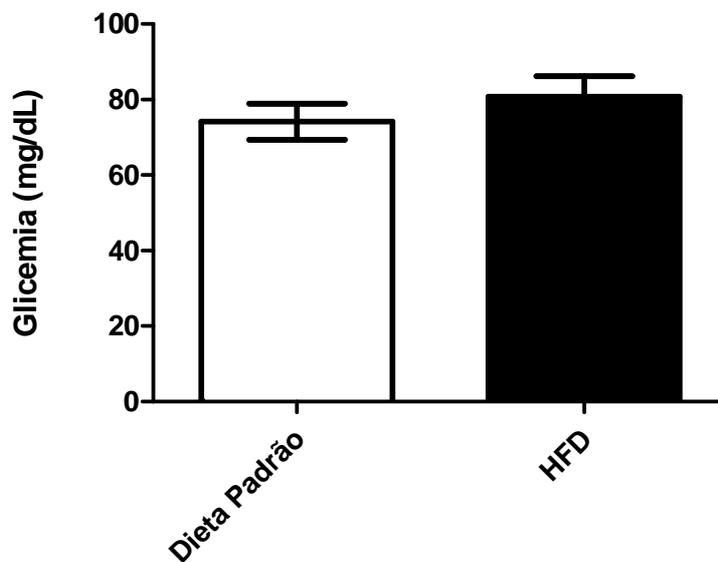


Figura 7: Glicemia de jejum dos camundongos B6129SF2-J. São representados os valores de glicemia de jejum nos grupos experimentais Dieta Padrão e HFD no mês 5 de administração de dieta. Dados expressos em média + epm, n=11 por grupo. Teste T (P=0,3687).

5.1.3 O-GTT Pré-Suplementação

Para avaliar o efeito da HFD sobre o O-GTT dos animais, foi realizada uma análise mensal, conforme representado na figura 8. Os resultados mostram que animais que receberam HFD não apresentam diferenças na resposta à administração oral de glicose, em relação aos animais que receberam dieta padrão.

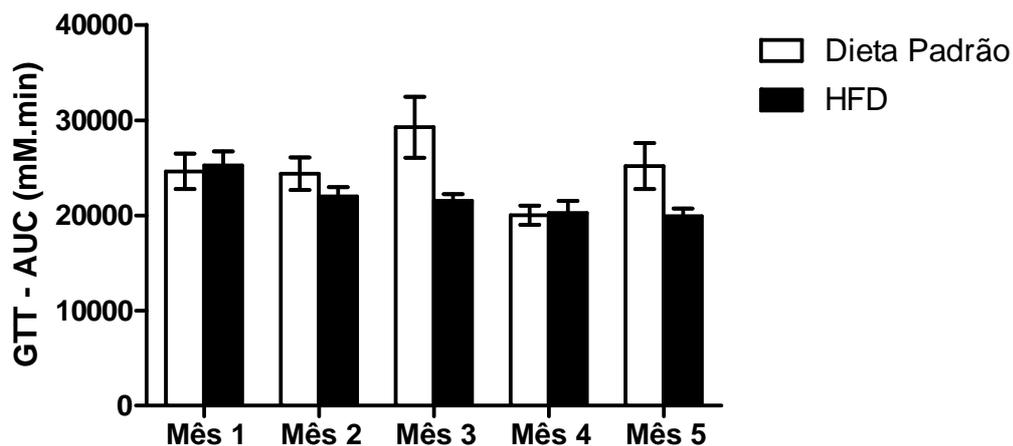


Figura 8: Teste de tolerância à glicose oral nos camundongos B6129SF2-J. São representadas as áreas sob a curva (AUC) nos grupos experimentais Dieta Padrão e HFD. Dados expressos em média + epm, n=11-13 por grupo. ANOVA de medidas repetidas ($P=0,1136$; $F=1,996$).

5.1.4 Consumo de Ração Semanal Durante a Suplementação

Com o objetivo de avaliar se a suplementação dos aminoácidos seria capaz de alterar o padrão de consumo de ração HFD, o consumo semanal de ração nos animais que receberam a HFD com e sem a suplementação foi avaliado. Os resultados mostram que animais que receberam HFD com suplementação de aminoácidos apresentam menor consumo de ração (figura 9).

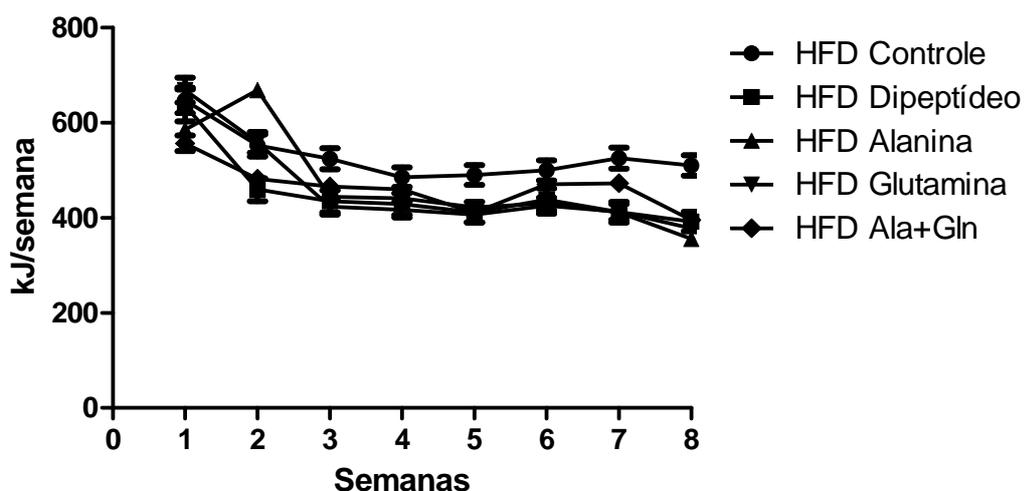


Figura 9: Consumo de ração durante o período de suplementação. Dados expressos em Joules por semana (kJ/peso de animal/semana). Os grupos com suplementação de aminoácidos apresentaram menor consumo do que o grupo controle. ANOVA de medidas repetidas ($P<0,0001$).

5.1.5 Variação de Peso dos Animais Durante a Suplementação

Com o objetivo de avaliar se a suplementação dos aminoácidos seria capaz de alterar a variação de peso nos animais recebendo HFD, o peso foi medido no início e no final do período de suplementação, bem como o índice de Lee. Os resultados mostram que animais que receberam HFD, ou HFD com suplementação de aminoácidos não apresentam diferenças na variação de peso (figura 10), ou índice de Lee (figura 11), nos dois meses de suplementação de aminoácidos. É importante salientar que, ao final do tratamento, o peso dos animais que receberam HFD foi significativamente maior que o peso dos animais que receberam dieta padrão (figura 12), da mesma forma que foi observado no início do período de suplementação, aos cinco meses de HFD (figura 5).

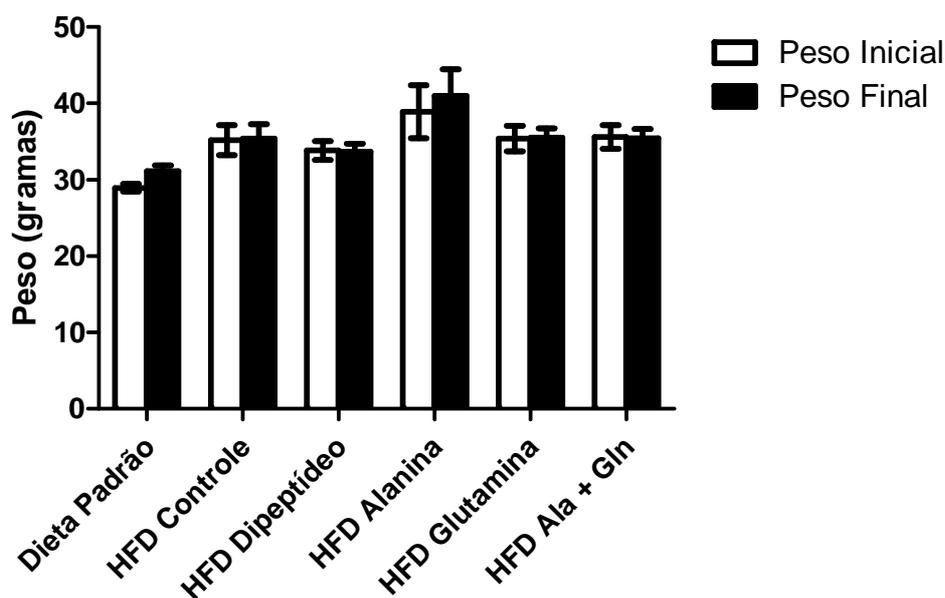


Figura 10: Variação de peso dos animais B6129SF2-J. São representados os valores de peso nos grupos experimentais, ao início e ao final do período de suplementação. Dados expressos em média + epm, n=11-12 por grupo. ANOVA de uma via, seguida por SNK (P=0,9692).

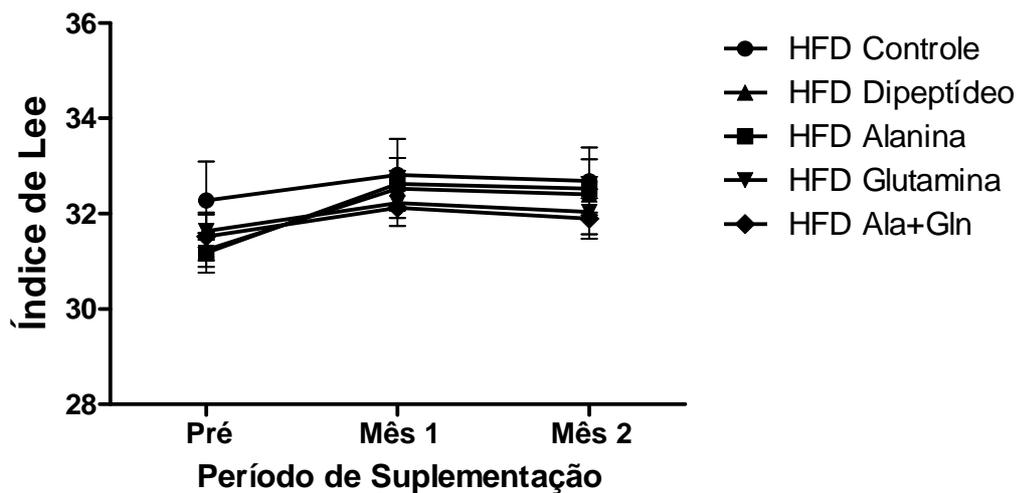


Figura 11: Índice de Lee dos animais B6129SF2-J. Índice de Lee nos grupos experimentais, ao início, no final do primeiro mês e ao final do período de suplementação. Dados expressos em média + epm, n=5 por grupo. ANOVA de uma via, seguida por SNK.

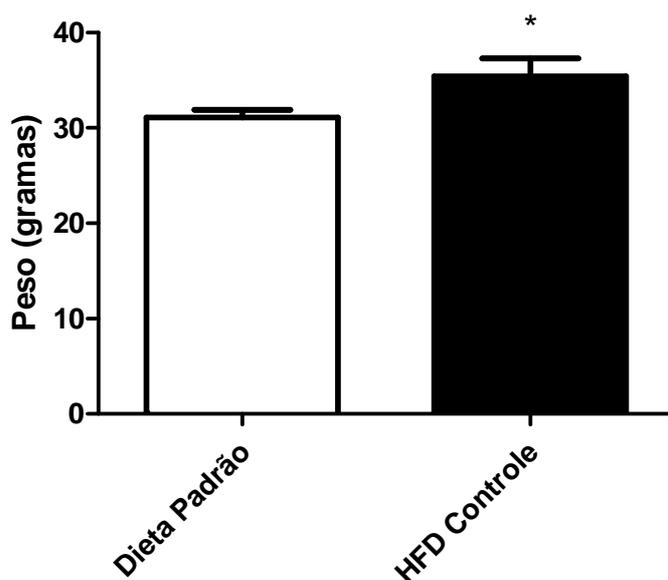


Figura 12: Peso dos animais B6129SF2-J após o período de 7 meses de HFD. Dados expressos em média + epm, n=12-15 por grupo. Teste T. * representa valores significativos no grupo HFD em relação à dieta padrão (P=0,0317).

5.1.6 Gordura Abdominal Total

Após a morte dos animais, foi feita a obtenção cirúrgica da gordura abdominal total. O peso da gordura abdominal total está representado na figura 13. Os animais que receberam a HFD durante o período de tratamento

mostraram aumento da gordura abdominal ($1,29 \pm 0,21$ g) de mais de 100% em relação aos animais que receberam a dieta padrão ($0,46 \pm 0,07$ g). A suplementação com os aminoácidos não alterou o padrão de deposição de gordura dos animais, não sendo capaz de reverter o aumento causado pela HFD (HFD Dipeptídeo $1,26 \pm 0,17$ g; HFD Alanina $1,91 \pm 0,41$ g; HFD Glutamina $1,46 \pm 0,19$ g e HFD Ala+Gln $1,09 \pm 0,21$ g).

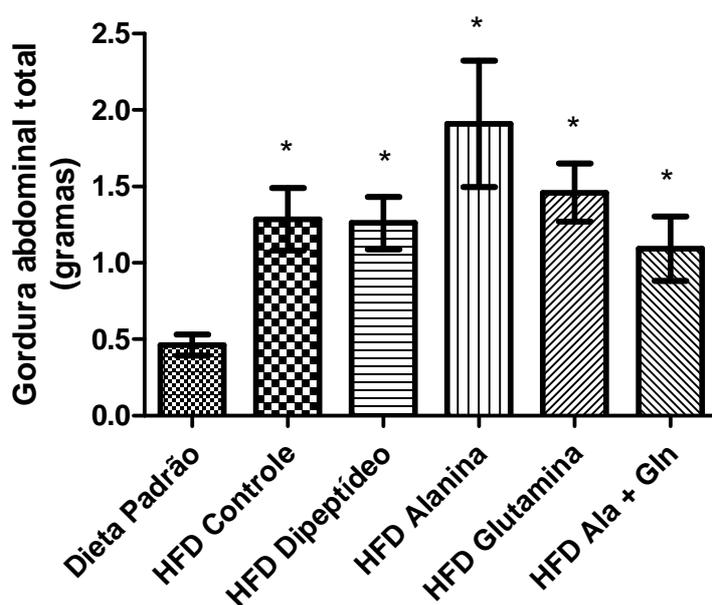


Figura 13: Peso da gordura abdominal total dos camundongos B6129SF2-J. Resultados expressos em média + epm, n= 11-15 por grupo. ANOVA de uma via, seguida por SNK. $F=5,085$ * representa valores significativos em relação à dieta padrão ($p < 0,0005$).

5.1.7 Teste de Tolerância à Glicose Oral Após a Suplementação

Para avaliarmos o efeito da HFD e da suplementação de aminoácidos na resposta glicêmica frente a uma sobrecarga de glicose administrada oralmente, foi realizado o teste de tolerância à glicose oral. Os resultados estão apresentados na figura 14, na qual podemos observar que os animais que receberam dieta padrão apresentaram um pico de glicemia em 30 minutos, porém os animais que receberam HFD, ou HFD juntamente com aminoácidos, não apresentaram este mesmo pico. Apesar desta diferença de resposta temporal, a avaliação de áreas sob a curva não mostrou diferenças entre os grupos estudados (figura 14). Foi observado que, ao final do tratamento, a

glicemia de jejum dos animais que receberam HFD foi significativamente maior que a glicemia de jejum dos animais que receberam dieta padrão (figura 15), porém a suplementação dos aminoácidos não foi capaz de reverter este aumento para os valores encontrados nos animais que receberam a dieta padrão (figura 16).

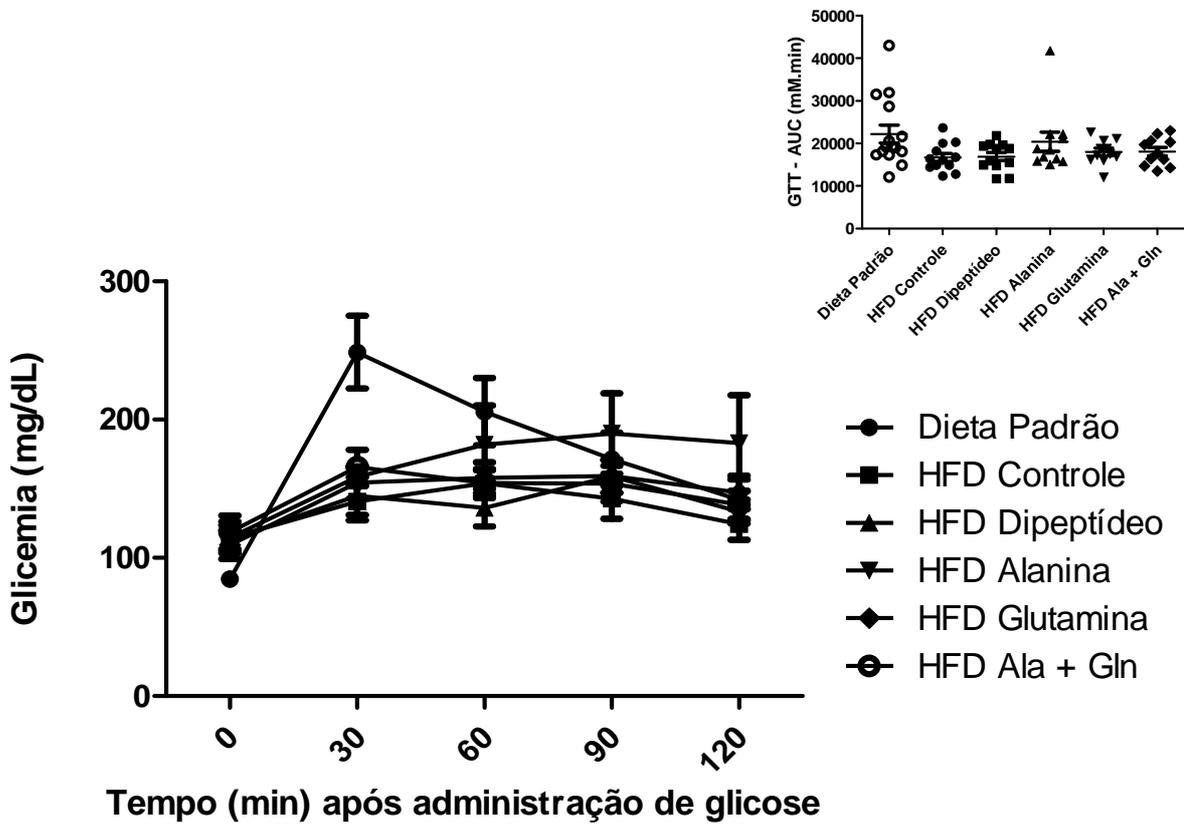


Figura 14: Teste de tolerância à glicose oral dos camundongos B6129SF2-J. Na parte superior/menor, respectiva área sob a curva. Resultados expressos em média + epm, n= 11-13 por grupo. ANOVA de uma via, seguida por SNK. F=2,110, P=0,0751.

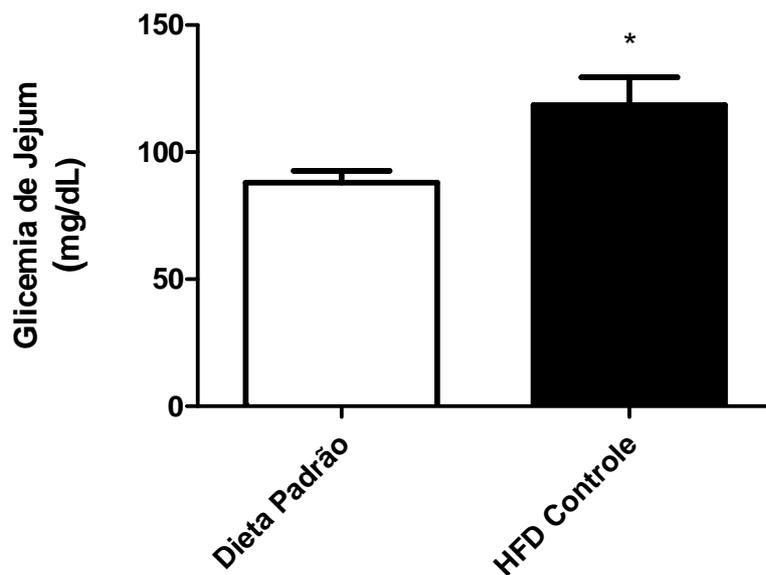


Figura 15: Glicemia de jejum dos camundongos B6129SF2-J nos grupos dieta padrão e HFD ao final de 7 meses de tratamento. Dados expressos em média + epm, n=10-11 por grupo. Teste T. * representa valores significativos em relação à dieta padrão (P=0,0162).

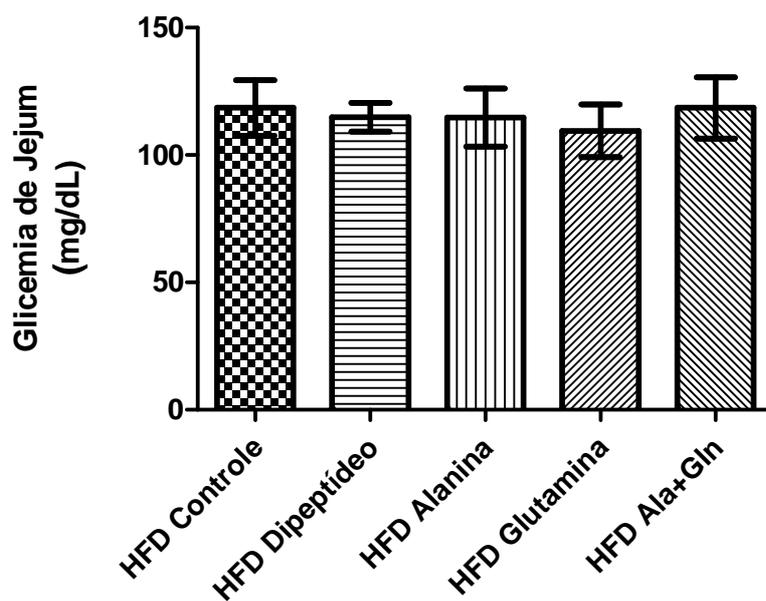


Figura 16: Glicemia de jejum nos grupos experimentais ao final do período de suplementação. Dados expressos em média + epm, n=11-13 por grupo. ANOVA de uma via, seguida por SNK. F=0,1292, P=0,9710.

5.1.8 Teste de Tolerância à Glicose Intraperitoneal Após a Suplementação

Devido aos resultados obtidos no teste de tolerância à glicose oral, que mostrou que os animais que receberam dieta padrão apresentaram um pico de glicemia em 30 minutos, porém os animais que receberam HFD, ou HFD juntamente com aminoácidos, não apresentam este mesmo pico, foi realizado o teste de tolerância à glicose intraperitoneal, para excluir possíveis alterações de absorção de glicose no sistema digestivo, relacionadas a HFD ou à suplementação de aminoácidos. Podemos observar que mesmo com esta avaliação, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos estudados, mas todos os grupos apresentaram pico em 30 minutos (figura 17). Em relação à glicemia de jejum, os resultados foram similares aos encontrados durante a realização do O-GTT (dados não mostrados).

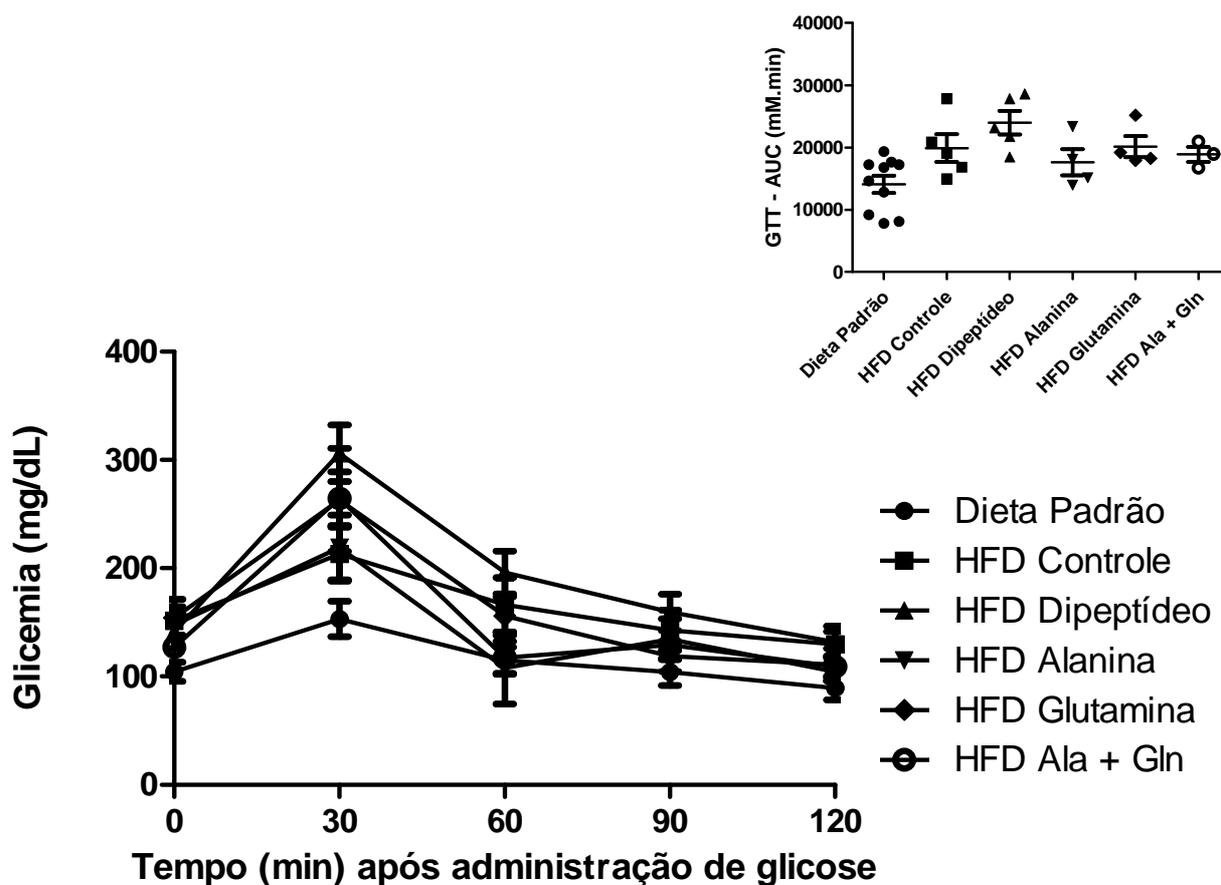


Figura 17: Teste de tolerância à glicose intraperitoneal dos camundongos B6129SF2-J. Na parte superior/menor, respectiva área sob a curva. Resultados expressos em média + epm, n= 4-10 por grupo. ANOVA de uma via, seguida por SNK. F=4,211, P= 0,065.

5.1.9 Teste de Tolerância à Insulina Após a Suplementação

No intuito de avaliar a resposta à insulina nos animais que receberam dieta padrão, HFD, ou HFD juntamente com aminoácidos, foi realizado o teste de tolerância à insulina. Foi observado que 70% dos animais que receberam a dieta padrão apresentaram hipoglicemia a partir de 45 minutos após a injeção de insulina, e tiveram que receber glicose por via oral. Desta forma, o teste de tolerância à insulina foi finalizado em 45 minutos. Dos animais recebendo HFD, com adição ou não da suplementação de aminoácidos, nenhum apresentou sintomas de hipoglicemia, sugerindo que a HFD confere resistência à ação da insulina, que não é abolida com a suplementação dos aminoácidos. Podemos observar que a glicemia dos animais que receberam dieta padrão foi significativamente menor do que a glicemia dos animais que receberam HFD, com ou sem suplementação de aminoácidos, mostrando que a resposta à insulina foi prejudicada com a administração de HFD, e os aminoácidos suplementados não foram capazes de reverter este prejuízo (figura 18).

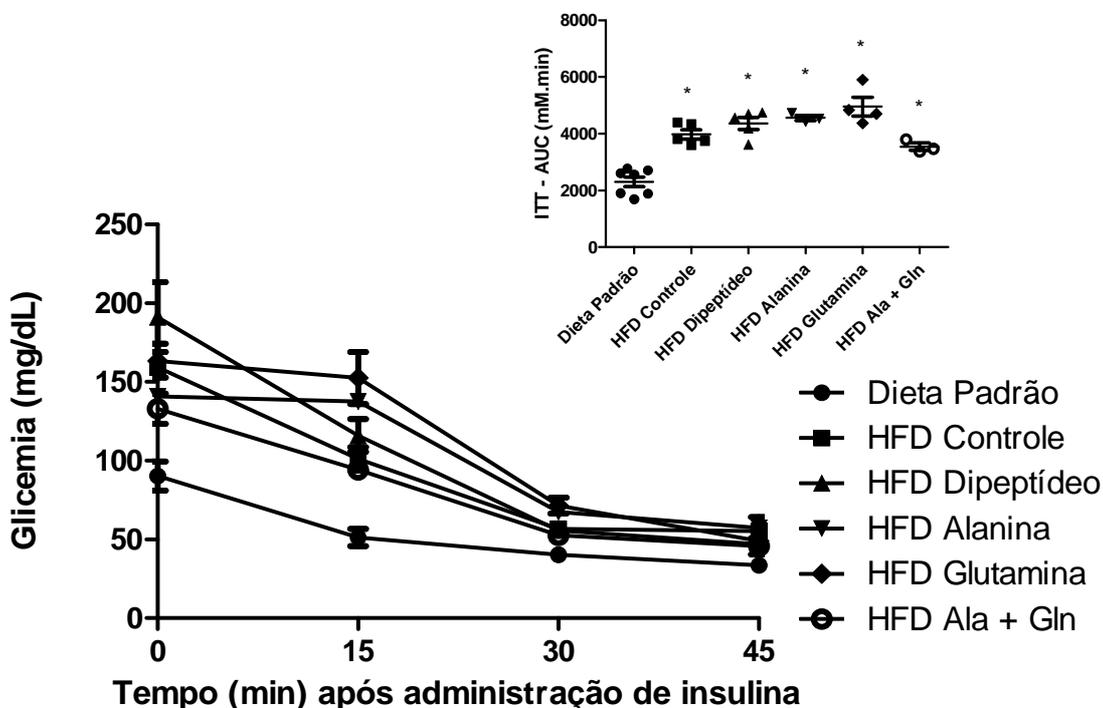


Figura 18: Teste de tolerância à insulina dos camundongos B6129SF2-J. Na parte superior, área sob a curva. Resultados expressos em média + epm, n= 3-7. * valores significativos em relação à dieta padrão. ANOVA de uma via, seguida por SNK. F=25,14, p<0,0001.

5.1.10 Triglicerídeos Plasmáticos

Os valores de triglicerídeos plasmáticos não foram alterados nos animais recebendo HFD ou HFD com suplementação de aminoácidos, em relação ao grupo recebendo dieta padrão (figura 19).

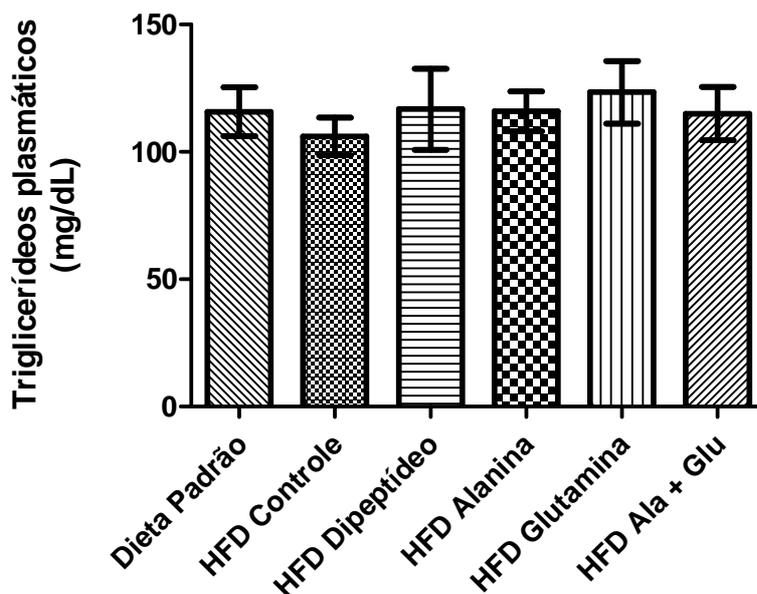


Figura 19: Triglicerídeos plasmáticos dos camundongos B6129SF2-J. Resultados expressos em média + epm, n= 11-15 por grupo. ANOVA de uma via, seguida por SNK. F=0,2636. p=0,9312.

5.1.11 Colesterol Total Plasmático

Os valores de colesterol total plasmático estão representados na figura 20. Os animais que receberam a HFD durante o período de tratamento mostraram aumento do colesterol total plasmático ($175,1 \pm 10,2$ mg/dL) em relação aos animais que receberam a dieta padrão ($106,0 \pm 9,0$ mg/dL). A suplementação com os aminoácidos não alterou o colesterol plasmático dos animais, não sendo capaz de reverter o aumento causado pela HFD (HFD Dipeptídeo $153,7 \pm 8,5$ mg/dL; HFD Alanina $192,4 \pm 9,1$ mg/dL; HFD Glutamina $173,1 \pm 10,3$ mg/dL e HFD Ala+Gln $158,5 \pm 11,8$ mg/dL).

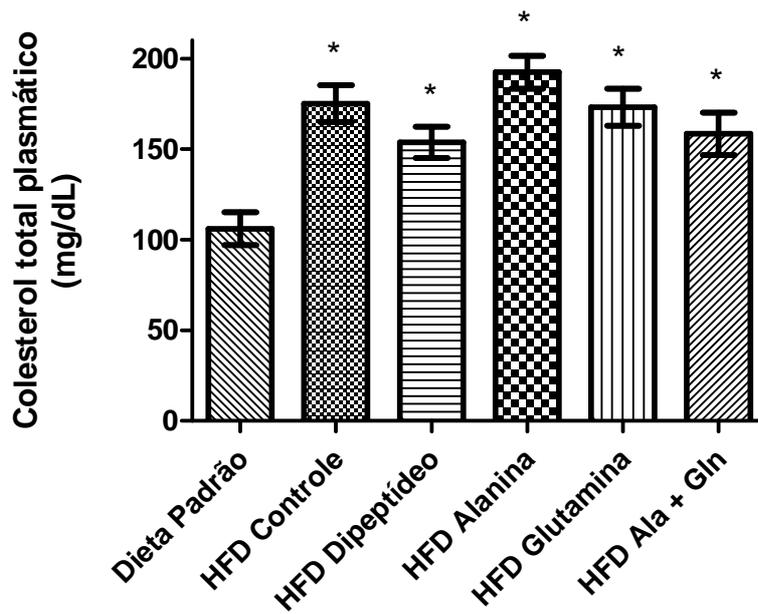


Figura 20: Colesterol total plasmático dos camundongos B6129SF2-J. Resultados expressos em média + epm, n= 11-15 por grupo. ANOVA de uma via, seguida por SNK. F=10,73 * representa valores significativos em relação à dieta padrão (p<0,0001).

5.1.12 Concentração de Glutamina Muscular

As concentrações de glutamina muscular não foram alteradas nos animais recebendo HFD ou HFD com suplementação de aminoácidos (figura 21).

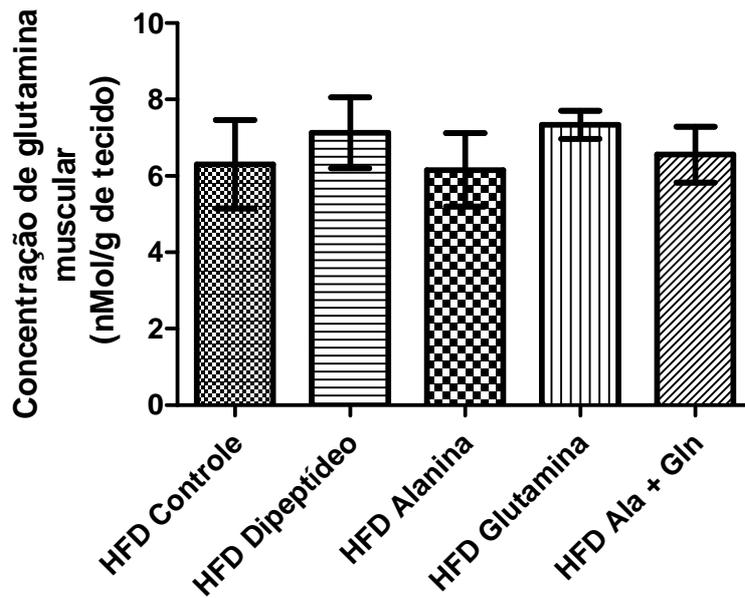


Figura 21: Concentração de glutamina muscular dos camundongos B6129SF2-J. Resultados expressos em média + epm, n= 4-5 por grupo. ANOVA de uma via, seguida por SNK. F=0,3489. p=0,8415.

5.1.13 Efeito da HFD e Suplementação de Aminoácidos na Expressão de HSP70 no Músculo Esquelético

A expressão de HSP70 no músculo esquelético não foi alterada nos animais recebendo HFD ou HFD com suplementação de aminoácidos (figura 22).

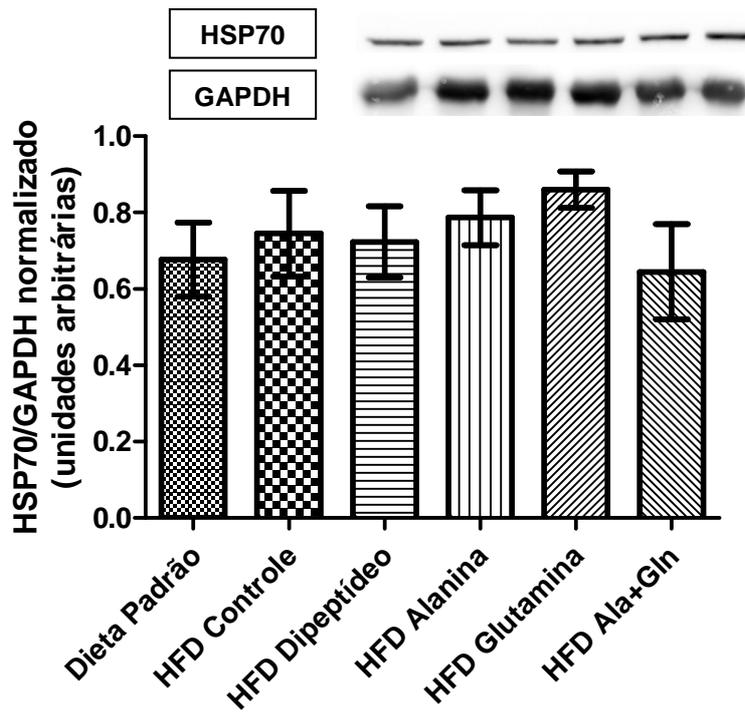


Figura 22: Imunodeteção de HSP70 no músculo sóleo de camundongos B6129SF2-J. Resultados expressos em média + epm, n= 4 por grupo. ANOVA de uma via, seguida por SNK. F=0,6729. Não houve diferença estatística entre os grupos ($p=0,6492$).

5.1.14 Efeito da HFD e Suplementação de Aminoácidos na Expressão de TLR4 no Músculo Esquelético

A expressão de TLR4 no músculo esquelético não foi alterada nos animais recebendo HFD ou HFD com suplementação de aminoácidos (figura 23).

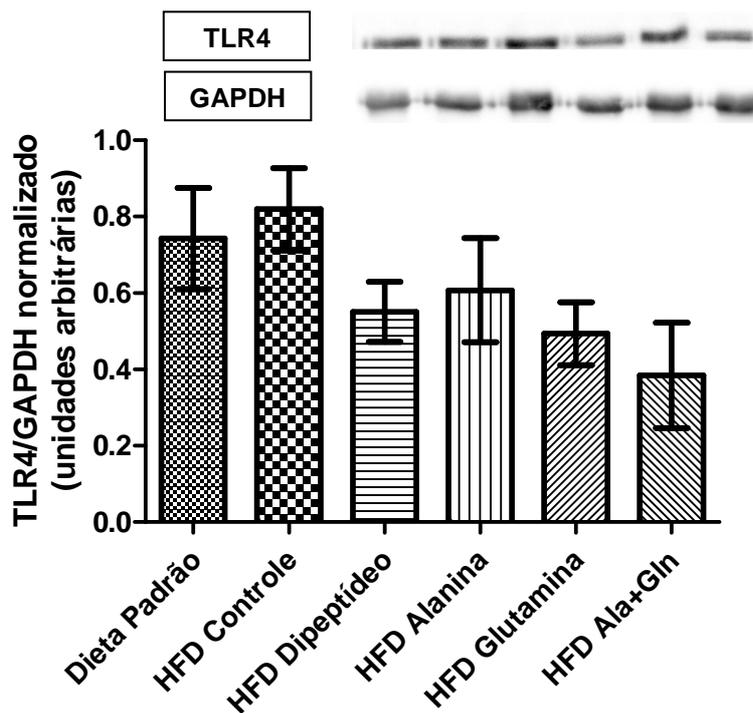


Figura 23: Imunodeteccção de TLR4 no músculo sóleo de camundongos B6129SF2-J. Resultados expressos em média + epm, n= 5 por grupo. ANOVA de uma via, seguida por SNK. $F=1,937$. Não houve diferença estatística entre os grupos ($p=0,1253$).

5.1.15 Efeito da HFD e Suplementação de Aminoácidos na Expressão de Akt-P no Músculo Esquelético

A expressão de Akt-P no músculo esquelético não foi alterada nos animais recebendo HFD ou HFD com suplementação de aminoácidos (figura 24).

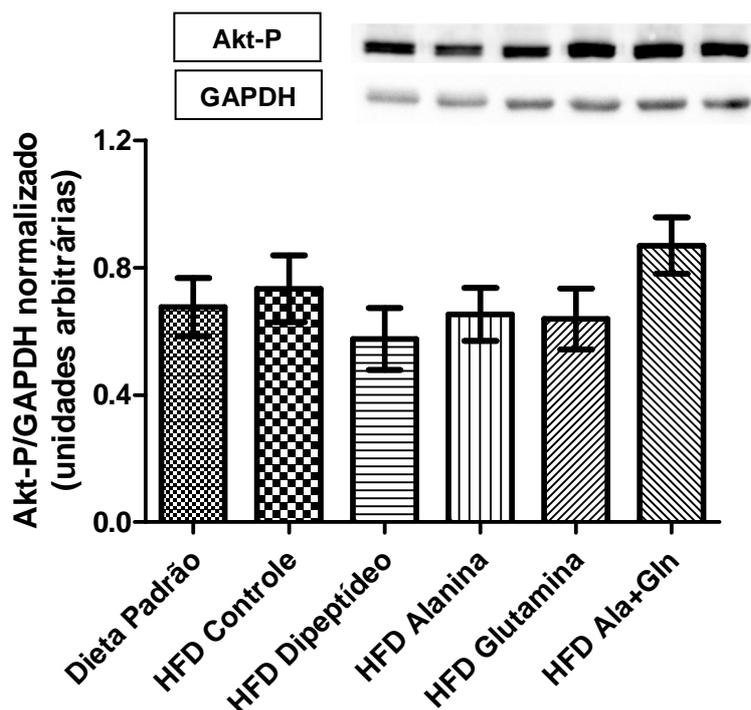


Figura 24: Imunodeteccção de Akt-P no músculo sóleo de camundongos B6129SF2-J. Resultados expressos em média + epm, n= 6 por grupo. ANOVA de uma via, seguida por SNK. F=1,170. Não houve diferença estatística entre os grupos ($p=0,3469$).

5.1.16 Efeito da HFD e Suplementação de Aminoácidos na Expressão de IR-P no Músculo Esquelético

A expressão de IR-P no músculo esquelético não foi alterada nos animais recebendo HFD ou HFD com suplementação de aminoácidos (figura 25).

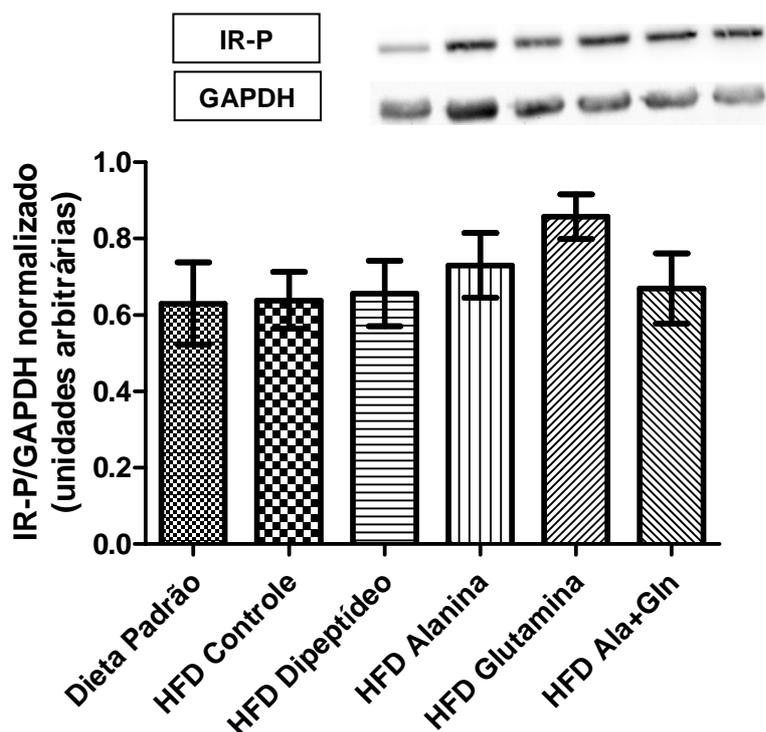


Figura 25: Imunodeteção de IR-P no músculo sóleo de camundongos B6129SF2-J. Resultados expressos em média + epm, n= 6 por grupo. ANOVA de uma via, seguida por SNK. F=1,024. Não houve diferença estatística entre os grupos ($p=0,4129$).

5.1.17 TBA-RS no fígado

A medida de TBA-RS, apresentada em equivalentes de malondialdeído (MDA), quando comparados os grupos dieta padrão e HFD, observa-se que o grupo HFD apresenta menor TBA-RS do que o grupo tratado com dieta padrão. Não foram observadas alterações nos animais recebendo HFD com suplementação de aminoácidos (figura 26).

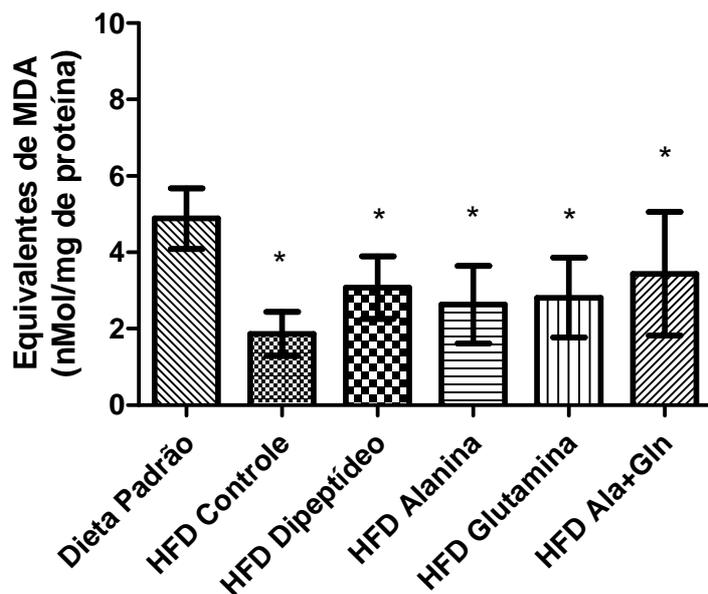


Figura 26: TBA-RS no fígado de camundongos B6129SF2-J. Resultados em eq. de MDA e expressos em média + epm, n= 5-8 por grupo. ANOVA de uma via, seguida por SNK. F=0,9759. * representa valores significativos em relação ao grupo que recebeu dieta padrão (p=0,4461).

5.1.18 Glutaciona Total Hepática

A concentração de glutaciona total hepática não foi alterada nos animais recebendo HFD ou HFD com suplementação de aminoácidos (figura 27).

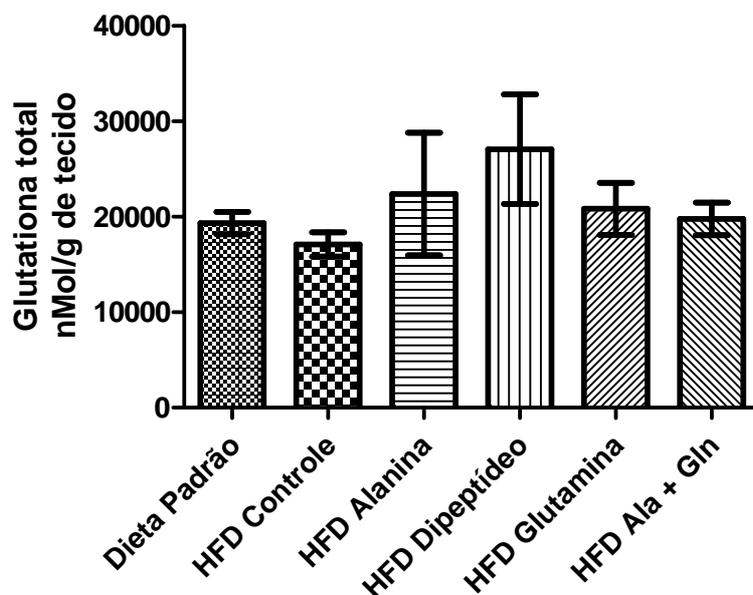


Figura 27: Glutaciona total hepática de camundongos B6129SF2-J. Resultados representados em nMol/grama de tecido, e expressos em média + epm, n= 4-5 por grupo. ANOVA de uma via, seguida por SNK. F=0,9926. Não houve diferença estatística entre os grupos (p=0,4512)

5.1.19 Glicogênio Hepático

A concentração de glicogênio hepático não foi alterada nos animais recebendo HFD ou HFD com suplementação de aminoácidos (figura 28).

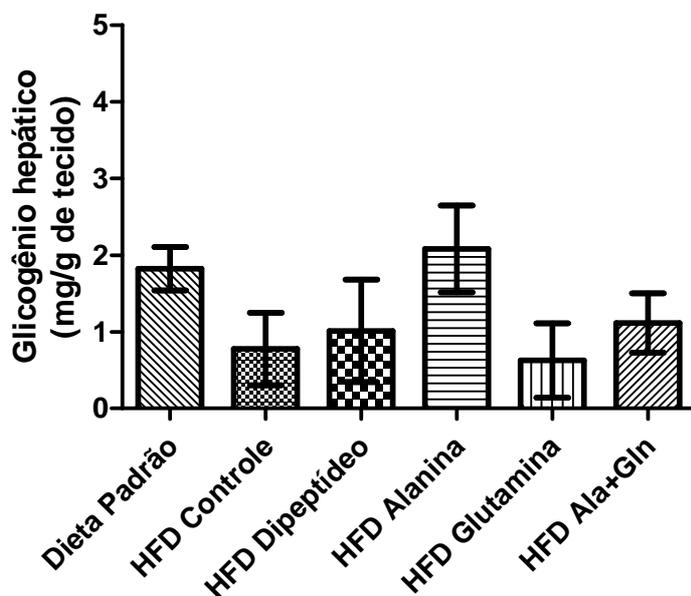


Figura 28: Glicogênio hepático de camundongos B6129SF2-J. Resultados em mg de glicogênio/grama de tecido, e expressos em média + epm, n= 5-7 por grupo. ANOVA de uma via, seguida por SNK. F=1,354. Não houve diferença estatística entre os grupos (p=0,2684).

5.1.20 Efeito da HFD e Suplementação de Aminoácidos na Expressão de HSP70 Hepática

Em relação à expressão de HSP70 hepática, quando comparados os grupos dieta padrão e HFD, observa-se que o grupo HFD apresenta maior expressão de HSP do que o grupo tratado com dieta padrão. Não foram observadas alterações nos animais recebendo HFD com suplementação de aminoácidos (figura 29).

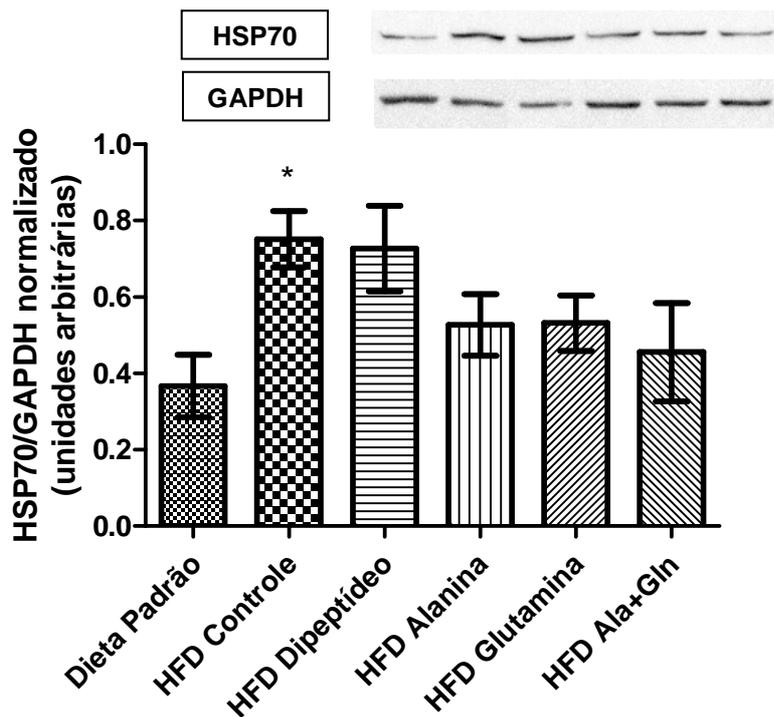


Figura 29: Imunodeteção de HSP70 no fígado de camundongos B6129SF2-J. Resultados expressos em média + epm, n= 6 por grupo. ANOVA de uma via, seguida por SNK. F=2,592. * representa valores significativos em relação ao grupo que recebeu dieta padrão (p=0,0373).

5.1.21 Efeito da HFD e Suplementação de Aminoácidos na Expressão de TLR4 Hepático

A expressão de TLR4 hepático não foi alterada nos animais recebendo HFD ou HFD com suplementação de aminoácidos (figura 30).

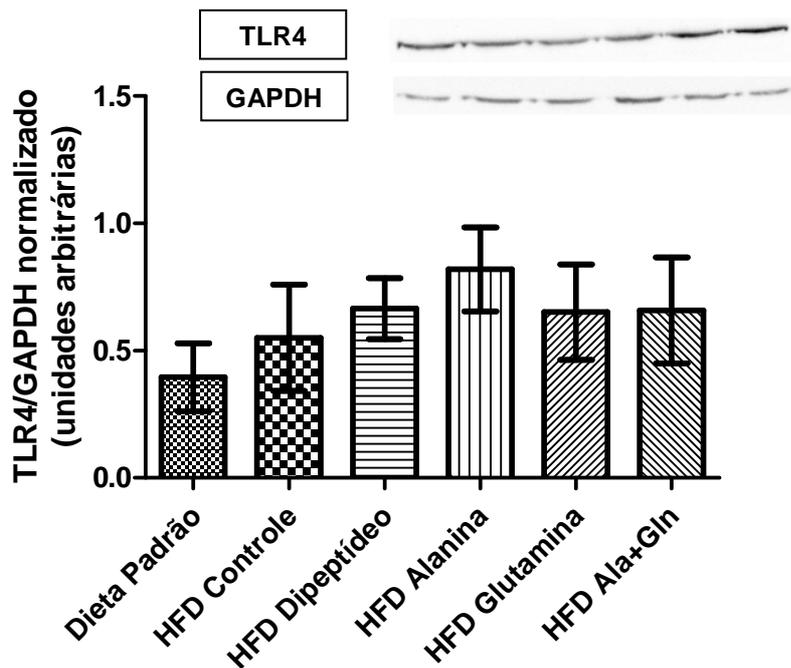


Figura 30: Imunodeteccção de TLR4 no fígado de camundongos B6129SF2-J. Resultados expressos em média + epm, n= 4 por grupo. ANOVA de uma via, seguida por SNK. F=0,6598. Não houve diferença estatística entre os grupos (p=0,6606).

5.1.22 Efeito da HFD e Suplementação de Aminoácidos na Expressão de Akt-P Hepática

A expressão de Akt-P hepática não foi alterada nos animais recebendo HFD ou HFD com suplementação de aminoácidos (figura 31).

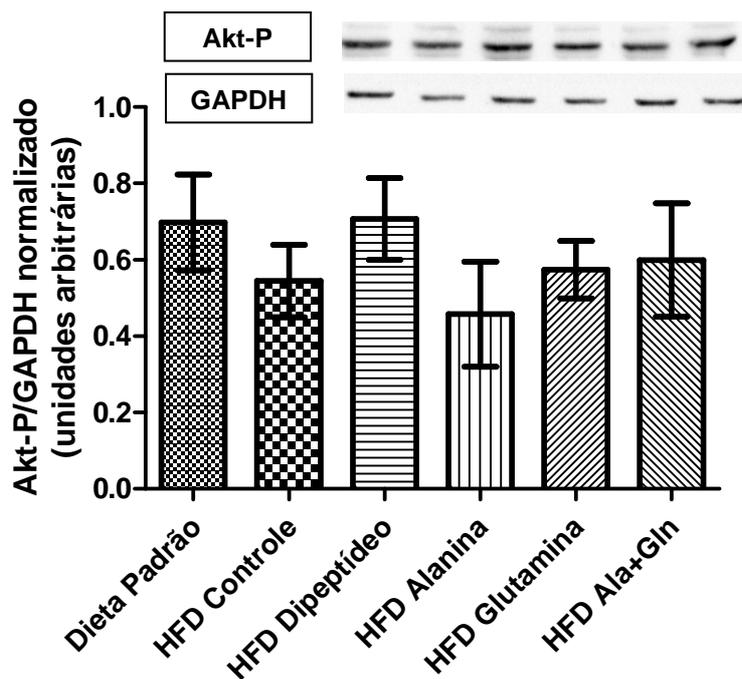


Figura 31: Imunodeteccção de Akt-P no fígado de camundongos B6129SF2-J. Resultados expressos em média + epm, n= 7 por grupo. ANOVA de uma via, seguida por SNK. F=0,6522. Não houve diferença estatística entre os grupos (p=0,6617).

5.1.23 Efeito da HFD e Suplementação de Aminoácidos na Expressão e Fosforilação de Receptor de Insulina Hepático

A expressão e fosforilação do receptor de insulina hepático não foi alterada nos animais recebendo HFD ou HFD com suplementação de aminoácidos (figura 32).

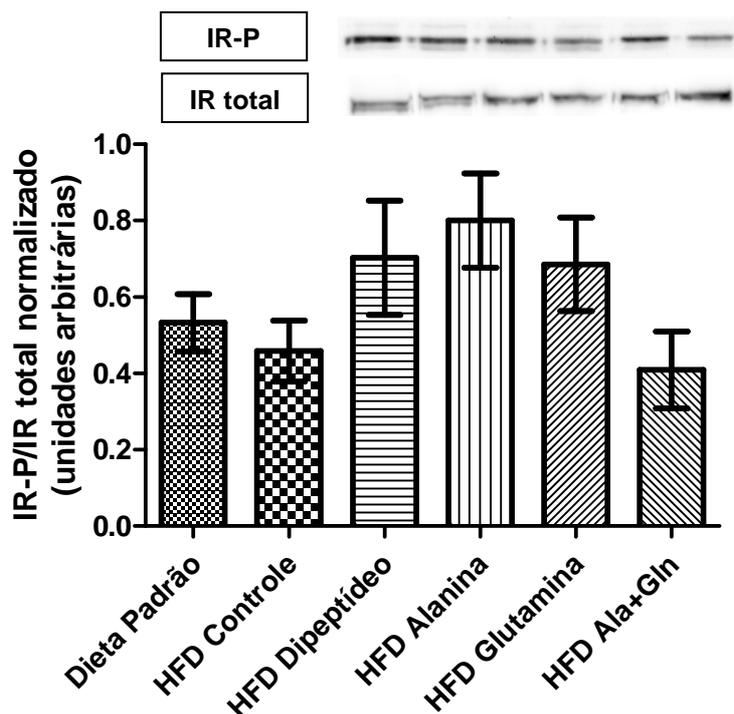


Figura 32: Imunodeteção de IR-P e IR total no fígado de camundongos B6129SF2-J. Resultados expressos em média + epm, n= 5 por grupo. ANOVA de uma via, seguida por SNK. F=1,908. Não houve diferença estatística entre os grupos ($p=0,1304$).

5.2 Resultados do Experimento 2

Foram analisados parâmetros de peso dos animais e tolerância à glicose mensalmente, por meio do teste de O-GTT, durante o período de administração da HFD. O consumo de ração dos animais foi avaliado semanalmente.

Após a morte dos animais, a gordura abdominal total foi pesada, e foram dosados os triglicerídeos e o colesterol plasmáticos.

5.2.1 Variação de Peso dos Animais

Para avaliar o efeito da HFD sobre o peso dos animais, o peso foi analisado mensalmente. Os resultados mostram que os animais que receberam HFD apresentam maior peso do que os animais que receberam dieta padrão em cada mês de tratamento. Também pode ser observado que os animais que receberam dieta padrão, mostraram aumento de peso somente até a 12^a semana, e os animais que receberam HFD continuaram ganhando peso até a 16^a semana (figura 33).

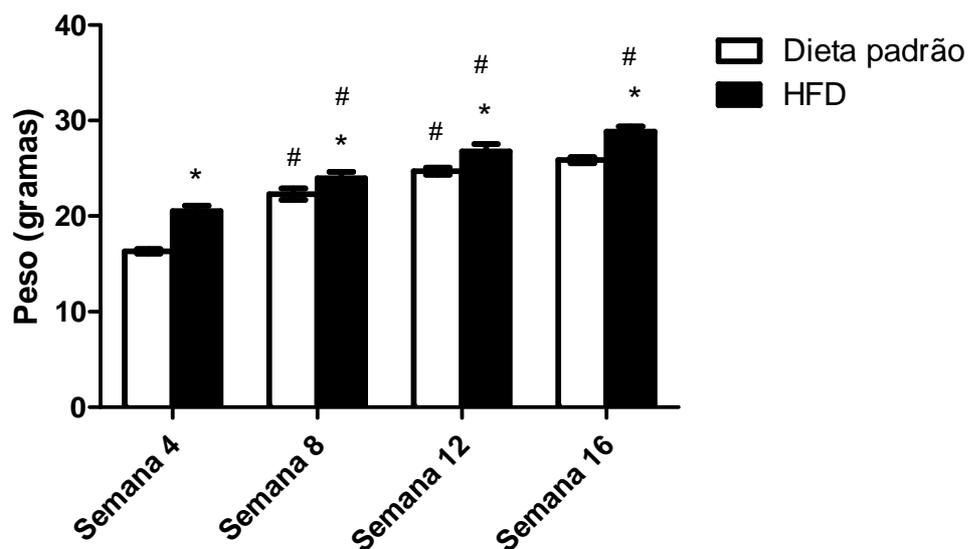
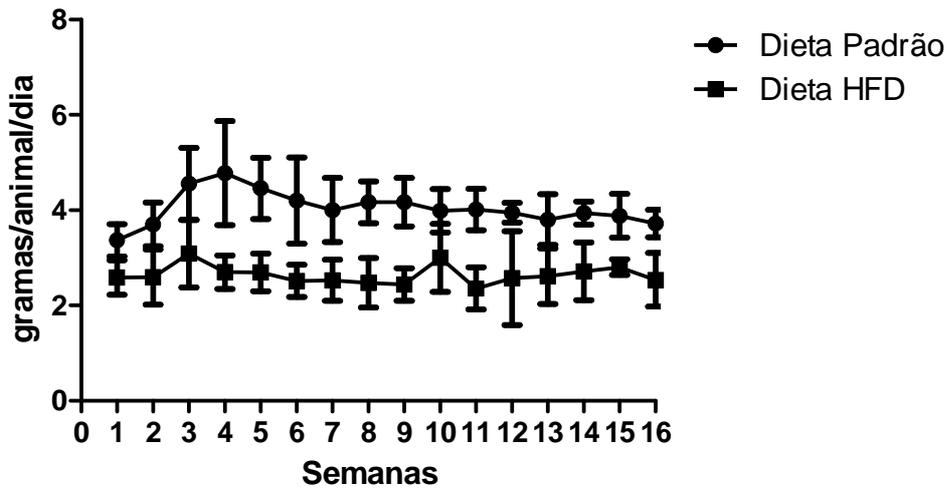


Figura 33: Peso dos animais C57BL/6J recebendo dieta padrão e HFD. Dados expressos em média + epm, n=10 por grupo. ANOVA de medidas repetidas. * representa valores significativos nos grupos HFD em relação à dieta padrão em cada mês, # representa valores significativos em relação à cada dieta no mês anterior ($P < 0,0001$).

5.2.2 Consumo de Ração Semanal

O consumo semanal de ração nos animais que receberam a HFD e a dieta padrão foi avaliado. Os resultados mostram que animais que receberam HFD consomem menor quantidade de ração por semana, e também menor conteúdo energético (figura 34a e 34b).

a)



b)

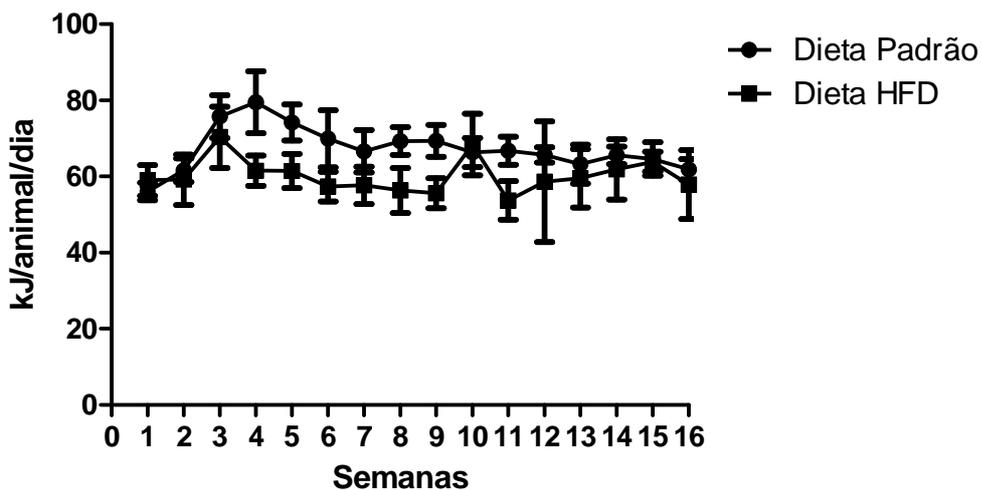


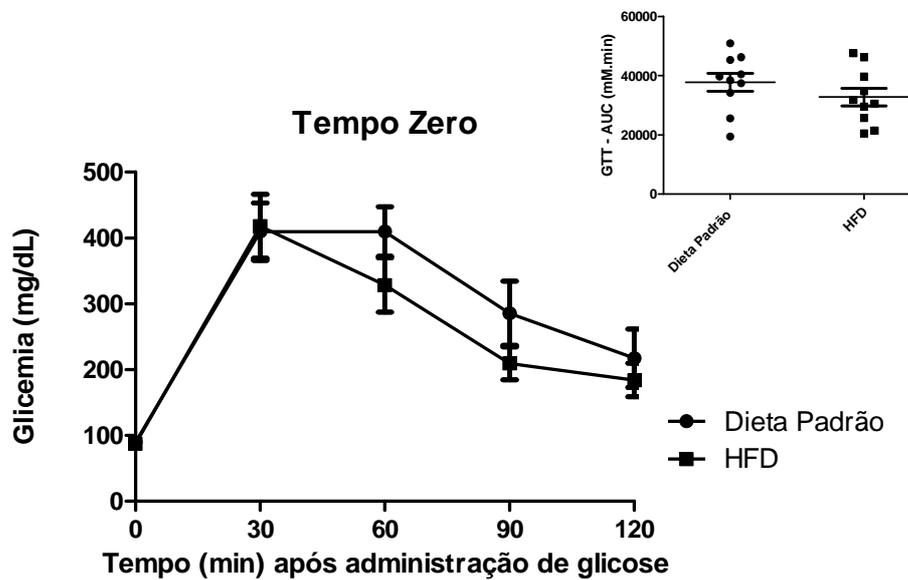
Figura 34: Consumo de ração dos animais C57BL/6J durante o período de administração de dieta padrão e HFD. Dados expressos em a) gramas por semana (gramas/animal/semana) e b) kJoules por semana (kJ/animal/semana) nos grupos experimentais Teste t pareado ($p < 0,0005$).

5.2.3 Teste de Tolerância à Glicose Oral

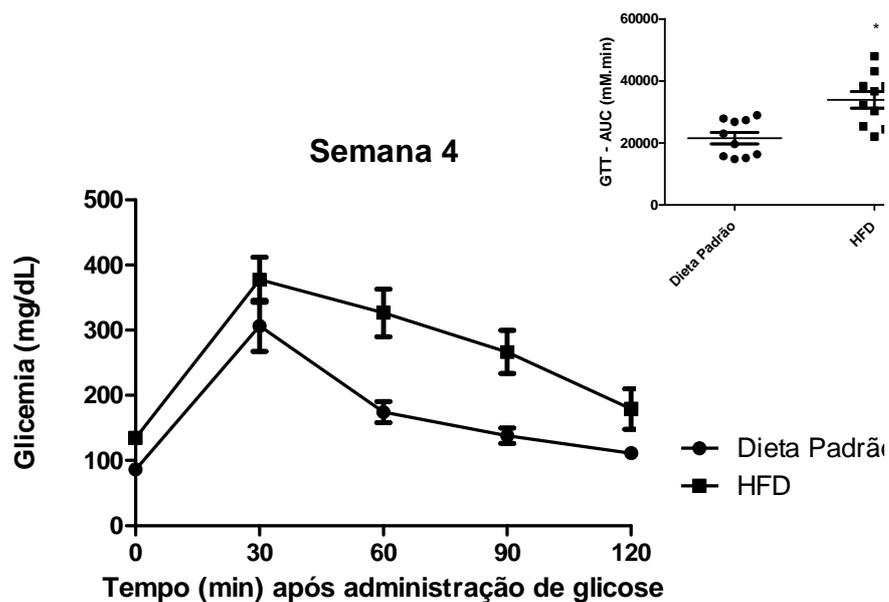
Para avaliarmos o efeito da HFD na resposta glicêmica frente a uma sobrecarga de glicose administrada oralmente, foi realizado o O-GTT mensalmente. Os resultados do tempo zero, momento do desmame dos animais, em que foi realizado o primeiro O-GTT, mostram que não há diferenças entre os animais na resposta glicêmica (figura 35 a). Ao final da

quarta, oitava e décima segunda semanas de tratamento, o O-GTT mostrou que os animais apresentavam diferenças na resposta glicêmica (figuras 35 b, 35 c e 35 d). Porém, os animais foram mantidos em dieta porque estas diferenças foram observadas na área sob a curva, mas não na resposta à glicose em 30 minutos, e nosso objetivo foi trabalhar com animais em pleno desenvolvimento da resistência à insulina, com respostas metabólicas alteradas desde os minutos após a administração de glicose, o que foi observado ao final da décima sexta semana de tratamento (figura 35 e).

a)



b)



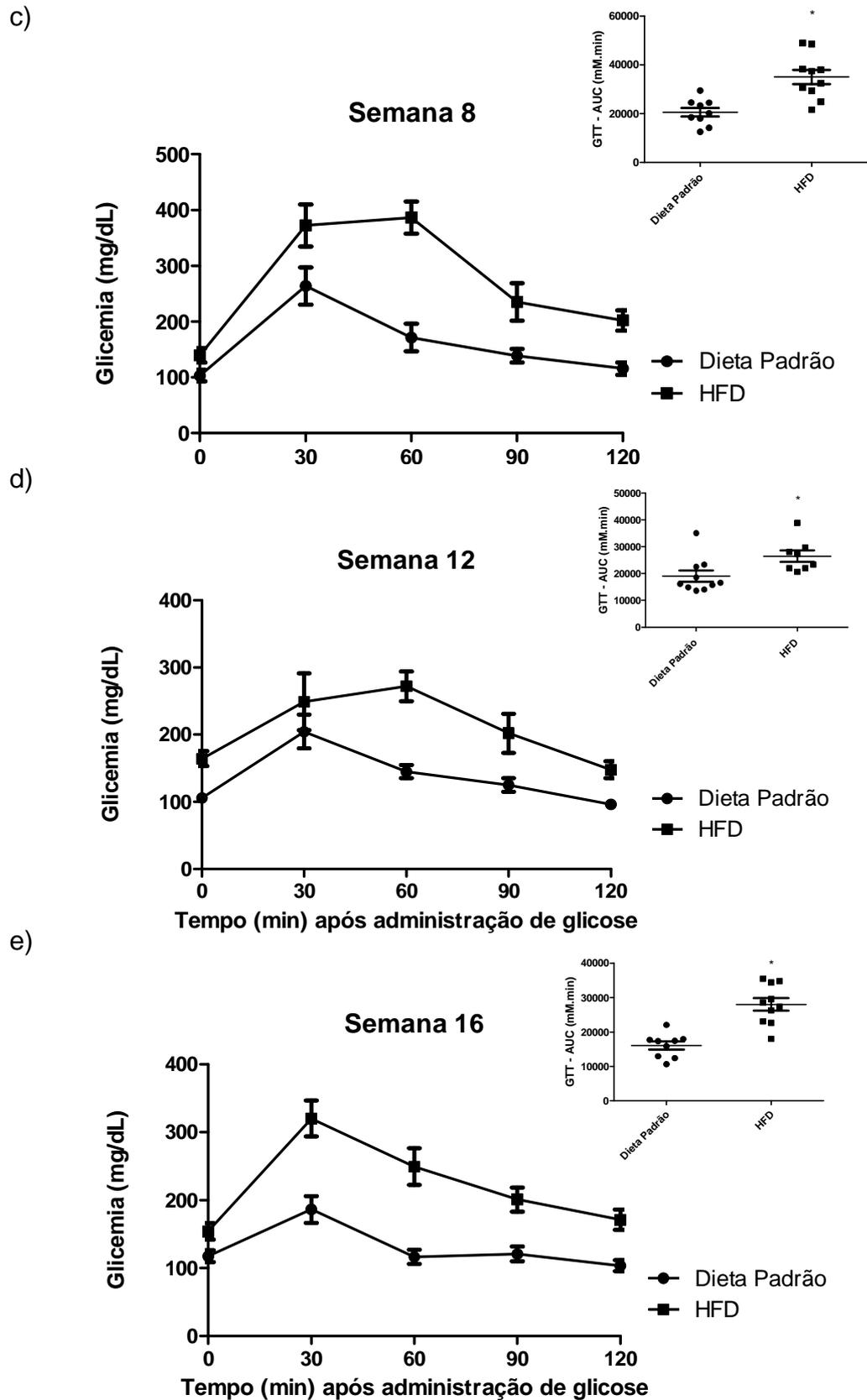


Figura 35: Teste oral de tolerância à glicose (C57BL/6J). a) Tempo zero $p=0,2516$. b) HFD 4 semanas $p=0,0014$ c) HFD 8 semanas $p=0,0007$ d) HFD 12 semanas $p=0,0243$ e) HFD 16 semanas $p<0,0001$. Parte superior, área sob a curva. Média + epm, $n=10$ por grupo. Teste T.

5.2.4 Gordura Abdominal Total

Após a morte dos animais, foi feita a obtenção cirúrgica da gordura abdominal total. O peso da gordura abdominal total está representado na figura 36. Os animais que receberam a HFD durante o período de tratamento mostraram aumento da gordura abdominal ($0,85 \pm 0,06$ g) de mais de 100% em relação aos animais que receberam a dieta padrão ($0,32 \pm 0,013$ g).

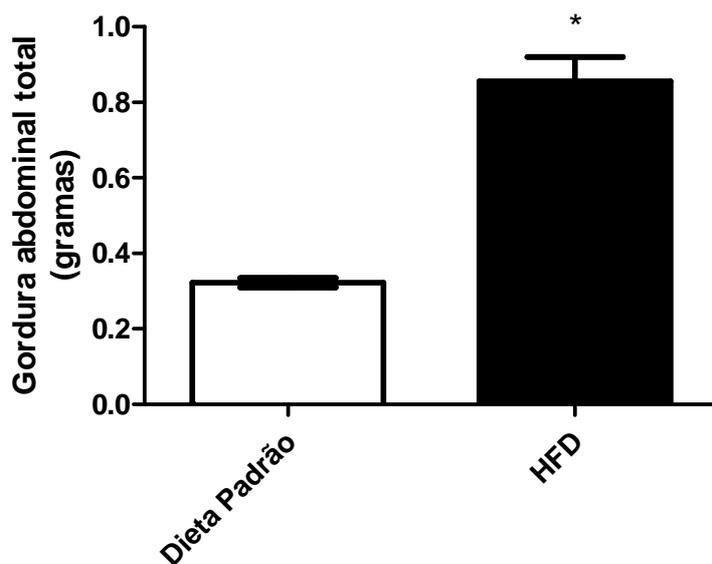


Figura 36: Peso da gordura abdominal total de camundongos C57BL/6J. Resultados expressos em média + epm, n= 10 por grupo. Teste T * representa valores significativos no grupo HFD em relação à dieta padrão ($p < 0,0001$).

5.2.5 Triglicerídeos Plasmáticos

Os valores de triglicerídeos plasmáticos não foram alterados nos animais recebendo HFD em relação ao grupo recebendo dieta padrão (figura 37).

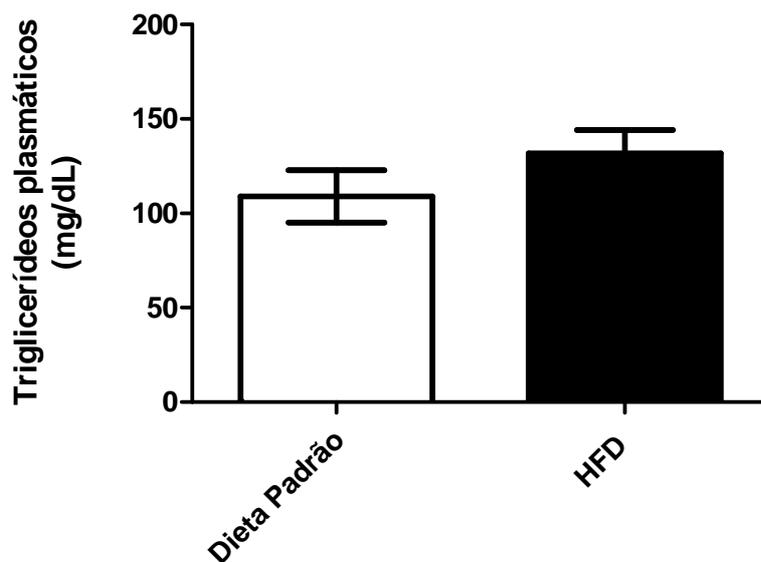


Figura 37: Triglicerídeos plasmáticos de camundongos C57BL/6J. Resultados expressos em média + epm, n= 10 por grupo. Teste T. $p=0,2403$.

5.2.6 Colesterol Total Plasmático

Os valores de colesterol total plasmático estão representados na figura 38. Os animais que receberam a HFD durante o período de tratamento mostraram aumento do colesterol total plasmático ($166,7 \pm 8,9$ mg/dL) em relação aos animais que receberam a dieta padrão ($83,9,0 \pm 6,4$ mg/dL).

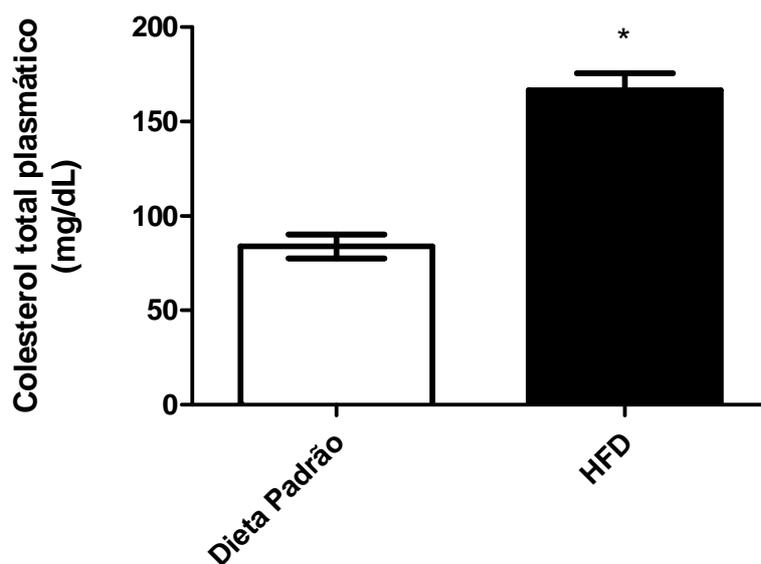


Figura 38: Colesterol total plasmático de camundongos C57BL/6J. Resultados expressos em média + epm, n= 8 por grupo. Teste T. * representa valores significativos no grupo HFD em relação à dieta padrão ($p < 0,0001$).

6. Discussão

Diversos estudos já demonstraram que as diferenças genéticas entre linhagens de camundongos podem ser mais importantes nas respostas relacionadas ao fenótipo metabólico, como o desenvolvimento de obesidade e diabetes, do que o aumento do aporte calórico fornecido por uma dieta hiperlipídica. A linhagem de camundongos C57BL/6J recebendo HFD durante 4 meses, por exemplo, mostra aumento de glicemia e insulinemia, porém camundongos da linhagem A/J recebendo a mesma dieta no mesmo período não apresentam alterações destes parâmetros (Surwit *et al.*, 1995). A linhagem C57BL/6J é considerada um bom modelo para a síndrome metabólica, uma vez que os animais desenvolvem obesidade, hiperinsulinemia e hiperglicemia quando alimentados com HFD (Collins *et al.*, 2004).

No presente estudo foram utilizados camundongos das linhagens B6129SF2-J e C57BL/6J, e os dados obtidos indicam divergências de variáveis metabólicas nas duas linhagens de camundongos em resposta à HFD. As duas linhagens mostraram aumento de peso, de gordura abdominal, e alterações de tolerância à glicose, porém as mudanças relacionadas à tolerância à glicose foram mais intensas nos animais C57BL/6J. Os animais B6129SF2-J, alimentados com HFD durante 7 meses, não mostraram alterações de tolerância à glicose em relação a animais de mesma idade alimentados com dieta padrão, porém ao final deste período de tratamento, mostraram aumento de peso, gordura abdominal total e glicemia de jejum, além de apresentarem resposta frente à insulina diferente dos animais que receberam a dieta padrão. Já os animais C57BL/6J, além de apresentarem todas estas alterações, também tiveram alterações de tolerância à glicose, mostrando-se intolerantes ao longo do período de 4 meses de HFD. A explicação para as diferenças observadas nestas linhagens encontra-se em suas características genéticas.

Os camundongos da linhagem C57BL/6J são um modelo clássico para o desenvolvimento de obesidade e diabetes induzido pela dieta, pois esta linhagem apresenta a deleção natural do gene para nicotinamida nucleotídeo transhidrogenase, apresentando ausência desta proteína, o que é associado com prejuízos na homeostase da glicose e redução na secreção de insulina.

Por sua vez, os camundongos da linhagem B6129SF2-J, são obtidos do cruzamento entre a prole (F1) de fêmeas C57BL/6J e machos 129S1/SvImJ, e os animais 129S1/SvImJ não apresentam aplicações de pesquisa nesta área (JAX, 2015). Quando analisadas cinco linhagens de camundongos, dentre elas C57BL/6 e 129X1/SvJ, estes últimos animais geneticamente similares aos 129S1/SvImJ utilizados na obtenção dos B6129SF2-J, com administração de HFD por 8 semanas, ao final do tratamento a glicemia de jejum e insulinemia aumenta mais nos animais C57BL/6 do que nos 129X1/SvJ (Montgomery *et al.*, 2013).

Estes achados corroboram os resultados encontrados no presente estudo, em que os animais C57BL/6J responderam de forma mais pronunciada à HFD que os animais B6129SF2-J, já que estes últimos possuem apenas parte do *background* genético de facilitação da resistência à insulina. Outro aspecto importante a ser citado, é que a HFD utilizada no presente trabalho foi baixa em frutose, e a literatura mostra que a resposta à HFD é mais pronunciada quando a HFD é administrada juntamente com altas concentrações de frutose (Peredo *et al.*, 2015).

É importante salientar que existem diferenças entre as linhagens de camundongos estudadas, mas em ambos se verifica o claro papel da HFD no desenvolvimento da resistência à insulina e obesidade.

Em relação ao consumo de ração, observa-se que os animais que recebem a dieta padrão ingerem maior quantidade da mesma, porém quando é realizado o ajuste do peso consumido em relação a capacidade de fornecimento de energia, observa-se que o valor energético ingerido pelos animais recebendo a dieta padrão não difere do valor energético ingerido pelos animais recebendo a HFD. Os camundongos B6129SF2-J recebendo a suplementação de aminoácidos tiveram redução de consumo da HFD.

Alterações do padrão de consumo alimentar frente à suplementação de aminoácidos podem variar, dependendo do aminoácido analisado, do tempo de suplementação e de sua dose. Observou-se em ratos que a suplementação de aminoácidos na dose de 3g/kg de peso corporal, durante duas semanas, mostrou respostas específicas que dependiam do aminoácido analisado. A suplementação de triptofano e lisina reduziu a ingesta alimentar, a mesma concentração de arginina aumentou a ingesta, enquanto a suplementação de

prolina e treonina não causaram alteração no padrão alimentar (Ayaso *et al.*, 2014). A fome e a saciedade são influenciadas por uma série de fatores fisiológicos, como a composição dos macronutrientes da dieta, que pode aumentar a liberação de hormônios como o peptídeo 1 similar ao glucagon (GLP-1), pertencente à classe de moléculas denominadas incretinas. Este possui propriedades fisiológicas que incluem o estímulo da secreção de insulina pelo pâncreas e o aumento da saciedade no cérebro, causando redução de apetite. O GLP-1 pode ser alterado em resposta a alguns aminoácidos e não a outros. Em ratos com diabetes induzida por estreptozotocina, a glutamina administrada por 8 semanas, na dose de 500 e 1000 mg/kg, foi capaz de aumentar GLP-1, além de reduzir a glicemia e prevenir a perda de peso (Badole *et al.*, 2013).

Sobre o ganho de peso, é importante salientar que ao final dos 7 meses de tratamento, os animais B6129SF2-J que receberam HFD apresentaram peso significativamente maior que os animais que receberam dieta padrão, porém a suplementação com dipeptídeo L-alanil-L-glutamina, glutamina, alanina ou alanina +glutamina não foi capaz de prevenir o ganho de peso relacionado à HFD.

A literatura relata que o aumento da quantidade de proteínas em uma HFD pode retardar o desenvolvimento da obesidade. Camundongos C57BL6, recebendo HFD por uma semana, suplementada com alanina ou leucina em quantidades similares às encontradas em uma dieta alta em proteínas, ganham menos peso do que os que não foram suplementados com os aminoácidos (Freudenberg, Petzke e Klaus, 2013).

Outro trabalho mostrou que camundongos C57BL/6 que receberam HFD mais glutamina ou alanina, a partir de 4 semanas de idade, na concentração de 2,87% do valor energético na dieta, mostraram redução do peso corporal em 16 semanas em comparação ao grupo HFD. Foi observado que a absorção de gordura foi igual, uma vez que a perda de gordura fecal não foi alterada, porém a glutamina reduziu a glicemia e a insulinemia. Em outro grupo que recebeu somente HFD por 4 meses, e após este período recebeu a dieta mais glutamina por mais dois meses, os animais recebendo glutamina pararam de ganhar peso, enquanto os animais recebendo somente HFD continuaram a ganhar peso (Opara *et al.*, 1996), resultado divergente ao encontrado em nosso

trabalho, que não mostrou alterações de ganho de peso com a suplementação de aminoácidos.

Como em nosso trabalho não foram observadas variações de ganho de peso em resposta aos aminoácidos estudados, podemos sugerir que, ou as doses estudadas para estes aminoácidos não são capazes de afetar este parâmetro, ou talvez a administração da HFD por um prazo longo como o estudado possa ter afetado a absorção intestinal, não somente dos aminoácidos, mas inclusive de outros nutrientes.

Aminoácidos da dieta são necessários para a manutenção da morfologia e função da mucosa intestinal, e podem inclusive regular a expressão de seus próprios transportadores, como o transportador de aminoácidos neutros dependente de sódio (SNAT-2), que funciona também como receptor de aminoácidos, e é reduzido pela suplementação com glutamina (Li *et al.*, 2015). Reforçando possíveis alterações de transporte de aminoácidos frente à HFD, observa-se que porcos alimentados com HFD mostram redução plasmática das concentrações de glutamina e alanina, e também redução de transportadores de aminoácidos no íleo, mas sem alterações nas concentrações musculares destes aminoácidos (Feng *et al.*, 2014).

Outro resultado importante foi observado em camundongos C57Bl6/J recebendo HFD por seis semanas. Estes animais apresentaram redução do cotransportador H⁺/peptídeo Slc15a1 (PEPT1), principal responsável pela absorção de dipeptídeos, porém apresentaram concentração maior de aminoácidos como a alanina na veia porta, mas sem aumento de glutamina (Do *et al.*, 2014). Em nosso trabalho foi realizada a suplementação com dipeptídeo L-alanil-L-glutamina, que, por apresentar maior solubilidade em água, poderia ter melhor absorção intestinal. Porém, mesmo com a suplementação deste dipeptídeo não observamos alterações nos parâmetros estudados. Assim, a redução no transportador PEPT1 poderia explicar este resultado negativo.

Corroborando a idéia de possível prejuízo na absorção de aminoácidos, nossos dados demonstram que não houve alteração na concentração de glutamina muscular após o período de suplementação, tanto da glutamina livre, associada à alanina ou na forma de dipeptídeo. Este resultado difere de um estudo que mostrou que a suplementação de glutamina + alanina ou dipeptídeo L-alanil-L-glutamina, nas mesmas doses de nosso trabalho, em ratos

submetidos a treinamento em esteira por 8 semanas, aumentou a glutamina muscular, tanto no músculo sóleo quanto no músculo gastrocnêmio (Petry *et al.*, 2014). Esta divergência de resultados pode ser devido ao uso de diferentes espécies, mas é possível que seja consequência de alterações nos parâmetros absorptivos, causadas pela HFD administrada a longo prazo.

Um aspecto que reforça a hipótese de que a absorção intestinal pode estar afetada nos animais estudados, é o fato de que no O-GTT os camundongos B6129SF2-J tratados com HFD apresentam um padrão de resposta frente à administração oral de glicose diferente dos animais que receberam dieta padrão. Os camundongos que receberam a dieta padrão mostram um pico clássico de aumento da glicemia no tempo de 30 minutos. Os animais recebendo HFD, sem ou com suplementação de aminoácidos, não mostram este pico. Quando a resposta glicêmica é avaliada por meio de IP-GTT, observa-se o pico em 30 minutos em todos os grupos estudados. O mesmo padrão de resposta diferencial frente a O-GTT e IP-GTT foi encontrado em um trabalho que avaliou ratos wistar que receberam HFD por 12 semanas (Jacob *et al.*, 2013).

Assim, podemos inferir que algo impede o aumento rápido da glicemia frente a uma sobrecarga oral de glicose nos animais alimentados com HFD. Esta alteração poderia estar relacionada com mudanças de permeabilidade intestinal, ou alterações em transportadores específicos.

Recentemente foi observado que camundongos Balb C57BL/6 recém desmamados que foram submetidos a HFD por dois meses, apresentaram menor captação de glicose pelo cotransportador de sódio e glicose (SGLT1), do que os animais que receberam dieta padrão. A análise proteômica da mucosa do intestino delgado dos animais, também mostrou redução da expressão desta proteína, bem como de GLUT-2, outro transportador de glicose e de Na,K ATPase. Juntas, estas reduções de expressão sugerem uma redução da absorção de glicose pelo intestino delgado (Wiśniewski *et al.*, 2015). Tal achado corrobora a diferença de resultados entre O-GTT e IP-GTT encontradas em nosso trabalho, sugerindo que os animais que receberam HFD apresentaram alterações de parâmetros de absorção intestinal de glicose.

Adicionalmente, ratos wistar recebendo HFD por 12 semanas apresentaram esteatohepatite não alcoólica, juntamente com alterações

morfológicas do epitélio jejunal, que apresentava organelas com disrupção e atrofia das microvilosidades. Esta disfunção da barreira intestinal pode acarretar prejuízos hepáticos relacionados a processos inflamatórios (Mao *et al.*, 2015).

Em relação a alterações do perfil lipídico plasmático, nossos resultados não mostram alterações nas concentrações de triglicerídeos plasmáticos, porém o colesterol total foi aumentado pela HFD, e os aminoácidos administrados não foram capazes de reverter este aumento.

Os dados disponíveis na literatura são contraditórios no que concerne aos efeitos das HFDs no perfil lipídico plasmático. Ratos Sprague-Dawley que receberam HFD por 6 semanas aumentaram triglicerídeos e colesterol total plasmáticos (Miao *et al.*, 2015), já camundongos Swiss de 6 semanas de idade que receberam HFD por 56 dias mostraram aumento de glicemia e colesterol total, mas não de triglicerídeos (Obici *et al.*, 2012). Em humanos, uma revisão sistemática com metanálise observou que o consumo de ácidos graxos saturados resulta em aumentos de LDL colesterol, em relação ao consumo de ácidos graxos insaturados (Sun *et al.*, 2015). Outra revisão sistemática de estudos em humanos, analisando trabalhos de acompanhamento de HFD por mais de 12 meses, observou que aumentos de triglicerídeos são relacionados com alta ingestão de carboidratos, não de HFD (Schwingshackl e Hoffmann, 2013).

As divergências nos resultados podem ser explicadas por múltiplos mecanismos. Dentre eles encontram-se as próprias diferenças genéticas existentes entre as espécies estudadas, uma vez que a resposta pode variar grandemente ao analisarmos diferentes espécies. Além disso, existe grande variação no tipo de HFD administrada, em que são observadas mudanças no tipo de lipídeo da HFD, algumas com altas concentrações de lipídeos saturados, enquanto outras apresentam lipídeos insaturados ou uma mistura de ambos, bem como variações no conteúdo de colesterol presente na dieta, além de proteínas e carboidratos de diferentes fontes.

Percebe-se a importância de avaliar-se a concentração de lipídeos administrados observando-se que ratos wistar que receberam HFD por 4 semanas com gordura saturada não mostraram aumento de colesterol total plasmático. É importante notar que o trabalho utilizou uma HFD contendo 20%

de lipídeos saturados, e a dieta administrada em nosso trabalho continha 58% do valor calórico em lipídeos saturados (Jurgoński, Juśkiewicz e Zduńczyk, 2014).

Um aspecto comumente negligenciado nos estudos com HFD, é que podem existir variações de respostas encontradas frente à HFD em virtude da utilização de dietas baixas em gordura com características muito diferentes da HFD em estudo. As dietas padrão comumente utilizadas para animais de laboratório normalmente são produzidas com uma variedade de bioprodutos de origem animal e vegetal, cada um contendo macronutrientes. Dietas semi-sintéticas, como muitas das HFD utilizadas, tem cada macronutriente suprido por apenas um ingrediente, o que pode gerar respostas metabólicas diferentes somente por isto. Este fato foi mostrado em um estudo utilizando camundongos C57BL/6J que receberam 3 dietas diferentes, uma padrão usual para animais de laboratório, com baixo teor de lipídeos, uma dieta padrão semi-sintética, também com baixo teor de lipídeos, e uma HFD semi-sintética, contendo 40% de lipídeos. O tratamento foi feito durante 11 semanas, e observou-se que o colesterol total aumentou na HFD, em relação às duas dietas baixas em gordura, mas triglicerídeos apresentaram-se mais elevados na dieta semi-sintética baixa em lipídeos que na HFD, sem diferenças entre a HFD e a dieta padrão baixa em lipídeos. Além disso, a dieta semi-sintética baixa em lipídeos não mostra diferença de ganho de peso em relação à HFD, e adiponectina e Il-6 aumentaram no HFD em relação à dieta padrão normal, mas não na baixa em lipídeos semi-sintética (Benoit *et al.*, 2013). Em nosso trabalho, podemos descartar estas divergências observadas quando a HFD é semi-sintética, pois utilizamos uma HFD baseada na ração normal de laboratório, com a adição dos demais nutrientes para ajustes da disponibilidade de lipídeos, proteínas, carboidratos e micronutrientes.

Outra importante observação, é que o desenvolvimento de resistência à insulina pode apresentar uma sequência temporal em diferentes órgãos e tecidos. Em resposta à HFD o fígado pode responder de maneira compensatória acumulando os lipídeos saturados exógenos e modulando a biossíntese endógena de lipídeos, como foi observado em um estudo utilizando ratos wistar que receberam HFD. No período de 30 dias houve aumento de triglicerídeos plasmáticos, mas após 90 e 180 dias houve redução neste

parâmetro, mostrando que o efeito hiperlipidêmico pode ser transitório (Zhukova, Novgorodtseva e Denisenko, 2014).

Um mecanismo bastante importante na regulação das concentrações plasmáticas de triglicerídeos é a atividade da lipoproteína lipase (LPL). A LPL é uma enzima sintetizada e secretada pelos adipócitos e músculos, e é transportada para o endotélio dos capilares, onde hidrolisa os triglicerídeos provenientes das lipoproteínas quilomícron e VLDL, gerando ácidos graxos e monoacilglicerol, que serão captados pelos tecidos. Um aumento do conteúdo de triglicerídeos hepáticos, causado por HFD, leva a um aumento de quilomícrons e VLDL, e sua subsequente secreção na circulação. Os triglicerídeos então sofrem lipólise pela LPL, para serem estocados no tecido adiposo (Voshol *et al.*, 2009).

Assim, a modulação da atividade da LPL, que pode ser relacionada com a administração de HFD, também pode estar relacionada com as divergências encontradas no perfil lipídico plasmático. Observando-se a função da LPL, a atividade desta enzima, particularmente no tecido adiposo, deve apresentar uma correlação direta com as concentrações de triglicerídeos plasmáticos, uma vez que quanto maior a atividade da mesma, maior a taxa de deposição lipídica, e menores as concentrações de triglicerídeos no plasma. Confirmando esta hipótese, observou-se que camundongos C57BL/6J tratados com HFD por 15 semanas que mostraram aumento de triglicerídeos plasmáticos, simultaneamente tiveram redução da atividade de LPL (Saravanan e Pari, 2015). Provavelmente tal redução ocorreu em decorrência de um aumento da resistência à insulina.

Por outro lado, camundongos Swiss com 8 semanas alimentados com HFD por mais 8 aumentaram LPL no tecido adiposo (Ferreira *et al.*, 2014), e camundongos C57BL/6J que receberam HFD por 4 meses apresentaram mais alta atividade de LPL no tecido adiposo do que os animais que receberam dieta padrão (Surwit *et al.*, 1995). Interessantemente, camundongos expressando LPL humana no tecido adiposo tem melhora em parâmetros de tolerância à insulina. Eles não apresentaram menores concentrações plasmáticas de triglicerídeos, mas apresentaram menor colesterol total quando alimentados com HFD. Isso sugere que, quando há depósito insuficiente de TG no tecido

adiposo, devido à baixa atividade de LPL, pode ocorrer aumento da resistência à insulina (Walton *et al.*, 2015).

Em nosso trabalho, como não foram observadas alterações de triglicerídeos plasmáticos, é possível que a HFD administrada aos animais tenha promovido um aumento da atividade da LPL no tecido adiposo, provavelmente no início e primeiros meses de dieta, devido a maior liberação de insulina, levando a um aumento dos depósitos, fato que realmente foi observado pelo incremento de peso da gordura abdominal, que foi observado na HFD em relação ao tratamento com dieta padrão. É possível que quando a resistência começou a se instalar, a LPL tenha sofrido prejuízos, por isto não foi possível a reversão pelo uso dos aminoácidos.

Sobre o aumento de colesterol total plasmático observado em nossos resultados, o mesmo pode ser explicado pelo fato de que os ácidos graxos saturados podem regular uma série de genes envolvidos no metabolismo de lipídeos e lipoproteínas no fígado. A ingestão de ácidos graxos saturados, contendo entre 12 e 16 carbonos, aumenta o colesterol plasmático, particularmente o LDL-colesterol, de uma maneira dose-dependente. Sugere-se que o mecanismo envolve a redução da captação de LDL pelo fígado, por menor expressão de receptores hepáticos de LDL, reduzindo assim a remoção hepática desta lipoproteína. Esta redução é mediada pela menor esterificação de colesterol intracelular relacionada a maiores concentrações de ácidos graxos saturados, o que leva ao aumento da quantidade de colesterol livre. Quando aumenta o colesterol livre intracelular, ocorre redução da maturação e expressão de proteína ligadora do elemento de resposta a esteróides (SREBP), do tipo 2, que é um fator de transcrição que regula a expressão de genes associados com o metabolismo de lipídeos e lipoproteínas. Esta proteína se liga ao elemento de resposta a esteróides aumentando a produção de receptores de LDL, quando ocorre redução da mesma, há uma redução da expressão dos receptores, reduzindo a captação hepática de LDL, e aumentando os valores plasmáticos do mesmo (Vallim e Salter, 2010).

A incapacidade da suplementação de aminoácidos reverter alterações de perfil lipídico causadas por HFD também foi observada em ratos Zucker de 4 semanas, que receberam HFD por 15 semanas, e durante mais 12 semanas receberam HFD mais suplementação de alanina ou arginina. Observou-se que

a HFD aumentou o colesterol total, mas não os triglicerídeos plasmáticos, e a suplementação com arginina ou alanina não foi capaz de reverter o aumento de colesterol total observado (Jobgen *et al.*, 2009).

É possível também que a HFD afete não apenas aspectos de absorção, mas também aspectos de metabolismo de aminoácidos. A ingestão de uma dieta inapropriada é associada com anormalidades metabólicas e funcionais em muitos tecidos, particularmente o fígado. Fígados isolados de ratos obesos por dieta de cafeteria iniciada no desmame e administrada por 14 semanas, mostraram redução de 41% da atividade da glutaminase, sugerindo uma limitação da capacidade máxima de metabolizar glutamina, assim, os fígados de ratos obesos podem não ser capazes de metabolizar o excesso de glutamina proveniente de suplementação, não permitindo que este aminoácido possa modificar parâmetros metabólicos alterados pela HFD (de Castro Ghizoni *et al.*, 2013).

Em relação à resposta molecular de sinalização da insulina, foram escolhidos para análise da sinalização da insulina os tecidos músculo e fígado, pois estes tecidos são bastante associados com a resistência à insulina frente a uma HFD. Existem poucos estudos analisando o efeito da suplementação de aminoácidos associada a HFD, dentre eles utilizando a suplementação com leucina, que melhora a sensibilidade à insulina em camundongos C57BL/6J recebendo HFD (Binder *et al.*, 2013).

Nossos resultados mostraram que não houveram alterações no músculo sóleo e no fígado em relação à expressão de Akt fosforilada, e também não houveram alterações na expressão e fosforilação do receptor de insulina, tanto na comparação entre os animais que receberam dieta padrão ou HFD, quanto nos animais que receberam suplementação de aminoácidos.

Resultados similares foram encontrados com a utilização de camundongos C57BL/6J recebendo HFD com 40% de lipídeos durante 11 semanas de tratamento. O estudo verificou que a fosforilação da Akt não foi alterada em situações basais, ou seja, sem estímulo de insulina. Foram observadas alterações relacionadas ao aumento de ativação de Akt apenas quando o músculo foi incubado com insulina (Benoit *et al.*, 2013). Corroborando estes resultados, ratos wistar que receberam HFD por 12 semanas, apresentaram fosforilação de Akt reduzida somente frente ao estímulo por

insulina. Os animais estudados não apresentaram diferenças em JNK e IKK no fígado (Jacob *et al.*, 2013).

Uma possível limitação de nosso estudo é o fato de que não foi analisada a resposta à insulina nos tecidos isolados (*ex vivo*), o que possibilitaria a avaliação de possíveis alterações da resposta molecular dos tecidos de animais que receberam HFD e suplementação de aminoácidos frente ao estímulo agudo de exposição à insulina. Além disso, a resposta de sinalização da insulina pode variar dependendo do tecido estudado.

Um estudo sugere que a glutamina poderia induzir resistência à insulina no tecido adiposo de ratos tratados com HFD, e assim melhorar a sinalização no fígado e músculo. Foram avaliados ratos wistar que receberam HFD por dois meses, juntamente com suplementação de alanina ou glutamina, na concentração de 4% na água de beber. Foi observado que a glutamina reduziu o acúmulo de gordura e o peso corporal. No tecido adiposo e no fígado não foram observadas diferenças na expressão e ativação do receptor de insulina e da Akt, em situações basais, apenas frente à estímulo com insulina. Nos ratos alimentados com HFD, o bloqueio da fosforilação do receptor de insulina e Akt, estimulada por insulina, tanto no fígado quanto no músculo, bem como a redução da captação de glicose, foi prevenido pelo tratamento com glutamina, mostrando um mecanismo de aumento da sensibilidade à insulina, diferente do que aconteceu no tecido adiposo (Prada *et al.*, 2007).

Apesar de não ter promovido alterações na sinalização da insulina, a glutamina poderia modular a secreção de insulina. Sabe-se que a L-glutamina e a L-alanina podem potencializar a secreção de insulina na presença de glicose, bem como modular a resposta ao choque térmico. Em cultura de células β pancreáticas BRIN-BD11, incubadas com mediadores inflamatórios derivados de macrófagos de pacientes obesos, o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina atenuou a redução da secreção de insulina mediada por citocinas pró-inflamatórias (Cruzat *et al.*, 2015). Como na situação de obesidade induzida por HFD podemos ter aumento de mediadores inflamatórios na circulação, a suplementação deste dipeptídeo em animais que recebem tal dieta, poderia impedir uma possível redução da secreção de insulina.

Sobre os efeitos da HFD na expressão de TLR4, também não foram observadas alterações no músculo sóleo e no fígado dos animais que receberam HFD e suplementação de aminoácidos.

O TLR4 é uma proteína transmembrana com um papel crítico na resposta inflamatória, e sua superexpressão pode contribuir com a resistência à insulina. Camundongos transgênicos superexpressando TLR4, quando alimentados com HFD por 16 semanas, mostram maiores prejuízos metabólicos que os controles, com maior ganho de peso e pior tolerância a glicose (McMillan *et al.*, 2015). Por outro lado, camundongos *knockout* para TLR4, especificamente no fígado, quando alimentados com HFD por 12 semanas, ficam obesos, mas tem atenuação da resistência à insulina e menor resposta inflamatória do que animais sem este bloqueio. Assim, esta evidência sugere um papel importante para a inflamação iniciada no hepatócito no desenvolvimento da resistência à insulina (Jia *et al.*, 2014).

Uma vez que no período de administração de HFD e aminoácidos, avaliado em nosso estudo, não foram observadas alterações de expressão do TLR, este fato pode estar relacionado à variações de resposta encontradas em diferentes tempos de administração de HFD. Em períodos curtos de administração de HFD podem não ser observadas diferenças de expressão de TLR4, como encontrado em um estudo que utilizou ratos Sprague-Dawley que receberam HFD rica em ácidos graxos saturados por 3 dias. Os animais desenvolveram resistência muscular à adiponectina, porém sem alterar a expressão de TLR4 e mediadores inflamatórios (Mullen *et al.*, 2010). O mesmo modelo animal, recebendo HFD por seis semanas, mostrou resistência a insulina e aumento de mediadores inflamatórios no fígado, bem como aumento da expressão de TLR4 e TLR2 (Raso *et al.*, 2014). Quando analisado um estudo que utilizou camundongos C57BL/6J recebendo HFD por 4, 8 e 16 semanas, observa-se que a expressão de TLR4 foi aumentada no fígado em 16 semanas (Sawada *et al.*, 2014).

Interessantemente, camundongos alimentados com HFD com alto conteúdo de frutose durante 4, 8 e 16 semanas, mostraram aumento de expressão de TLR4 hepático em 4 e 8 semanas, porém voltaram aos níveis dos animais controles em 16 semanas (Liu *et al.*, 2014). O aumento da expressão inicial observado neste trabalho, poderia refletir uma maior

exposição do fígado a ligandos destes receptores, como LPS, o que seria relacionado ao aumento de permeabilidade intestinal observada na HFD, bem como aos próprios ácidos graxos saturados fornecidos pela HFD, que também são ligandos de TLRs. Ou seja, pode existir um aumento transitório da expressão de TLR4 hepático, e o período de avaliação de nosso estudo pode ter sido em um momento em que a expressão hepática de TLR4 em resposta a HFD já estava normalizada, devido a um período de exposição prolongado.

Além disso, é importante que seja dada atenção à proporção de lipídeos saturados e insaturados utilizados nas avaliações experimentais, pois a utilização de camundongos C57BL/6J recebendo HFD contendo 24% de ácidos graxos saturados e 16% de ácidos graxos insaturados, não mostrou aumentos de TLR4 hepático (Enos, Velázquez e Murphy, 2014).

Outra proteína cuja expressão foi avaliada em nosso trabalho foi a HSP70. Esta proteína não foi alterada no músculo sóleo dos camundongos que receberam HFD e suplementação de aminoácidos. Entretanto, no fígado, foi observado um aumento de expressão de HSP70 nos animais que receberam HFD, em relação aos animais que receberam dieta padrão. A suplementação com aminoácidos não foi capaz de reverter este aumento.

A HSP72 pode ter um papel órgão-específico na modulação de processos metabólicos, ou mesmo pode apresentar diferenças em relação à espécie estudada. Diferentemente do encontrado em nossos resultados, ratos wistar que receberam HFD por 12 semanas, mostraram aumento de HSP70 no músculo sóleo, porém o fígado não foi avaliado neste trabalho (Marineli *et al.*, 2015).

Resultados similares foram encontrados em macacos Vervet que receberam HFD por 4 meses. Estes animais tiveram aumento de HSP70 muscular, neste período curto de avaliação, mas depois de 6 anos tiveram redução desta proteína. Quando realizada análise de regressão, observou-se que no período de 4 meses de dieta, quanto maior a glicemia, maiores os valores de HSP70 muscular, porém a longo prazo, após 6 anos de dieta, observaram-se efeitos opostos. Desta forma, a ingestão crônica de HFD, concomitantemente com o aumento da resistência à insulina, parece depletar a HSP70 muscular, precedida por uma fase compensatória observada enquanto ainda não há clara resistência à insulina. Isto indica que a resposta de HSP70 é

dinâmica, e pode depender da duração e severidade da resistência à insulina, em função da cronicidade do estresse metabólico (Kavanagh *et al.*, 2012).

Assim, preservar os níveis de HSP poderia prevenir a resistência à insulina no contexto de HFD, sendo sua superexpressão relacionada com a redução de marcadores inflamatórios induzidos por este tipo de dieta. Observou-se que camundongos superexpressando HSP72, que receberam HFD contendo 45% de lipídeos durante 10 semanas, não apresentaram ativação de JNK no músculo esquelético, apesar de terem aumentado o peso e a gordura corporal. A hiperglicemia e a hiperinsulinemia, bem como o prejuízo de fosforilação de Akt induzido por insulina, foram também prevenidas pelo aumento de HSP72 (Henstridge *et al.*, 2014).

Corroborando estes dados, observa-se também que a superexpressão de HSP72 no coração, de camundongos que receberam HFD contendo 43% de lipídeos por um período de 12 semanas, promoveu menor ganho de peso e de massa gorda do que os animais selvagens. Por outro lado, a deleção de HSP72 levou a disfunção mitocondrial, acúmulo de lipídios e resistência à insulina no coração (em C57). (Henstridge *et al.*, 2015).

Desta forma, o aumento de HSP70 observado no fígado em nosso trabalho, poderia ser transitório, uma vez que os animais não mostram resistência severa à insulina, pois não tem alterações de O-GTT e IP-GTT, mas mostram alterações de ITT. É possível que o momento em que estamos avaliando estes animais seja justamente a fase compensatória observada na literatura, em que temos um aumento de HSP70 como uma estratégia celular de defesa, na tentativa de minimizar possíveis danos causados por hiperglicemia e resistência à insulina. Possivelmente com a continuação da HFD o fígado não conseguiria manter elevados níveis desta proteína. Intervenções que levem a um aumento de HSP70 poderiam ser uma estratégia de tratamento da resistência à insulina.

Percebemos que, apesar do aumento de HSP70 observado pelo tratamento com a HFD, a suplementação de aminoácidos não fez com que os níveis voltassem a ser similares aos animais recebendo dieta padrão, mas também não potencializou o aumento de HSP70. A literatura mostra que a suplementação de glutamina + alanina, ou dipeptídeo L-alanil-L-glutamina, nas mesmas doses de nosso trabalho, por 21 dias, em ratos wistar treinados em

esteira aumentou a expressão de HSF-1, mas não de HSP70 no músculo, porém aumentou GSH hepático (Petry *et al.*, 2015).

Assim, podemos inferir que a suplementação destes aminoácidos poderia modular outros aspectos de proteção celular, não somente a expressão de HSP70. Apesar da glutamina poder potencializar a expressão desta proteína (Jang *et al.*, 2008; Hamiel *et al.*, 2009), estes resultados não foram observados no presente trabalho.

Considerando outros possíveis papéis protetores da suplementação, analisamos a lipoperoxidação hepática, por meio da análise de TBA-RS, e o conteúdo de glutathiona hepática. O conteúdo de glutathiona total e a lipoperoxidação, avaliada por TBA-RS, são parâmetros utilizados para a análise do estresse oxidativo nos tecidos. Em nosso modelo experimental, houve redução de TBA-RS frente à HFD, porém não foram observadas alterações com a suplementação de aminoácidos.

Em oposição aos resultados encontrados em nosso estudo, Lin e colaboradores observaram redução da glutathiona total hepática e aumento de TBA-RS em ratos Sprague-Dawley que receberam HFD por 8 e 12 semanas. A suplementação de glutamina 1g/kg/dia por meio de gavagem, ao longo de toda a dieta, reverteu estes parâmetros (Lin *et al.*, 2014). É possível que esta diferença encontrada esteja relacionada ao tipo de metodologia utilizada. Nossa técnica para avaliação de glutathiona total é cinético-enzimática, enquanto o referido estudo utilizou kit de ELISA. A metodologia de ELISA é mais sensível para detectar pequenas diferenças, que talvez não tenhamos conseguido mensurar. Outra possível explicação para esta diferença, é que em nosso trabalho a suplementação foi iniciada após os possíveis danos causados por administração de HFD estarem bem estabelecidos, enquanto o grupo mencionado utilizou a suplementação desde o início da HFD.

Poucos estudos analisam a suplementação de aminoácidos juntamente com HFD, particularmente a glutamina. A leucina foi outro aminoácido testado na literatura, e foi observado que ratos wistar que receberam HFD com concentrações moderadas de lipídeos por 12 semanas, e posteriormente concentrações mais altas em lipídeos por 4 semanas. Após este período, os animais receberam mais 8 semanas de suplementação com leucina 1,6% na

ração. Foi observada melhora na resistência a insulina, mas sem alterações de malondialdeído, medido por TBA-RS, ou de glutatona total (Tong *et al.*, 2014).

Embora tenham sido encontradas tais divergências na literatura, é importante citar que também foram encontrados dados similares em camundongos C57BL/6J. Quando estes animais receberam HFD contendo 24% de lipídeos saturados e 16% de lipídeos insaturados, não foi observado aumento de hidroxinonenal no fígado. Hidroxinonenal é um produto de lipoperoxidação, e é um parâmetro similar a TBA-RS. Foi observado um aumento neste composto quando a dieta administrada continha 12 % de lipídeos saturados e 28% de lipídeos insaturados, sugerindo que não há aumento de lipoperoxidação quando é administrada gordura saturada, uma vez que a gordura insaturada, por conter ligações duplas em seus ácidos graxos, é mais suscetível aos processos de lipoperoxidação (Enos, Velázquez e Murphy, 2014). Como em nosso trabalho foi utilizada uma HFD contendo alta proporção de lipídeos saturados, e não insaturados, o resultado encontrado, de não haver aumento de lipoperoxidação no fígado, vem de encontro à maior estabilidade deste tipo de lipídeo frente a processos de oxidação.

Por ora, os resultados obtidos e apresentados neste trabalho demonstram que a suplementação dos aminoácidos glutamina, alanina e do dipeptídeo L-glutamil-L-alanina não foram capazes de reverter parâmetros metabólicos alterados pela administração de longo prazo de HFD a camundongos da linhagem B6129SF2-J nas condições experimentais utilizadas. Porém, não se pode descartar a possibilidade de que diferentes doses ou tempos de tratamento com estes aminoácidos, ou mesmo a utilização de outro modelo animal, não poderia trazer resultados diversos dos encontrados. Sendo assim, é de suma importância a continuidade dos estudos utilizando a suplementação de aminoácidos como coadjuvantes no tratamento de obesidade.

Conclusão

Nossos resultados permitem concluir que:

- A administração de HFD, tanto no modelo que utilizou camundongos C57BL/6J, quanto no modelo que utilizou camundongos B6129SF2-J, alterou o peso e a quantidade de gordura abdominal, parâmetros metabólicos de sinalização da insulina, bem como o colesterol total plasmático;

- Nos camundongos B6129SF2-J, a suplementação dos aminoácidos glutamina, alanina, e do dipeptídeo alanil-glutamina em animais que receberam HFD não foi capaz de alterar o consumo de HFD e a quantidade de glicogênio hepático, nem de reverter parâmetros de peso e quantidade de gordura abdominal, resistência à insulina e colesterol total plasmático;

- Nos camundongos B6129SF2-J, a suplementação dos aminoácidos glutamina, alanina, e do dipeptídeo alanil-glutamina em animais que receberam HFD não foi capaz de alterar o conteúdo total de glutathione hepática, porém os animais que receberam HFD mostraram redução de TBA-Rs em relação aos animais que receberam dieta padrão, o que não foi revertido pelos aminoácidos utilizados;

- Nos músculos sóleos dos camundongos B6129SF2-J, a suplementação dos aminoácidos glutamina, alanina, e do dipeptídeo alanil-glutamina em animais que receberam HFD não foi capaz de alterar a expressão das proteínas HSP70, TLR4, receptor de insulina e Akt;

- Nos fígados dos camundongos B6129SF2-J, a suplementação dos aminoácidos glutamina, alanina, e do dipeptídeo alanil-glutamina em animais que receberam HFD não foi capaz de alterar a expressão das proteínas TLR4, receptor de insulina e Akt; porém os animais que receberam HFD mostraram aumentos de HSP70 em relação aos animais que receberam dieta padrão, o que não foi revertido pelos aminoácidos utilizados;

De forma sistematizada, a administração de HFD durante cinco meses aos camundongos B6129SF2-J possivelmente desencadeou alterações crônicas, que não puderam ser revertidas com as doses ou o tempo de suplementação dos aminoácidos.

Perspectivas

- Averiguar o mecanismo das possíveis alterações de absorção intestinal com o uso crônico de HFD no modelo de camundongos B6129SF2-J;
- Ampliar as investigações relativas à comparação dos modelos experimentais de camundongos B6129SF2-J e C57BL/6J tratados com HFD, na expressão de proteínas HSP70, TLR4, receptor de insulina e Akt;
- Investigar as alterações causadas pela HFD e suplementação dos aminoácidos no tecido adiposo;
- Avaliar o impacto da HFD e da suplementação dos aminoácidos na secreção de insulina e nas concentrações plasmáticas e teciduais de citocinas pró-inflamatórias.

Referências Bibliográficas

Agrawal, N. K.; Kant, S. Targeting inflammation in diabetes: Newer therapeutic options. **World J Diabetes**, v. 5, n. 5, p. 697-710, Oct 2014.

Ayaso, R. et al. Meal pattern of male rats maintained on amino acid supplemented diets: the effect of tryptophan, lysine, arginine, proline and threonine. **Nutrients**, v. 6, n. 7, p. 2509-22, Jul 2014.

Badole, S. L. et al. Oral L-glutamine increases active GLP-1 (7-36) amide secretion and improves glycemic control in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. **Chem Biol Interact**, v. 203, n. 2, p. 530-41, Apr 2013.

Badole, S. L. et al. L-glutamine supplementation prevents the development of experimental diabetic cardiomyopathy in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e92697, 2014.

Bargut, T. C.; Mandarim-de-Lacerda, C. A.; Aguilá, M. B. A high-fish-oil diet prevents adiposity and modulates white adipose tissue inflammation pathways in mice. **J Nutr Biochem**, [Epub ahead of print], May 2015.

Bellmann, K. et al. Heat shock protein hsp70 overexpression confers resistance against nitric oxide. **FEBS Lett**, v. 391, n. 1-2, p. 185-8, Aug 1996.

Bellmann, K. et al. Heat shock induces resistance in rat pancreatic islet cells against nitric oxide, oxygen radicals and streptozotocin toxicity in vitro. **J Clin Invest**, v. 95, n. 6, p. 2840-5, Jun 1995.

Benoit, B. et al. High-fat diet action on adiposity, inflammation, and insulin sensitivity depends on the control low-fat diet. **Nutr Res**, v. 33, n. 11, p. 952-60, Nov 2013.

Bernardis, L. L.; Patterson, B. D. Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **J Endocrinol**, v. 40, n. 4, p. 527-8, Apr 1968.

Binder, E. et al. Leucine supplementation protects from insulin resistance by regulating adiposity levels. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e74705, 2013.

Botos, I.; Segal, D. M.; Davies, D. R. The structural biology of Toll-like receptors. **Structure**, v. 19, n. 4, p. 447-59, Apr 2011.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, May 1976.

BRASIL. Presidência da República. Lei nº 11794, de 8 de outubro de 2008.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Resolução normativa nº 12, de 20 de setembro de 2013.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Resolução normativa nº 13, de 20 de setembro de 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel), 2013. <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/abril/30/Lancamento-Vigitel-28-04-ok.pdf>, 2013. Acesso em: 18 de Dezembro de 2014.

Brown, E. T. et al. Anesthesia can cause sustained hyperglycemia in C57/BL6J mice. **Vis Neurosci**, v. 22, n. 5, p. 615-8, 2005 Sep-Oct 2005.

Buege, J. A.; Aust, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymol**, v. 52, p. 302-10, 1978.

Burkart, V. et al. Natural resistance of human beta cells toward nitric oxide is mediated by heat shock protein 70. **J Biol Chem**, v. 275, n. 26, p. 19521-8, Jun 2000.

Chang, H. C.; Guarente, L. SIRT1 and other sirtuins in metabolism. **Trends Endocrinol Metab**, v. 25, n. 3, p. 138-45, Mar 2014.

Cheung, W. W.; Mao, P. Recent advances in obesity: genetics and beyond. **ISRN Endocrinol**, v. 2012, p. 536905, 2012.

Cho, L. W. Metabolic syndrome. **Singapore Med J**, v. 52, n. 11, p. 779-85, Nov 2011.

Cho, S. et al. Carvacrol prevents diet-induced obesity by modulating gene expressions involved in adipogenesis and inflammation in mice fed with high-fat diet. **J Nutr Biochem**, v. 23, n. 2, p. 192-201, Feb 2012.

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 2008.

Clerico, E. M. et al. How hsp70 molecular machines interact with their substrates to mediate diverse physiological functions. **J Mol Biol**, v. 427, n. 7, p. 1575-88, Apr 2015.

Collins, S. et al. Genetic vulnerability to diet-induced obesity in the C57BL/6J mouse: physiological and molecular characteristics. **Physiol Behav**, v. 81, n. 2, p. 243-8, Apr 2004.

Cooksey, R. C.; McClain, D. A. Increased hexosamine pathway flux and high fat feeding are not additive in inducing insulin resistance: evidence for a shared pathway. **Amino Acids**, v. 40, n. 3, p. 841-6, Mar 2011.

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.

Cuda, C. et al. Polymorphisms in Toll-like receptor 4 are associated with factors of the metabolic syndrome and modify the association between dietary saturated fat and fasting high-density lipoprotein cholesterol. **Metabolism**, v. 60, n. 8, p. 1131-5, Aug 2011.

Curi, R. et al. Molecular mechanisms of glutamine action. **J Cell Physiol**, v. 204, n. 2, p. 392-401, Aug 2005.

Cusi, K. Role of insulin resistance and lipotoxicity in non-alcoholic steatohepatitis. **Clin Liver Dis**, v. 13, n. 4, p. 545-63, Nov 2009.

Dai, T. et al. Heat shock protein 27 overexpression mitigates cytokine-induced islet apoptosis and streptozotocin-induced diabetes. **Endocrinology**, v. 150, n. 7, p. 3031-9, Jul 2009.

Dasu, M. R. et al. Increased toll-like receptor (TLR) activation and TLR ligands in recently diagnosed type 2 diabetic subjects. **Diabetes Care**, v. 33, n. 4, p. 861-8, Apr 2010.

Dasu, M. R.; Ramirez, S.; Isseroff, R. R. Toll-like receptors and diabetes: a therapeutic perspective. **Clin Sci (Lond)**, v. 122, n. 5, p. 203-14, Mar 2012.

de Castro Ghizoni, C. V. et al. Catabolism of amino acids in livers from cafeteria-fed rats. **Mol Cell Biochem**, v. 373, n. 1-2, p. 265-77, Jan 2013.

De Maio, A. Extracellular heat shock proteins, cellular export vesicles, and the Stress Observation System: a form of communication during injury, infection, and cell damage. It is never known how far a controversial finding will go! Dedicated to Ferruccio Ritossa. **Cell Stress Chaperones**, v. 16, n. 3, p. 235-49, May 2011.

Do, T. T. et al. Disturbed intestinal nitrogen homeostasis in a mouse model of high-fat diet-induced obesity and glucose intolerance. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 306, n. 6, p. E668-80, Mar 2014.

Enos, R. T.; Velázquez, K. T.; Murphy, E. A. Insight into the impact of dietary saturated fat on tissue-specific cellular processes underlying obesity-related diseases. **J Nutr Biochem**, v. 25, n. 6, p. 600-12, Jun 2014.

Fasshauer, M.; Blüher, M. Adipokines in health and disease. **Trends Pharmacol Sci**, [Epub ahead of print], May 2015.

Febbraio, M. A. et al. Glucose ingestion attenuates the exercise-induced increase in circulating heat shock protein 72 and heat shock protein 60 in humans. **Cell Stress Chaperones**, v. 9, n. 4, p. 390-6, 2004.

Feng, Z. et al. Both dietary supplementation with monosodium L-glutamate and fat modify circulating and tissue amino acid pools in growing pigs, but with little interactive effect. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e84533, 2014.

Ferrante, A. W. The immune cells in adipose tissue. **Diabetes Obes Metab**, v. 15 Suppl 3, p. 34-8, Sep 2013.

Ferreira, A. V. et al. Distinct metabolic pathways trigger adipocyte fat accumulation induced by high-carbohydrate and high-fat diets. **Nutrition**, v. 30, n. 10, p. 1138-43, Oct 2014.

Freudenberg, A.; Petzke, K. J.; Klaus, S. Dietary L-leucine and L-alanine supplementation have similar acute effects in the prevention of high-fat diet-induced obesity. **Amino Acids**, v. 44, n. 2, p. 519-28, Feb 2013.

Ghantous, C. M. et al. Differential Role of Leptin and Adiponectin in Cardiovascular System. **Int J Endocrinol**, v. 2015, p. 534320, 2015.

Goossens, G. H.; Blaak, E. E. Adipose tissue dysfunction and impaired metabolic health in human obesity: a matter of oxygen? **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 6, p. 55, 2015.

Grossie, V. B. et al. Glutamine stability in biological tissues evaluated by fluorometric analysis. **Clin Chem**, v. 39, n. 6, p. 1059-63, Jun 1993.

Gruden, G. et al. ANTI-HSP60 and ANTI-HSP70 antibody levels and micro/macrovascular complications in type 1 diabetes: the EURODIAB Study. **J Intern Med**, v. 266, n. 6, p. 527-36, Dec 2009.

Gupte, A. A. et al. Heat treatment improves glucose tolerance and prevents skeletal muscle insulin resistance in rats fed a high-fat diet. **Diabetes**, v. 58, n. 3, p. 567-78, Mar 2009.

Hameed, I. et al. Type 2 diabetes mellitus: From a metabolic disorder to an inflammatory condition. **World J Diabetes**, v. 6, n. 4, p. 598-612, May 2015.

Hamiel, C. R. et al. Glutamine enhances heat shock protein 70 expression via increased hexosamine biosynthetic pathway activity. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 297, n. 6, p. C1509-19, Dec 2009.

Hayden, M. S.; Ghosh, S. Regulation of NF- κ B by TNF family cytokines. **Semin Immunol**, v. 26, n. 3, p. 253-66, Jun 2014.

Heck, T. G.; Schöler, C. M.; de Bittencourt, P. I. HSP70 expression: does it a novel fatigue signalling factor from immune system to the brain? **Cell Biochem Funct**, v. 29, n. 3, p. 215-26, Apr 2011.

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.

Henstridge, D. C. et al. Genetic manipulation of cardiac Hsp72 levels does not alter substrate metabolism but reveals insights into high-fat feeding-induced cardiac insulin resistance. **Cell Stress Chaperones**, v. 20, n. 3, p. 461-72, May 2015.

Henstridge, D. C. et al. The relationship between heat shock protein 72 expression in skeletal muscle and insulin sensitivity is dependent on adiposity. **Metabolism**, v. 59, n. 11, p. 1556-61, Nov 2010.

Henstridge, D. C.; Whitham, M.; Febbraio, M. A. Chaperoning to the metabolic party: The emerging therapeutic role of heat-shock proteins in obesity and type 2 diabetes. **Mol Metab**, v. 3, n. 8, p. 781-93, Nov 2014.

Hooper, P. L. Insulin Signaling, GSK-3, Heat Shock Proteins and the Natural History of Type 2 Diabetes Mellitus: A Hypothesis. **Metab Syndr Relat Disord**, v. 5, n. 3, p. 220-30, Sep 2007.

Hooper, P. L. Inflammation, heat shock proteins, and type 2 diabetes. **Cell Stress Chaperones**, v. 14, n. 2, p. 113-5, Mar 2009.

Hooper, P. L.; Hooper, J. J. Loss of defense against stress: diabetes and heat shock proteins. **Diabetes Technol Ther**, v. 7, n. 1, p. 204-8, Feb 2005.

Hutton, M. J. et al. Role of the TLR signaling molecule TRIF in β -cell function and glucose homeostasis. **Islets**, v. 2, n. 2, p. 104-11, 2010 Mar-Apr 2010.

Jacob, P. S. et al. Isocaloric intake of a high-fat diet promotes insulin resistance and inflammation in Wistar rats. **Cell Biochem Funct**, v. 31, n. 3, p. 244-53, Apr 2013.

Jang, H. J. et al. Toll-like receptor 2 mediates high-fat diet-induced impairment of vasodilator actions of insulin. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 304, n. 10, p. E1077-88, May 2013.

Jang, H. J. et al. Glutamine induces heat-shock protein-70 and glutathione expression and attenuates ischemic damage in rat islets. **Transplant Proc**, v. 40, n. 8, p. 2581-4, Oct 2008.

JAX. The Jackson Laboratory. Mice database., <http://jaxmice.jax.org/strain/101045.html>, 2015. Acesso em: 11 de junho de 2015.

Jenstad, M.; Chaudhry, F. A. The Amino Acid Transporters of the Glutamate/GABA-Glutamine Cycle and Their Impact on Insulin and Glucagon Secretion. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 4, p. 199, 2013.

Jia, L. et al. Hepatocyte Toll-like receptor 4 regulates obesity-induced inflammation and insulin resistance. **Nat Commun**, v. 5, p. 3878, 2014.

Jiang, D. et al. Positive feedback regulation of proliferation in vascular smooth muscle cells stimulated by lipopolysaccharide is mediated through the TLR 4/Rac1/Akt pathway. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e92398, 2014.

Jin, C.; Flavell, R. A. Innate sensors of pathogen and stress: linking inflammation to obesity. **J Allergy Clin Immunol**, v. 132, n. 2, p. 287-94, Aug 2013.

Jobgen, W. et al. Dietary L-arginine supplementation reduces white fat gain and enhances skeletal muscle and brown fat masses in diet-induced obese rats. **J Nutr**, v. 139, n. 2, p. 230-7, Feb 2009.

Jordan, I. et al. Glutamine effects on heat shock protein 70 and interleukines 6 and 10: Randomized trial of glutamine supplementation versus standard parenteral nutrition in critically ill children. **Clin Nutr**, [Epub ahead of print] Feb 2015.

Jurgoński, A.; Juśkiewicz, J.; Zduńczyk, Z. A high-fat diet differentially affects the gut metabolism and blood lipids of rats depending on the type of dietary fat and carbohydrate. **Nutrients**, v. 6, n. 2, p. 616-26, 2014.

Kassi, E. et al. Metabolic syndrome: definitions and controversies. **BMC Med**, v. 9, p. 48, 2011.

Kaur, B.; Henry, J. Micronutrient status in type 2 diabetes: a review. **Adv Food Nutr Res**, v. 71, p. 55-100, 2014.

Kavanagh, K. et al. Restoring HSP70 deficiencies improves glucose tolerance in diabetic monkeys. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 300, n. 5, p. E894-901, May 2011.

Kavanagh, K. et al. Aging does not reduce heat shock protein 70 in the absence of chronic insulin resistance. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v. 67, n. 10, p. 1014-21, Oct 2012.

Kim, H. Glutamine as an immunonutrient. **Yonsei Med J**, v. 52, n. 6, p. 892-7, Nov 2011.

Kolberg, A. et al. Low expression of MRP1/GS-X pump ATPase in lymphocytes of Walker 256 tumour-bearing rats is associated with cyclopentenone prostaglandin accumulation and cancer immunodeficiency. **Cell Biochem Funct**, v. 24, n. 1, p. 23-39, 2006 Jan-Feb 2006.

Krause, M. et al. Elevated levels of extracellular heat-shock protein 72 (eHSP72) are positively correlated with insulin resistance in vivo and cause pancreatic β -cell dysfunction and death in vitro. **Clin Sci (Lond)**, v. 126, n. 10, p. 739-52, May 2014.

Kurabe, N. et al. The death effector domain-containing DEDD forms a complex with Akt and Hsp90, and supports their stability. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 391, n. 4, p. 1708-13, Jan 2010.

Kurucz, I. et al. Decreased expression of heat shock protein 72 in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes correlates with insulin resistance. **Diabetes**, v. 51, n. 4, p. 1102-9, Apr 2002.

Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-5, Aug 1970.

Lai, M.; Chandrasekera, P. C.; Barnard, N. D. You are what you eat, or are you? The challenges of translating high-fat-fed rodents to human obesity and diabetes. **Nutr Diabetes**, v. 4, p. e135, 2014.

Lai, Y. et al. Activation of NF κ B dependent apoptotic pathway in pancreatic islet cells by hypoxia. **Islets**, v. 1, n. 1, p. 19-25, 2009 Jul-Aug 2009.

Lambertucci, A. C. et al. Glutamine supplementation stimulates protein-synthetic and inhibits protein-degradative signaling pathways in skeletal muscle of diabetic rats. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e50390, 2012.

Lee, S. M. et al. Involvement of the TLR4 (Toll-like receptor4) signaling pathway in palmitate-induced INS-1 beta cell death. **Mol Cell Biochem**, v. 354, n. 1-2, p. 207-17, Aug 2011.

Li, G. et al. Characterization and Regulation of the Amino Acid Transporter SNAT2 in the Small Intestine of Piglets. **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. e0128207, 2015.

Li, H. et al. Free fatty acids induce endothelial dysfunction and activate protein kinase C and nuclear factor- κ B pathway in rat aorta. **Int J Cardiol**, v. 152, n. 2, p. 218-24, Oct 2011.

Liao, Y.; Hung, M. C. Physiological regulation of Akt activity and stability. **Am J Transl Res**, v. 2, n. 1, p. 19-42, 2010.

Lin, Z. et al. Effects of glutamine on oxidative stress and nuclear factor- κ B expression in the livers of rats with nonalcoholic fatty liver disease. **Exp Ther Med**, v. 7, n. 2, p. 365-370, Feb 2014.

Liu, J. et al. Toll-like receptor-4 signalling in the progression of non-alcoholic fatty liver disease induced by high-fat and high-fructose diet in mice. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 41, n. 7, p. 482-8, Jul 2014.

Lund, P. L-Glutamine and L-Glutamate: UV-Method with Glutaminase and Glutamate Dehydrogenase. Methods os Enzymatic Analysis. **In Methods of Enzymatic Analysis**. Verlagsgesellschaft: Weinheim, 1986.

Luo, L. et al. Rab8a interacts directly with PI3K γ to modulate TLR4-driven PI3K and mTOR signalling. **Nat Commun**, v. 5, p. 4407, 2014.

López-Jaramillo, P. et al. The role of leptin/adiponectin ratio in metabolic syndrome and diabetes. **Horm Mol Biol Clin Investig**, v. 18, n. 1, p. 37-45, Apr 2014.

Mansour, A. et al. Effect of glutamine supplementation on cardiovascular risk factors in patients with type 2 diabetes. **Nutrition**, v. 31, n. 1, p. 119-26, Jan 2015.

Mao, J. W. et al. Intestinal mucosal barrier dysfunction participates in the progress of nonalcoholic fatty liver disease. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 8, n. 4, p. 3648-58, 2015.

Marineli, R. a. S. et al. Chia (*Salvia hispanica* L.) enhances HSP, PGC-1 α expressions and improves glucose tolerance in diet-induced obese rats. **Nutrition**, v. 31, n. 5, p. 740-8, May 2015.

Martin, M. U.; Wesche, H. Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/interleukin-1 receptor family. **Biochim Biophys Acta**, v. 1592, n. 3, p. 265-80, Nov 2002.

Martins, A. R. et al. Mechanisms underlying skeletal muscle insulin resistance induced by fatty acids: importance of the mitochondrial function. **Lipids Health Dis**, v. 11, p. 30, 2012.

Martínez de Morentin, P. B. et al. Hypothalamic lipotoxicity and the metabolic syndrome. **Biochim Biophys Acta**, v. 1801, n. 3, p. 350-61, Mar 2010.

Mattoo, R. U.; Goloubinoff, P. Molecular chaperones are nanomachines that catalytically unfold misfolded and alternatively folded proteins. **Cell Mol Life Sci**, v. 71, n. 17, p. 3311-25, Sep 2014.

McCarty, M. F. Induction of heat shock proteins may combat insulin resistance. **Med Hypotheses**, v. 66, n. 3, p. 527-34, 2006.

McMillan, R. P. et al. Selective Overexpression of Toll-like Receptor 4 in Skeletal Muscle Impairs Metabolic Adaptation to High Fat Feeding. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, p. ajpregu.00139.2015, [Epub ahead of print] Jun 2015.

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 2010.

Miao, H. et al. Plasma lipidomics reveal profound perturbation of glycerophospholipids, fatty acids, and sphingolipids in diet-induced hyperlipidemia. **Chem Biol Interact**, v. 228, p. 79-87, Feb 2015.

Mokhtari, D. et al. Increased Hsp70 expression attenuates cytokine-induced cell death in islets of Langerhans from Shb knockout mice. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 387, n. 3, p. 553-7, Sep 2009.

Montgomery, M. K. et al. Mouse strain-dependent variation in obesity and glucose homeostasis in response to high-fat feeding. **Diabetologia**, v. 56, n. 5, p. 1129-39, May 2013.

Moreno-Indias, I.; Tinahones, F. J. Impaired adipose tissue expandability and lipogenic capacities as ones of the main causes of metabolic disorders. **J Diabetes Res**, v. 2015, p. 970375, 2015.

Mullen, K. L. et al. Skeletal muscle inflammation is not responsible for the rapid impairment in adiponectin response with high-fat feeding in rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 299, n. 2, p. R500-8, Aug 2010.

Nadal-Casellas, A. et al. Sex-dependent differences in rat hepatic lipid accumulation and insulin sensitivity in response to diet-induced obesity. **Biochem Cell Biol**, v. 90, n. 2, p. 164-72, Apr 2012.

Nakhjavani, M. et al. Increased serum HSP70 levels are associated with the duration of diabetes. **Cell Stress Chaperones**, v. 15, n. 6, p. 959-64, Nov 2010.

Newsholme, P. et al. Amino acids and diabetes: implications for endocrine, metabolic and immune function. **Front Biosci (Landmark Ed)**, v. 16, p. 315-39, 2011.

Newsholme, P.; de Bittencourt, P. I. 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.

Niforou, K.; Cheimonidou, C.; Trougakos, I. P. Molecular chaperones and proteostasis regulation during redox imbalance. **Redox Biol**, v. 2, p. 323-32, 2014.

Obici, S. et al. Time sequence of the intensification of the liver glucose production induced by high-fat diet in mice. **Cell Biochem Funct**, v. 30, n. 4, p. 335-9, Jun 2012.

Oglesbee, M. J. et al. Diabetic ketoacidosis increases extracellular levels of the major inducible 70-kDa heat shock protein. **Clin Biochem**, v. 38, n. 10, p. 900-4, Oct 2005.

Oller do Nascimento, C. M.; Ribeiro, E. B.; Oyama, L. M. Metabolism and secretory function of white adipose tissue: effect of dietary fat. **An Acad Bras Cienc**, v. 81, n. 3, p. 453-66, Sep 2009.

Opara, E. C. et al. L-glutamine supplementation of a high fat diet reduces body weight and attenuates hyperglycemia and hyperinsulinemia in C57BL/6J mice. **J Nutr**, v. 126, n. 1, p. 273-9, Jan 1996.

Patel, S.; Santani, D. Role of NF-kappa B in the pathogenesis of diabetes and its associated complications. **Pharmacol Rep**, v. 61, n. 4, p. 595-603, 2009 Jul-Aug 2009.

Peredo, H. A. et al. A high-fat plus fructose diet produces a vascular prostanoid alterations in the rat. **Auton Autacoid Pharmacol**, v. 34, n. 3-4, p. 35-40, Apr 2015.

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 2014.

Petry, É. 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.

Pierre, J. F. et al. Pharmaconutrition review: physiological mechanisms. **JPEN J Parenter Enteral Nutr**, v. 37, n. 5 Suppl, p. 51S-65S, Sep 2013.

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.

Rahati, S. et al. Food pattern, lifestyle and diabetes mellitus. **Int J High Risk Behav Addict**, v. 3, n. 1, p. e8725, Mar 2014.

Raso, G. M. et al. Effects of a *Lactobacillus paracasei* B21060 based synbiotic on steatosis, insulin signaling and toll-like receptor expression in rats fed a high-fat diet. **J Nutr Biochem**, v. 25, n. 1, p. 81-90, Jan 2014.

Rayasam, G. V. et al. Glycogen synthase kinase 3: more than a namesake. **Br J Pharmacol**, v. 156, n. 6, p. 885-98, Mar 2009.

Rodrigues-Krause, J. et al. Divergence of intracellular and extracellular HSP72 in type 2 diabetes: does fat matter? **Cell Stress Chaperones**, v. 17, n. 3, p. 293-302, May 2012.

Rong, X. et al. An adipose tissue-independent insulin-sensitizing action of telmisartan: a study in lipodystrophic mice. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 331, n. 3, p. 1096-1103, Dec 2009.

Ruell, P. A. et al. Effect of temperature and duration of hyperthermia on HSP72 induction in rat tissues. **Mol Cell Biochem**, v. 267, n. 1-2, p. 187-94, Dec 2004.

Sahini, N.; Borlak, J. Recent insights into the molecular pathophysiology of lipid droplet formation in hepatocytes. **Prog Lipid Res**, v. 54, p. 86-112, Apr 2014.

Salem, H. H. et al. Long-term IKK2/NF- κ B signaling in pancreatic β -cells induces immune-mediated diabetes. **Diabetes**, v. 63, n. 3, p. 960-75, Mar 2014.

Samocha-Bonet, D. et al. Glutamine reduces postprandial glycemia and augments the glucagon-like peptide-1 response in type 2 diabetes patients. **J Nutr**, v. 141, n. 7, p. 1233-8, Jul 2011.

Saponaro, C.; Gaggini, M.; Gastaldelli, A. Nonalcoholic fatty liver disease and type 2 diabetes: common pathophysiologic mechanisms. **Curr Diab Rep**, v. 15, n. 6, p. 607, Jun 2015.

Saravanan, S.; Pari, L. Role of thymol on hyperglycemia and hyperlipidemia in high fat diet-induced type 2 diabetic C57BL/6J mice. **Eur J Pharmacol**, v. 761, p. 279-287, May 2015.

Sawada, K. et al. Augmented hepatic Toll-like receptors by fatty acids trigger the pro-inflammatory state of non-alcoholic fatty liver disease in mice. **Hepatology Res**, v. 44, n. 8, p. 920-34, Aug 2014.

Scarim, A. L.; Heitmeier, M. R.; Corbett, J. A. Heat shock inhibits cytokine-induced nitric oxide synthase expression by rat and human islets. **Endocrinology**, v. 139, n. 12, p. 5050-7, Dec 1998.

Schwab, U. et al. Effect of the amount and type of dietary fat on cardiometabolic risk factors and risk of developing type 2 diabetes, cardiovascular diseases, and cancer: a systematic review. **Food Nutr Res**, v. 58, 2014.

Schwab, U.; Uusitupa, M. Diet heart controversies - Quality of fat matters. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, [Epub ahead of print] Mar 2015.

Schwingshackl, L.; Hoffmann, G. Comparison of effects of long-term low-fat vs high-fat diets on blood lipid levels in overweight or obese patients: a systematic review and meta-analysis. **J Acad Nutr Diet**, v. 113, n. 12, p. 1640-61, Dec 2013.

Schwingshackl, L.; Hoffmann, G. Comparison of the long-term effects of high-fat v. low-fat diet consumption on cardiometabolic risk factors in subjects with

abnormal glucose metabolism: a systematic review and meta-analysis. **Br J Nutr**, v. 111, n. 12, p. 2047-58, Jun 2014.

Sloane, J. A. et al. A clear and present danger: endogenous ligands of Toll-like receptors. **Neuromolecular Med**, v. 12, n. 2, p. 149-63, Jun 2010.

Sodhi, C. P. et al. Toll-like receptor-4 inhibits enterocyte proliferation via impaired beta-catenin signaling in necrotizing enterocolitis. **Gastroenterology**, v. 138, n. 1, p. 185-96, Jan 2010.

Soeters, P. B.; Grecu, I. Have we enough glutamine and how does it work? A clinician's view. **Ann Nutr Metab**, v. 60, n. 1, p. 17-26, 2012.

Sun, Y. et al. Palm Oil Consumption Increases LDL Cholesterol Compared With Vegetable Oils Low in Saturated Fat in a Meta-Analysis of Clinical Trials. **J Nutr**, May 2015.

Surwit, R. S. et al. Differential effects of fat and sucrose on the development of obesity and diabetes in C57BL/6J and A/J mice. **Metabolism**, v. 44, n. 5, p. 645-51, May 1995.

Symons, J. D.; Abel, E. D. Lipotoxicity contributes to endothelial dysfunction: a focus on the contribution from ceramide. **Rev Endocr Metab Disord**, v. 14, n. 1, p. 59-68, Mar 2013.

Takeda, K.; Akira, S. TLR signaling pathways. **Semin Immunol**, v. 16, n. 1, p. 3-9, Feb 2004.

Takeda, T. et al. Heat shock restores insulin secretion after injury by nitric oxide by maintaining glucokinase activity in rat islets. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 284, n. 1, p. 20-5, Jun 2001.

Tchkonia, T. et al. Fat tissue, aging, and cellular senescence. **Aging Cell**, v. 9, n. 5, p. 667-84, Oct 2010.

Teng, K. T. et al. Modulation of obesity-induced inflammation by dietary fats: mechanisms and clinical evidence. **Nutr J**, v. 13, p. 12, 2014.

Teodoro-Morrison, T. et al. GRP78 overproduction in pancreatic beta cells protects against high-fat-diet-induced diabetes in mice. **Diabetologia**, v. 56, n. 5, p. 1057-67, May 2013.

Tong, X. et al. Effects of whey protein and leucine supplementation on insulin resistance in non-obese insulin-resistant model rats. **Nutrition**, v. 30, n. 9, p. 1076-80, Sep 2014.

Trauner, M.; Arrese, M.; Wagner, M. Fatty liver and lipotoxicity. **Biochim Biophys Acta**, v. 1801, n. 3, p. 299-310, Mar 2010.

Tsai, P. H. et al. Effects of glutamine supplementation on oxidative stress-related gene expression and antioxidant properties in rats with streptozotocin-induced type 2 diabetes. **Br J Nutr**, v. 107, n. 8, p. 1112-8, Apr 2012.

Tsai, P. H. et al. Effects of dietary glutamine on inflammatory mediator gene expressions in rats with streptozotocin-induced diabetes. **Nutrition**, v. 28, n. 3, p. 288-93, Mar 2012.

Tsukumo, D. M. et al. Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. **Diabetes**, v. 56, n. 8, p. 1986-98, Aug 2007.

Tytell, M.; Hooper, P. L. Heat shock proteins: new keys to the development of cytoprotective therapies. **Expert Opin Ther Targets**, v. 5, n. 2, p. 267-87, Apr 2001.

Vallim, T.; Salter, A. M. Regulation of hepatic gene expression by saturated fatty acids. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 82, n. 4-6, p. 211-8, 2010 Apr-Jun 2010.

Van Handel, E. Estimation of glycogen in small amounts of tissue. **Anal Biochem**, v. 11, n. 2, p. 256-65, May 1965.

van Herpen, N. A.; Schrauwen-Hinderling, V. B. Lipid accumulation in non-adipose tissue and lipotoxicity. **Physiol Behav**, v. 94, n. 2, p. 231-41, May 2008.

Velichko, A. K. et al. Mechanisms of heat shock response in mammals. **Cell Mol Life Sci**, v. 70, n. 22, p. 4229-41, Nov 2013.

Venojärvi, M. et al. Skeletal muscle HSP expression in response to immobilization and remobilization. **Int J Sports Med**, v. 28, n. 4, p. 281-6, Apr 2007.

Voshol, P. J. et al. Effect of plasma triglyceride metabolism on lipid storage in adipose tissue: studies using genetically engineered mouse models. **Biochim Biophys Acta**, v. 1791, n. 6, p. 479-85, Jun 2009.

Wachlin, G. et al. Stress response of pancreatic islets from diabetes prone BB rats of different age. **Autoimmunity**, v. 35, n. 6, p. 389-95, Sep 2002.

Wajchenberg, B. L. et al. Adipose tissue at the crossroads in the development of the metabolic syndrome, inflammation and atherosclerosis. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 53, n. 2, p. 145-50, Mar 2009.

Walton, R. G. et al. Increasing Adipocyte Lipoprotein Lipase Improves Glucose Metabolism in High Fat Diet-induced Obesity. **J Biol Chem**, v. 290, n. 18, p. 11547-56, May 2015.

Watanabe, Y.; Nagai, Y.; Takatsu, K. Activation and regulation of the pattern recognition receptors in obesity-induced adipose tissue inflammation and insulin resistance. **Nutrients**, v. 5, n. 9, p. 3757-78, Sep 2013.

Wende, A. R.; Symons, J. D.; Abel, E. D. Mechanisms of lipotoxicity in the cardiovascular system. **Curr Hypertens Rep**, v. 14, n. 6, p. 517-31, Dec 2012.

WHO. World Health Organization. Obesity and Overweight. **Fact Sheet N° 311**, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>, 2015. Acesso em: 26 de maio de 2015.

Winzell, M. S.; Ahrén, B. The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 53 Suppl 3, p. S215-9, Dec 2004.

Wiśniewski, J. R. et al. The impact of high-fat diet on metabolism and immune defense in small intestine mucosa. **J Proteome Res**, v. 14, n. 1, p. 353-65, Jan 2015.

Xu, F. et al. Metabolic signature shift in type 2 diabetes mellitus revealed by mass spectrometry-based metabolomics. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 98, n. 6, p. E1060-5, Jun 2013.

Xue, H.; Slavov, D.; Wischmeyer, P. E. Glutamine-mediated dual regulation of heat shock transcription factor-1 activation and expression. **J Biol Chem**, v. 287, n. 48, p. 40400-13, Nov 2012.

Zacharyus, J. L.; Benatmane, S.; Plas, C. Role of Hsp70 synthesis in the fate of the insulin-receptor complex after heat shock in cultured fetal hepatocytes. **J Cell Biochem**, v. 61, n. 2, p. 216-29, May 1996.

Zambom de Souza, A. Z. et al. Oral supplementation with L-glutamine alters gut microbiota of obese and overweight adults: A pilot study. **Nutrition**, v. 31, n. 6, p. 884-9, Jun 2015.

Zhu, J.; Mohan, C. Toll-like receptor signaling pathways--therapeutic opportunities. **Mediators Inflamm**, v. 2010, p. 781235, 2010.

Zhukova, N. V.; Novgorodtseva, T. P.; Denisenko, Y. K. Effect of the prolonged high-fat diet on the fatty acid metabolism in rat blood and liver. **Lipids Health Dis**, v. 13, p. 49, 2014.

Material Complementar

Documento Comprobatório da Submissão do Artigo

----- Original Message -----

From: "Molecular and Cellular Biochemistry (MCBI)"

<em@editorialmanager.com>

To: "Paulo Ivo Homem de Bittencourt Jr." <pauloivo@ufrgs.br>

Sent: Tuesday, August 11, 2015 11:36 PM

Subject: MCBI - Your PDF Has Been Built

> Dear Prof. Homem de Bittencourt Jr.:

>

> The PDF for your manuscript, "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 resistanc" is ready for viewing.

>

>

> Click "Author Login".

>

> In your main menu, you will see there is a category entitled "Submission Waiting for Author's Approval". Click on that category, view your submission and approve it. Your manuscript will then be formally submitted to the journal.

>

> Should you encounter problems with the system, kindly contact Preethi at Preethi.Rajasekaran@springer.com.

>

> Kind regards,

> Springer Journals Editorial Office

> Molecular and Cellular Biochemistry

Cópia do Arquivo Eletrônico do Artigo Submetido para Publicação

Molecular and Cellular Biochemistry

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 resistanc

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:					
Full Title:	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 resistanc				
Article Type:	Original Article				
Keywords:	High fat diet; obesity; insulin resistance; glutamine; alanyl-glutamine; HSP70				
Corresponding Author:	Paulo Ivo Homem de Bittencourt Jr., PhD Federal University of Rio Grande do Sul Porto Alegre, RS BRAZIL				
Corresponding Author Secondary Information:					
Corresponding Author's Institution:	Federal University of Rio Grande do Sul				
Corresponding Author's Secondary Institution:					
First Author:	Patricia Martins Bock, M.Sc.				
First Author Secondary Information:					
Order of Authors:	Patricia Martins Bock, M.Sc. Mauricio da Silva Krause, Ph.D. Helena Trevisan Schroeder, B.Biomed. Gabriela Fernandes Hahn, B.Biomed. Hilton Kenji Takahashi, Ph.D. Cinthia Maria Schöler, M.Sc. Graziella Nicoletti, B.Pharm. Luiz Domingos Zavarize Neto, B.Biomed. Maria Inês Lavina Rodrigues, M.Sc. Maciel Alencar Bruxel, M.S.c Paulo Ivo Homem de Bittencourt Jr., PhD				
Order of Authors Secondary Information:					
Funding Information:	<table border="1"> <tr> <td>The Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (551097/2007 8, 402626/2012-5 and 402364/2012-0)</td> <td>Prof. Paulo Ivo Homem de Bittencourt Jr.</td> </tr> <tr> <td>The Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (402398/2013-2 and 372373/2013-5)</td> <td>Mauricio da Silva Krause</td> </tr> </table>	The Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (551097/2007 8, 402626/2012-5 and 402364/2012-0)	Prof. Paulo Ivo Homem de Bittencourt Jr.	The Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (402398/2013-2 and 372373/2013-5)	Mauricio da Silva Krause
The Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (551097/2007 8, 402626/2012-5 and 402364/2012-0)	Prof. Paulo Ivo Homem de Bittencourt Jr.				
The Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (402398/2013-2 and 372373/2013-5)	Mauricio da Silva Krause				
Suggested Reviewers:	Vinicius F Cruzat, Ph.D. Associate Researcher, Curtin University vinicruzat@gmail.com Prof. Cruzat has been involved specifically in the study of the impact of glutamine supplementations oin obesities, diabetes and beta cell function. COUNTRY: AUSTRALIA				

<p>Luiz C Fernandes, Ph.D. Professor and Head of Institute, Federal University of Paraná lcfer@ufpr.br Professor Fernandes is an authority in diabetes and the influence of dietary supplementations on cellular functions. COUNTRY: BRAZIL</p>
<p>Philip Newsholme, Ph.D. Professor and Head of School, Curtin University philip.newsholme@curtin.edu.au Prof. Newsholme is currently one of the most respected authorities in the world regarding obesities and diabetes. COUNTRY: AUSTRALIA</p>
<p>Julio O Tirapegui, Ph.D. Professor, Universidade de Sao Paulo tirapegu@usp.br Prof. Tirapegui is a notorious authority in the field of the nutritional aspects of glutamine supplementations. COUNTRY: BRAZIL</p>



**Brazilian Federal Government
Federal University of Rio Grande do Sul
Institute of Basic Health Sciences
Department of Physiology**

Laboratory of Cellular Physiology

Prof. Naranjan S. Dhalla,
The Editor-in-Chief,
Molecular and Cellular Biochemistry,
St. Boniface General Hospital Research Centre,
Winnipeg, MB, Canada,

Porto Alegre, 11 August 2015.

Dear Prof. Dhalla,

We, hereby, would like to submit the enclosed paper "*Oral supplementations with L-glutamine or L-alanyl-L-glutamine do not change metabolic alterations induced by long term high-fat diet in the B6.129 F2/J mouse model of insulin resistance*" for publication in **Molecular and Cellular Biochemistry**.

The present material has not been published or submitted for publication elsewhere. All the authors have contributed to the work, read, approved and agreed the final version of the manuscript and agree submitting the work to the Journal. All the authors have participated in the conception, design and data analysis and interpretation of the study and in drafting, writing and revising the manuscript. Additionally, the authors declare no conflict of interest and no competing interests such as consultancies, financial involvement, patent ownership, etc. in relation to the work described herein. CNPq (the funding organism) had no involvement in the propositions presented in this manuscript. All authors have agreed to the submission.

Possible reviewers:

Prof. Vinicius Cruzat

School of Biomedical Sciences, Faculty of Health Sciences
and Curtin Health Innovation Research Institute (CHIRI)
GPO Box U1987 PERTH WA Australia 6845
Curtin University Tel | +61 8 9266 7425
Fax | +61 8 9266 7424
Email: vinicruzat@gmail.com

Prof. Luiz Claudio Fernandes

Professor of Physiology, Federal University of Paraná (UFPR),
Institute of Biological Sciences, Department of Physiology.
81530-990 - Curitiba, PR - Brazil – Postal Code: 19031
Fone: 55 41 33611647 Fax: 55 41 33611714
Email: lcfer@ufpr.br

Prof. Philip Newsholme

Head of School, Biomedical Sciences, Faculty of Health Sciences
and Curtin Health Innovation Research Institute (CHIRI)



Rua Sarmiento Leite, 500 – 2º andar – Laboratório 02
CEP 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil
Tel: 55(51) 33083151 Fax: 55(51) 33084555
VOIP: 55(51) 11503151
www.ufrgs.br/fisiologiacelular
e-mail: fisiologia.celular@ufrgs.br





**Brazilian Federal Government
Federal University of Rio Grande do Sul
Institute of Basic Health Sciences
Department of Physiology**

Laboratory of Cellular Physiology

GPO Box U1987 PERTH WA Australia 6845
Curtin University Tel | +61 8 9266 7425
Fax | +61 8 9266 7424
Email: philip.newsholme@curtin.edu.au

Prof. Julio Orlando Tirapegui

Department of Food Science and Experimental Nutrition,
Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo,
Av. Professor Lineu Prestes, 580, bloco 14, São Paulo, SP,
05508-900 Brazil. Tel: + 55 11 3091-3309; Fax: + 55 11 38154410.
Email: tirapegu@usp.br

Looking forward to hearing from *Mol Cell Biochem* soon,

Yours sincerely,

Prof. Dr. Paulo Ivo Homem de Bittencourt Jr.
Depto. Fisiologia - ICBS - UFRGS

Paulo Ivo Homem de Bittencourt Jr., Ph.D.
Professor of Physiology



UFRGS
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL
www.ufrgs.br

Rua Sarmiento Leite, 500 – 2º andar – Laboratório 02
CEP 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil
Tel: 55(51) 33083151 Fax: 55(51) 33084555
VOIP: 55(51) 11503151
www.ufrgs.br/fisiologiacelular
e-mail: fisiologia.celular@ufrgs.br



1 **Title:** Oral supplementations with L-glutamine or L-alanyl- L-glutamine do not change metabolic
2 alterations induced by long term high-fat diet in the B6.129F2/J mouse model of insulin resistance
3
4
5
6
7

8 **Authors:** Patricia Martins Bock, Mauricio Krause; Helena Trevisan Schroeder; Gabriela Fernandes Hahn;
9 Hilton Kenji Takahashi, Cinthia Maria Schöler, Graziella Nicoletti; Luiz Domingos Zavarize Neto; Maria
10 Inês Lavina Rodrigues; Maciel Alencar Bruxel and Paulo Ivo Homem de Bittencourt Jr.*
11
12
13
14
15
16

17 **Author's affiliation:** Laboratory of Cellular Physiology, Department of Physiology, Institute of Basic
18 Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 90050-170 Brazil.
19
20
21
22
23
24

25 ***Corresponding author:** Prof. P.I. Homem de Bittencourt Jr. Laboratory of Cellular Physiology,
26 Department of Physiology, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul
27 (UFRGS). Rua Sarmiento Leite, 500, 2nd floor, suite 350, Porto-Alegre, RS, 90050-170 Brazil. Phone: +55
28 (51) 33083151; Fax: +55 (51) 33084555; E-mail: pauloivo@ufrgs.br
29
30
31
32

33 **Running Title:** Glutamine supplementations and insulin resistance
34
35
36
37

38 **Funding:** Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brasília)
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

ABSTRACT

In this work we aimed to investigate the effects of long-term supplementations with L-glutamine or L-alanyl- L-glutamine in the high-fat diet (HFD)-fed B6.129SF2/J mouse model over insulin sensitivity response and signaling, oxidative stress markers, metabolism and HSP70 expression. Mice were fed in a standard low-fat diet (STA) or a HFD for 20 weeks. In the 21th week, mice from the HFD group were allocated in five groups and supplemented for additional 8 weeks with different amino acids: HFD control group (**HFD-Con**), HFD + dipeptide L-alanyl- L-glutamine group (**HFD-Dip**), HFD + L-alanine group (**HFD-Ala**), HFD + L-glutamine group (**HFD-Gln**) or the HFD L-alanine + L-glutamine (in their free forms) group (**HFD-Ala+Gln**). HFD induced higher body weight, fat pad, fasted glucose and total cholesterol in comparison with STA group. Amino acid supplementations did not induce any modifications in these parameters. Although insulin tolerance tests indicated insulin resistance in all HFD groups, amino acid supplementations did not improve insulin sensitivity in the present model. There were also no significant differences in the immunoccontents of insulin receptor, Akt and Toll-like receptor-4. Notably, total 70 kDa heat shock protein (HSP72+HSP73) contents in the liver was markedly increased in HFD-Con group as compared to STA group, which suggest that insulin resistance is only in the beginning. Apparently, B6.129SF2/J mice are more resistant to the harmful effects of HFD through a mechanism that may include gut adaptation, reducing the absorption of nutrients, including amino acids, which may explain the lack of improvements in our intervention.

Keywords: High fat diet; obesity; insulin resistance; glutamine; alanyl-glutamine; HSP70

INTRODUCTION

Dietary fat plays a major role in obesity and, when in excess, is linked with the development of several chronic health problems, such as obesity, dyslipidemia, hyperglycemia, hypertension and type 2 diabetes mellitus (T2DM) [1, 2]. Therefore, high-fat diets (HFD) providing at least 30% of total calories as lipids constitute a very useful model of human disease [3]. Chronic excess of available saturated fatty acids in the diet can induce obesity and a state of low-grade inflammation, which is the hallmark for T2DM and cardiovascular diseases (CVD) [4-6]. The inflammatory effect of saturated fatty acids was found to be partially mediated by their binding to *Toll-like receptors* (TLRs), particularly of 2 and 4 types (TLR2 and TLR4, respectively), leading to pro-inflammatory pathways that can activate serine/threonine kinases such as c-Jun N-terminal kinases (JNKs) and protein kinase C (PKC), both inhibitors of the insulin signaling, thus promoting insulin resistance [7-9].

Additionally, adipose tissue expansion and senescence increases the levels of free fatty acids (FFA) and pro-inflammatory cytokines in the circulation, which together with hyperglycemia and altered lipoprotein profiles, increases the synthesis and accumulation of intramyocellular triglycerides, resulting in an enhanced synthesis of toxic fatty-acid-derived metabolites [4, 10]. These metabolites may cause an elevation in the production of reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS, respectively), resulting in oxidative stress, mitochondrial dysfunction and the activation of stress associated transcription factors, such as NF- κ B, followed by the increased production and release of pro-inflammatory cytokines [4].

As recently suggested, heat shock proteins of the 70 kDa family (particularly, HSP72 *a.k.* as HSP70, encoded by the HSPA1A gene in humans) are a key regulators of inflammation (by acting as an anti-inflammatory molecule) and insulin sensitivity [11-13]. The protective role of intracellular HSP70 on inflammation and insulin signaling maintenance is achieved through its ability to directly inhibit the activation of JNKs and NF- κ B [14] and also by stabilizing the insulin receptor [15] and its downstream signaling molecules, such as Akt [16, 17]. Remarkably, body fat composition can determine the content of HSP70 [18]. Apparently, HSP70 level are negatively correlated with body fat content and positively correlated with insulin sensitivity in obese human subjects [19]. The importance of HSP70 for insulin sensitivity was also well demonstrated by the observation that diabetic monkeys present lower HSP70 content and that glucose tolerance is reestablished by the induction of HSP70 expression [20]. Thus, strategies to increase intracellular HSP70 content could result in improvements on insulin sensitivity caused by obesity.

Interestingly, some nutrients, such as L-glutamine and alanyl- L-glutamine were shown to potentiate the expression of HSP70 [21-23]. Thus, amino acid supplementations may be useful tools to enhance HSP70 expression, decreasing inflammation and improving insulin sensitivity. Hence, in this work, we analyzed the effects of long term (eight weeks) L-glutamine and alanyl- L-glutamine supplementation in the HFD-fed B6.129SF2/J mouse model of the insulin resistance. Glucose

1 homeostasis, insulin sensitivity response and signaling, oxidative stress markers and HSP70 expression
2 were assessed.
3
4

5 **MATERIALS AND METHODS**

7 **Materials**

8 All the chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) unless otherwise stated.
9

11 **Animals**

12 B6.129SF2/ mice were purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) and
13 inbred at The Federal University of Rio Grande do Sul Institute of Basic Health Sciences Animal Care
14 Facility (CREAL). Male (3 months old) mice were maintained under standard conditions with a 12 h
15 light/dark cycle having free access to food and water. The mice were housed in plastic cages (33 x 17 x
16 40 cm), in an atmosphere of 50-60% relative humidity and temperature 25 ± 2 °C. All the procedures
17 performed in studies involving the animals followed the ethical rules established by Arouca's Act
18 (Federal Law 11794/2008) and the Guide for Care and Use of Experimental Animals published by the
19 National Institutes of Health (NIH publication no. 85-23, revised in 1996). The procedures were approved
20 by the Federal University of Rio Grande do Sul Ethics Committee on Animal Experimentation (CEUA
21 #21293/2011), according to the guidelines of the Brazilian National Council for the Control of Animal
22 Experimentation (CONCEA).
23
24
25
26
27
28
29
30

32 **Experimental Design**

33 Mice were randomly allocated into two groups (n=48 each): standard diet-fed group (STA) or
34 high-fat diet-fed group (HFD), receiving the specific diet for twenty weeks before any supplementation
35 test. The STA group received a standard pellet diet (commercially obtained from Nuvilab SA.; total
36 energy: 52% carbohydrates, 21% protein and 4% fat). The HFD group was provided with a lard-based
37 high-fat diet (total energy: 25.6% carbohydrates, 16.4% protein and 58% fat) [24]. All diet ingredients in
38 the HFD (except for starch and lard) were adjusted to be present at the same amount as in the STA group.
39 Body mass were recorded and oral glucose tolerance test (OGTT) was performed every 4 weeks in both
40 groups.
41
42
43
44
45
46

47 On the 21th week, mice from the HFD group were divided into additional five groups (n=8):
48 HFD control group (**HFD-Con**), HFD + dipeptide L-alanyl-L-glutamine group (**HFD-Dip**), HFD +
49 L-alanine group (**HFD-Ala**), HFD + L-glutamine group (**HFD-Gln**) or HFD L-alanine + L-glutamine in
50 their free forms group (**HFD-Ala+Gln**). The animals were supplemented by gavage six times a week
51 during 8 weeks. Animals in the supplementation groups received daily: HFD-Con (water); HFD-Dip (1.5
52 g of dipeptide L-alanyl- L-glutamine/kg body weight); HFD-Ala (1.85 g of L-alanine/kg body weight);
53 HFD-Gln (1.51 g of L-glutamine/kg body weight) and HFD-Ala+Gln (0.62 g of L-alanine/kg plus 1 g of
54 L-glutamine in their free forms/kg body weight). All doses were isonitrogenous [21]. **Fig. 1** illustrates the
55 experimental design.
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 Diet intake in all HFD groups was recorded once a week. On the 28th week, glucose tolerance
2 tests were performed: orally (OGTT) or intraperitoneally (IPGTT). Insulin tolerance tests (ITT) were also
3 carried out. On the 29th week, the animals were killed by decapitation for blood collection into
4 heparinized tubes. Plasma was obtained from blood samples after centrifugation (850 x g for 10 min) and
5 stored at 4 °C. Adipose tissue, liver and soleus muscle were immediately excised, washed in PBS and
6 stored in liquid nitrogen.
7
8
9

10 **Glucose and Insulin Tolerance Test**

11
12
13 Glucose was given by gavage (OGTT) (10 g/kg) or injected intraperitoneally (IPGTT) (1 g/kg)
14 to overnight fasted mice, and glycemia was measured using a glucometer (On Call Plus, Acon
15 Laboratories Inc.) at time 0, 30, 60, 90 and 120 min after glucose administration. Insulin tolerance tests
16 (ITT) were performed in 6 h fasted mice. Basal glycemia was measured before the insulin injection (0.75
17 IU/kg body weight; Novolin® Novo Nordisk), after 15, 30, and 45 minutes. For both tests, the
18 incremental area under the curves (AUC) were calculated.
19
20
21
22
23
24

25 **Biochemical analyses in Plasma and Tissues**

26
27 Total cholesterol (COL) and triacylglycerol (TAG) levels were quantified in sera using
28 commercial kits (Bioclin®). Intracellular L-glutamine and L-glutamate concentrations were determined in
29 skeletal muscle lysates using GLN-1 Glutamine and Glutamate Determination kit (Sigma–Aldrich) as
30 described by Lund [25]. For the evaluation of lipoperoxide formation, thiobarbituric acid-reactive
31 substances (TBA-RS) assay was performed in acetic acid homogenates of samples to precipitate proteins
32 and to acidify samples. This mixture was then centrifuged (1000 x g for 3 min). TBA (0.67 % w/v) was
33 added to the reaction medium, and tubes were boiled (100 °C) for 1 h. Absorbance was read at 535 nm in
34 a spectrophotometer. Results were expressed as micromoles per milligram of protein [26]. Livers were
35 prepared and assayed for total glutathione (GSH) content as described in Kolberg et al. [27]. Briefly, liver
36 was disrupted in metaphosphoric acid (MPA) 5% (w/v) on ice. After centrifugation (16000 x g for 2 min
37 at room temperature), cell lysates were spectrophotometrically (415 nm) assayed on a microplate reader
38 (Bio-Rad) by modification of the 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) [DTNB, Sigma]/GSSG reductase
39 (Sigma) recycling method.
40
41
42
43
44
45
46

47 For glycogen analysis, 100-200 mg of freeze-dried liver samples were incubated in KOH 30%
48 (w/v) for 20 min at 100°C. The solution was cooled ethanol-precipitated being, subsequently, heated for
49 10 min at 65°C. After centrifugation (1000 x g, 5 min), the pellet was washed with ethanol, and water was
50 added. The samples and a parallel glycogen curve were heated for 1 h at 100°C with 4 N HCl to
51 hydrolyze glycogen into glucosyl units [28]. The solution was subsequently neutralized with an equal
52 volume of 2.0 N Na₂CO₃, and analyzed for glucose contents using an enzymatic assay (kit Analisa®).
53 Protein concentration was determined by the Bradford's method using fraction V bovine serum albumin
54 (BSA, Sigma) as standard [29].
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Western blotting

Liver (1:10 w/v) and soleus muscle (1:5 w/v) were prepared as described above and processed for sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and immunoblot analyses as adapted from elsewhere [18, 27, 30]. Briefly, the tissues were homogenized (still frozen) in 0.1% (w/v) SDS buffer containing protease and phosphatase inhibitor cocktail (Sigma) consisting of (final concentrations) leupeptin (4.2 μ M), aprotinin (0.31 μ M), TLCK (N-Tosyl-L-Lysine Chloromethyl Ketone, hydrochloride; 20 μ M), PMSF (Phenyl-Methyl-Sulfonyl Fluoride, 100 μ M), sodium orthovanadate (Na_3VO_4 ; 1 mM), sodium molybdate (Na_2MoO_4 ; 1 mM), β -glycerophosphate (1 mM). Afterwards, the homogenates were centrifuged at 15000 $\times g$ for 5 min at room temperature and the supernatant fractions were saved for protein determination [29] by using BSA (Sigma) as standard. Then, equivalent amounts of protein from each sample (~ 40 μ g) were mixed with Laemmli's gel loading buffer [50 mM Tris, 10% (w/v) SDS, 10% (v/v) glycerol, 10% (v/v) 2-mercaptoethanol and 2 mg/mL bromphenol blue] in a ratio of 1:1, boiled for 5 min and electrophoresed in a 10% polyacrylamide minigel for 1 h 200 V/gel. Proteins were transferred onto nitrocellulose membranes (GE HealthCare) according to the electrotransfer (Bio-Rad) manufacturer's instructions (2 h, 100 V) and transferred bands were visualized with 0.3% (w/v) Red Ponceau S (Sigma) in 3% (w/v) trichloroacetic acid solution to be photodocumented (ImageQuant 350, GE HealthCare). Membranes were then washed and blocked in 0.2% (w/v) BSA in wash buffer [TEN-Tween 20 solution (0.1% w/v)]. The membranes were incubated overnight with mouse anti HSP70 monoclonal antibody (Sigma H5147) which recognizes both the 73 kDa constitutive HSC70 (*hspa8* gene) and the 72 kDa inducible HSP70 (*hspa1a* gene) forms. Total (quiescent unphosphorylated plus activated phosphorylated) insulin receptor (IR) were revealed with rabbit anti-IR polyclonal antibody (Sigma SAB4501555) and rabbit anti IR-P polyclonal antibody (Sigma I1783). Activated phosphorylated AKT (pAKT) was detected with rabbit anti-pAKT polyclonal antibody (Sigma SAB4300574), and TLR4 with rabbit anti-TLR4 polyclonal antibody (Sigma PRS3141). Peroxidase-labeled rabbit anti-mouse IgG (Sigma A9044) or goat anti-rabbit IgG (whole molecule)-biotin antibody (Sigma B8895) followed by streptavidin-peroxidase polymer ultrasensitive (Sigma S2438) were utilized as secondary antibodies and enhancing reagent, respectively. As the gel loading control, peroxidase-labeled rabbit anti-GAPDH polyclonal antibody (Sigma G9545) was used. Visualization of the blots was performed for 300 s by using chemiluminescence reagent p-coumaric acid and luminol, in ImageQuant™ 350 chemiluminescence system (GE) and the accompanying online stacking imaging software ImageQuant TL 7.0 (GE). Data are given as the means \pm S.E.M. of immunocontents normalized in terms of GAPDH.

Statistical analysis

As demanded in each case, data were analyzed by Student's *t* test or one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Student Newman-Keuls Test (SNK), after Kolmogorov-Smirnov test for normality, using GraphPad Prism 5.0. P values of at least 0.05 were considered significant.

RESULTS

Physiological and biochemical parameters

No differences in food intake or the average weekly energy intake were found between the groups (data not shown). As expected, after 28 weeks of treatment, the HFD animals showed higher body weight, fat pad, fasting glucose and total cholesterol in comparison with the animals of the STA group (**Table 1**). Surprisingly, in the present model, HFD mice showed a decrease in liver TBA-RS. No changes were found in TAG, liver glycogen and liver GSH (**Table 1**). On the other hand, although HFD were found to be obese, amino acid supplementations did not induce any modifications in body weight, fat pad, TAG, total cholesterol, muscle L-glutamine, liver glycogen, liver TBA-RS and liver total glutathione (**Table 2**).

Insulin sensitivity and response

ITT data clearly indicated insulin resistance in all HFD groups (**Fig. 2a**). However, the different amino acid supplementations did not improve insulin sensitivity in any of the test groups. Regarding the glucose tolerance, the HFD-Con, HFD-Dip, HFD-Ala, HFD-Gln and HFD-Ala+Gln groups showed no difference in OGTT (**Fig. 2a**) or IPGTT (**Fig. 2b**) in comparison to the STA group. It is important to mention that, during the OGTT, it is expected plasma that glycemia peaks 30 min after glucose administration, as found for STA group (**Fig. 2a**). Interestingly, in all HFD groups of the present model, this peak was absent in oral tests, suggesting differential glucose absorption by the gut. In fact, when we tested IPGTT, the 30 min peak was present in all groups (**Fig. 2b**).

Protein expression

In order to evaluate the molecular basis of insulin resistance in this mouse model, total and phosphorylated forms of the insulin receptor and the phosphorylated Akt expressions were determined in soleus muscle and liver. Again, no statistical difference was observed between the groups (**Fig. 3**). There was also no difference in protein content of TLR4 (**Fig. 4**). Notably, total HSP70 (HSP72+HSP73) protein contents in liver is markedly increased in HFD-Con group as compared to STA group. Amino acid supplementation did not change any of the analyzed proteins. Total HSP70 (HSP72+HSP73) protein content in the skeletal muscle was not changed (**Fig. 5**) in any experimental group.

DISCUSSION

The main finding of this study was that HFD induced a mild insulin resistance and obesity in B6.129SF2/J mice but these metabolic changes were not reversed or improved by long term L-glutamine or alanyl- L-glutamine supplementation. As discussed below, we argue that, unlike the C57BL/6J mouse model, in which genetically predisposition to become overweight developing hyperglycemia if raised on a

1 HFD (please, see supplemental **Fig. S1**), the B6.129SF2/J mice seem to be more resistant to the effects of
2 HFD; perhaps due to changes in the gut nutrient absorption that, somehow, is able to protect these
3 animals from the HFD effects. Moreover, the same changes in intestinal absorption of lipids may have
4 also affected the amino acid uptake, thus explaining, at least in part, the failure of the amino acid
5 supplementations to improve the metabolic status.
6

7
8 The animals that underwent the HFD, as expected, increased their body mass in comparison with
9 the animals in the standard diet. Previous work has demonstrated the beneficial effects of L-glutamine
10 supplementation on glycemia, insulinemia and body weight gain in HFD-fed mice [31], and of alanyl-
11 L-glutamine in pancreatic β -cell function, improving insulin secretion [32]. In our hands, however,
12 supplementation with L-glutamine, L-alanine, alanyl- L-glutamine or L-alanine + L-glutamine did not
13 change the increments in body weight. The divergence found between our study and the study conducted
14 by Opara et al. [31] was the strain of mouse (C57BL/6J) used and the time schedule of HFD and amino
15 acid supplementation. Amino acid supplementation may be efficient to act against the harmful metabolic
16 effects of a HFD only if given in parallel with the fat diet; what was not the case herein. It seems that the
17 efficacy of L-glutamine or alanyl- L-glutamine is dependent on the time when the supplementation is
18 started. Following this, Prada et al. [33] have demonstrated that rats under HFD and concomitant
19 L-glutamine supplementation, for two months, show reduction in adipose mass, consequently attenuating
20 insulin resistance. In addition, it is important to state that C57BL/6J mice under HFD did not change
21 intestinal fat absorption rate since no modification in the fecal fat excretion was found [31].
22
23

24
25 Since our intervention did not induce changes in food intake, we suggest that long term HFD can
26 induce modification in the gut nutrient absorption, such as glucose and amino acids. Our data on the oral
27 GTT suggest that this may be the case. As observed in **Fig. 2**, plasma glucose peaks 30 min after the
28 glucose administration in the STA group. Interestingly, in all HFD groups, this peak was absent,
29 suggesting differential glucose absorption by the gut. This could be due to a modification in the activity
30 of nutrient transporters and/or changes in the levels of release of incretins, such as GLP-1. In fact, when
31 we tested IPGTT, the 30 min peak was present in all groups. The same pattern was observed in a study
32 investigating the effects of HFD, for twelve weeks, in Wistar rats [34]. Following that, weaned Balb
33 C57BL/6 mice, that were placed under HFD for two months, presented lower glucose absorption by the
34 co-transporter SGLT1 when compared with animals under control diet [35]. Proteomic analysis revealed
35 that intestinal mucosa expresses lower levels of GLUT-2 and Na/K ATPase pump, suggesting a lower
36 capacity for glucose uptake by the gut [35].
37
38

39
40 From the present observations, we hypothesize that a similar mechanism could explain the
41 absence of the amino acid effects that we found, *i.e.* our amino acid supplementations were not properly
42 absorbed by the gut. This hypothesis is strengthened by studies on gut amino acid transport in animals on
43 HFD [36-38]. For example, the SNAT-2 amino acid transporter is reduced by L-glutamine
44 supplementation [36, 37]. Another study that supports this conjecture was conducted in C57BL/6J mice
45 under HFD for six weeks [38]. In this study, the expression of the co-transporter H^+ /peptide Slc15a1
46 (PEPT1), the major responsible for the absorption of dipeptides, was reduced [38]. In our work, we
47 investigated the effects of L-glutamine and the dipeptide alanyl- L-glutamine after five months of HFD.
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 Therefore, it is reasonable to suppose that the amino acids transporters could be considerably reduced
2 when we started the supplementation and, for this reason, our intervention failed to improve the metabolic
3 and molecular parameters investigated. In fact, as recently demonstrated, supplementation with
4 L-glutamine and alanyl- L-glutamine, for eight weeks, increases the concentration of L-glutamine in the
5 skeletal muscle of exercised rats [21]. However and corroborating our proposition on HFD decreasing
6 effect on amino acid and dipeptide absorption, our intervention with amino acids and alanyl- L-glutamine
7 did not increase the levels of L-glutamine within the skeletal muscle, as was expected. In addition, HFD
8 may not only change the absorption rates of the amino acids, but also their metabolism. For example,
9 liver from rats on cafeteria diet (14 weeks) demonstrated a 41% reduction on the activity of glutaminase,
10 suggesting that obese rats have lower capacity to metabolize the dietary L-glutamine [39].
11
12
13
14

15 The inability of the amino acid supplementation to cause improvements in the lipid profile after
16 HFD was also observed in Zucker rats receiving L-arginine and L-alanine for twelve weeks. As also
17 observed in our study, HFD induced an increase in total cholesterol without any change in plasma
18 triglycerides and the supplementation failed to reverse those changes [40]. Our results also shown that
19 HFD alone, or in the presence of the amino acids, did not induce any change in the levels of Akt-p or the
20 insulin receptor in the liver and skeletal muscle. Similar results were found in C57BL/6J mice that
21 underwent HFD for eleven weeks [41]. Changes in Akt were observed only when the muscles were
22 incubated with the presence of insulin. The fact that, in our study, we did not test the tissue response to
23 insulin after the treatment is a limitation of our work. Regarding TLR4 expression, we aimed to assess
24 whether HFD influenced the level of expression of this protein and whether the amino acid
25 supplementation has any effect on it. However, no changes were observed at any circumstance. Studies
26 who analyzed TLR4 expression in response to HFD have shown that TLR is increased after the
27 intervention [42, 43]. Interestingly, high-fructose HFD-fed mice, do exhibit elevation of TLR4 expression
28 after 8 weeks of treatment; however, after 16 weeks, TLR4 expression returned to the basal levels [44].
29 Thus, it seems that TLR4 expression may have a transitory behavior, increasing in response to HFD
30 during the first weeks of the regimen but undergoing a downregulation in long-term treatment. Since we
31 analyzed the expression of TLR4 only at the end of the 28th week, the expression of this protein may be
32 already attenuated.
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42

43 The importance of the intracellular HSP70 for insulin sensitivity was previously discussed in the
44 introduction. What is known about the levels of this protein in obesity and diabetes is that divergences
45 exist regarding its location, intracellularly reduced and increased in the extracellular compartments [18,
46 45]. Thus, in obese and diabetic people, it is expected that the levels of HSP70 on the skeletal muscle and
47 liver are reduced, which is a marker of chronic inflammation. In our work, we found only changes in the
48 liver, where the content of this protein is increased after the HFD, thus suggesting just a primary
49 defensive response to the harmful effects of HFD. On the other hand, muscle levels did not change and
50 the amino acid supplementations had no influence on this behavior. Similar results were found in
51 exercised rats after alanyl- L-glutamine supplementation [46]. Another study, in which increments in
52 HSP70 levels were found after HFD, was conducted in Wistar rats. Nevertheless, the tissue analyzed was
53 the skeletal muscle, not the liver [47]. Similar results were found in vervet monkeys that underwent HFD
54 for 4 months [48]. Interestingly, a dual response was observed that was time-dependent. During the HFD
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 intervention, these animals increased their muscular HSP70 contents. However, six years later, HSP70
2 was reduced. After a regression analysis, it was found that during the 4 months of intervention, glycemic
3 levels were directly correlated with muscle HSP70 levels, however, six years later the data indicates the
4 opposite pattern [48]. Thus, it seems that while insulin resistance is not chronically sustained or not so
5 severe, cells are able to compensate increasing their HSP70 levels. After long-term insulin resistance,
6 notwithstanding, stress response (*i.e.* HSP70 machinery) is blunted by the senescent effect of obesity [4,
7 10] and the levels of HSP70 fall [48]. The importance of normal HSP70 machinery for proper insulin
8 sensitivity was elegantly demonstrated in HFD-fed mice who overexpress HSP70 [49]. In these animals,
9 inflammatory signaling associated with insulin resistance, hyperglycemia and hyperinsulinemia was
10 prevented. In our study, the higher expression of HSP70 in the liver of HFD animals may represent a
11 transitory response while the insulin resistance is not severe. In whatever way, it is expected that the
12 HSP70 concentration would fall if the intervention was maintained for a longer period. The raised HSP70
13 in the liver may also explain the reduced levels of lipoperoxidation.
14
15
16
17
18
19
20
21

22 **CONCLUSIONS**

23
24 In conclusion, long term L-glutamine and dipeptide alanyl- L-glutamine supplementation failed to
25 improve metabolic status in the HFD-fed B6.129SF2/J mouse model. Apparently, B6.129SF2/J mice are
26 more resistant to the harmful effects of HFD through a mechanism that may include gut adaptation,
27 reducing the absorption of fat and other nutrients, including amino acids. This may explain the lack of
28 improvements in the intervention proposed. The efficacy of L-glutamine and alanyl- L-glutamine to
29 increase metabolic status and HSP70 expression in HFD-fed animals is not excluded. The efficiency of
30 these compounds may be dependent on the time of supplementation, being more efficient if
31 supplementation occurs in parallel to the HFD.
32
33
34
35
36
37
38

39 **Acknowledgments**

40
41 We thank the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Department of Physiology, for
42 supporting this work. This work was partially supported by grants received from the Brazilian National
43 Council for Scientific and Technological Development (CNPq, grants from MCT/CNPq, MS/DECIT,
44 CT-CIOTEC and CTSaúde, grants #551097/2007-8, 402626/2012-5 and 402364/2012-0, to PIHBJ;
45 402398/2013-2 and 372373/2013-5 to MK).
46
47
48
49
50

51 **Authors' contributions**

52
53 PMB, MK, HKT and PIHBJ designed the study. PMB and HTS completed all the experiments described
54 in this manuscript. GFH, MAB, MK, GN, LDZN and MILR were involved in animal manipulation and
55 studies on glycemic control and glutathione status. MK, HTS, GFH, GN, LDZN, CMS performed
56 molecular studies. PMB, MK, HTS, HKT and PIHBJ analyzed the results. PMB and MK co-wrote the
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 article. PIHBJ provided experimental advice and revised the final version of the manuscript. All the
2 authors had final approval of the submitted and published versions.
3
4

5 **Conflicts of interest**

6

7 The authors declare no conflict of interest and no competing interests such as consultancies, financial
8 involvement, patent ownership, etc. in relation to the work described herein. CNPq (the funding
9 organism) had no involvement in the propositions presented in this manuscript.
10
11
12

13 **Ethical approval**

14

15 All the procedures performed in studies involving the animals followed the ethical rules established by
16 Arouca's Act (Federal Law 11794/2008) and the Guide for Care and Use of Experimental Animals
17 published by the National Institutes of Health (NIH publication no. 85-23, revised in 1996). The
18 procedures were approved by the Federal University of Rio Grande do Sul Ethics Committee on Animal
19 Experimentation (CEUA #21293/2011), according to the guidelines of the Brazilian National Council for
20 the Control of Animal Experimentation (CONCEA).
21
22
23
24
25
26
27

28 **REFERENCES**

29

- 30 1. Cho LW (2011) Metabolic syndrome. *Singapore Med J* 52:779-85.
- 31 2. Cheung WW, Mao P (2012) Recent advances in obesity: genetics and beyond. *ISRN Endocrinol*
32 2012:536905. doi: 10.5402/2012/536905
- 33 3. Schwingshackl L, Hoffmann G (2014) Comparison of the long-term effects of high-fat v. low-fat
34 diet consumption on cardiometabolic risk factors in subjects with abnormal glucose metabolism: a
35 systematic review and meta-analysis. *Br J Nutr* 111:2047-58. doi: 10.1017/S0007114514000464
- 36 4. Newsholme P, Krause M (2014) Diet, Obesity, and Reactive Oxygen Species – Implications for
37 Diabetes and Aging. *Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants* 01:3361-3374.
- 38 5. Schwab U, Lauritzen L, Tholstrup T, Haldorssoni T, Riserus U, Uusitupa M and Becker W
39 (2014) Effect of the amount and type of dietary fat on cardiometabolic risk factors and risk of developing
40 type 2 diabetes, cardiovascular diseases, and cancer: a systematic review. *Food Nutr Res* 58. doi:
41 10.3402/fnr.v58.25145
- 42 6. Rahati S, Shahraki M, Arjomand G and Shahraki T (2014) Food pattern, lifestyle and diabetes
43 mellitus. *Int J High Risk Behav Addict* 3:e8725. doi: 10.5812/ijhrba.8725
- 44 7. Jin C, Flavell RA (2013) Innate sensors of pathogen and stress: linking inflammation to obesity.
45 *J Allergy Clin Immunol* 132:287-94. doi: 10.1016/j.jaci.2013.06.022
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
8. Hameed I, Masoodi SR, Mir SA, Nabi M, Ghazanfar K and Ganai BA (2015) Type 2 diabetes mellitus: From a metabolic disorder to an inflammatory condition. *World J Diabetes* 6:598-612. doi: 10.4239/wjd.v6.i4.598
 9. Li H, Bao Y, Zhang X and Yu Y (2011) Free fatty acids induce endothelial dysfunction and activate protein kinase C and nuclear factor- κ B pathway in rat aorta. *Int J Cardiol* 152:218-24. doi: 10.1016/j.ijcard.2010.07.019
 10. Newsholme P, Homem de Bittencourt PI, Jr. (2014) The fat cell senescence hypothesis: a mechanism responsible for abrogating the resolution of inflammation in chronic disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 17:295-305. doi: 10.1097/MCO.0000000000000077
 11. Krause M, Heck TG, Bittencourt A, Scmazzone SP, Newsholme P, Curi R and Homem de Bittencourt PI, Jr. (2015) The Chaperone Balance Hypothesis: The Importance of the Extracellular to Intracellular HSP70 Ratio to Inflammation-Driven Type 2 Diabetes, the Effect of Exercise, and the Implications for Clinical Management. *Mediators of Inflammation* 2015. doi: 10.1155/2015/249205
 12. Krause M, Ludwig MS, Heck TG and Takahashi HK (2015) Heat shock proteins and heat therapy for type 2 diabetes: pros and cons. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 18:374-80. doi: 10.1097/MCO.0000000000000183
 13. Krause M, Bock PM, Takahashi HK, Homem de Bittencourt PI, Jr. and Newsholme P (2015) The regulatory roles of NADPH oxidase, intra and extracellular HSP70 in pancreatic islet function, dysfunction and diabetes. *Clinical Science* In press. doi: 10.1042/CS20140695
 14. Henstridge DC, Whitham M and Febbraio MA (2014) Chaperoning to the metabolic party: The emerging therapeutic role of heat-shock proteins in obesity and type 2 diabetes. *Mol Metab* 3:781-93. doi: 10.1016/j.molmet.2014.08.003
 15. Zacharyus JL, Benatmane S and Plas C (1996) Role of Hsp70 synthesis in the fate of the insulin-receptor complex after heat shock in cultured fetal hepatocytes. *J Cell Biochem* 61:216-29.
 16. Liao Y and Hung MC (2010) Physiological regulation of Akt activity and stability. *Am J Transl Res* 2:19-42.
 17. Kurabe N, Mori M, Kurokawa J, Taniguchi K, Aoyama H, Atsuda K, Nishijima A, Odawara N, Harada S, Nakashima K, Arai S and Miyazaki T (2010) The death effector domain-containing DEDD forms a complex with Akt and Hsp90, and supports their stability. *Biochem Biophys Res Commun* 391:1708-13. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.12.137
 18. Rodrigues-Krause J, Krause M, O'Hagan C, De Vito G, Boreham C, Murphy C, Newsholme P and Collieran G (2012) Divergence of intracellular and extracellular HSP72 in type 2 diabetes: does fat matter? *Cell Stress Chaperones* 17:293-302. doi: 10.1007/s12192-011-0319-x
 19. Henstridge DC, Forbes JM, Penfold SA, Formosa MF, Dougherty S, Gasser A, de Courten MP, Cooper ME, Kingwell BA and de Courten B (2010) The relationship between heat shock protein 72 expression in skeletal muscle and insulin sensitivity is dependent on adiposity. *Metabolism* 59:1556-61. doi: 10.1016/j.metabol.2010.01.027

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
20. Kavanagh K, Flynn DM, Jenkins KA, Zhang L and Wagner JD (2011) Restoring HSP70 deficiencies improves glucose tolerance in diabetic monkeys. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 300:E894-901. doi: 10.1152/ajpendo.00699.2010
 21. Petry ER, Cruzat VF, Heck TG, Leite JS, Homem de Bittencourt PI, Jr. and Tirapegui J (2014) Alanyl-glutamine and glutamine plus alanine supplements improve skeletal redox status in trained rats: involvement of heat shock protein pathways. *Life Sci* 94:130-6. doi: S0024-3205(13)00707-8 [pii] 10.1016/j.lfs.2013.11.009
 22. Curi R, Lagranha CJ, Doi SQ, Sellitti DF, Procopio J, Pithon-Curi TC, Corless M and Newsholme P (2005) Molecular mechanisms of glutamine action. *J Cell Physiol* 204:392-401. doi: 10.1002/jcp.20339
 23. Cruzat VF, Pantaleao LC, Donato J, Jr., Homem de Bittencourt PI, Jr. and Tirapegui J (2015) 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* 25:345-52. doi: 10.1016/j.jnutbio.2013.11.009
 24. Winzell MS and Ahrén B (2004) The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes* 53 Suppl 3:S215-9.
 25. Lund P (1986) L-Glutamine and L-Glutamate: UV-Method with Glutaminase and Glutamate Dehydrogenase. In *Methods of Enzymatic Analysis*. ed. H. Bergmeyer. Vol. 8 Verlagsgesellschaft. Weinheim.
 26. Buege JA and Aust SD (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 52:302-10.
 27. Kolberg A, Rosa TG, Puhl MT, Scola G, da Rocha Janner D, Maslinkiewicz A, Lagranha DJ, Heck TG, Curi R and Homem de Bittencourt PI, Jr. (2006) Low expression of MRP1/GS-X pump ATPase in lymphocytes of Walker 256 tumour-bearing rats is associated with cyclopentenone prostaglandin accumulation and cancer immunodeficiency. *Cell Biochem Funct* 24:23-39. doi: 10.1002/cbf.1290
 28. Van Handel E (1965) Estimation of glycogen in small amounts of tissue. *Anal Biochem* 11:256-65.
 29. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-54.
 30. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-5.
 31. Opara EC, Petro A, Tevrizian A, Feinglos MN and Surwit RS (1996) L-glutamine supplementation of a high fat diet reduces body weight and attenuates hyperglycemia and hyperinsulinemia in C57BL/6J mice. *J Nutr* 126:273-9.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
32. Cruzat VF, Keane KN, Scheinflug AL, Cordeiro R, Soares MJ and Newsholme P (2015) Alanyl-glutamine improves pancreatic beta-cell function following ex vivo inflammatory challenge. *J Endocrinol* 224:261-71. doi: 10.1530/JOE-14-0677
 33. Prada PO, Hirabara SM, de Souza CT, Schenka AA, Zecchin HG, Vassallo J, Velloso LA, Carneiro E, Carvalheira JB, Curi R and Saad MJ (2007) L-glutamine supplementation induces insulin resistance in adipose tissue and improves insulin signalling in liver and muscle of rats with diet-induced obesity. *Diabetologia* 50:1949-59. doi: 10.1007/s00125-007-0723-z
 34. Jacob PS, de Meneses Fujii TM, Yamada M, Borges MC, Pantaleão LC, Borelli P, Fock R and Rogero MM (2013) Isocaloric intake of a high-fat diet promotes insulin resistance and inflammation in Wistar rats. *Cell Biochem Funct* 31:244-53. doi: 10.1002/cbf.2894
 35. Wiśniewski JR, Friedrich A, Keller T, Mann M and Koepsell H (2015) The impact of high-fat diet on metabolism and immune defense in small intestine mucosa. *J Proteome Res* 14:353-65. doi: 10.1021/pr500833v
 36. Li G, Li J, Tan B, Wang J, Kong X, Guan G, Li F and Yin Y (2015) Characterization and Regulation of the Amino Acid Transporter SNAT2 in the Small Intestine of Piglets. *PLoS One* 10:e0128207. doi: 10.1371/journal.pone.0128207
 37. Feng Z, Zhou X, Wu F, Yao K, Kong X, Li T, Blachier F and Yin Y (2014) Both dietary supplementation with monosodium L-glutamate and fat modify circulating and tissue amino acid pools in growing pigs, but with little interactive effect. *PLoS One* 9:e84533. doi: 10.1371/journal.pone.0084533
 38. Do TT, Hindlet P, Waligora-Dupriet AJ, Kapel N, Neveux N, Mignon V, Deloménie C, Farinotti R, Fève B and Buyse M (2014) Disturbed intestinal nitrogen homeostasis in a mouse model of high-fat diet-induced obesity and glucose intolerance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 306:E668-80. doi: 10.1152/ajpendo.00437.2013
 39. de Castro Ghizoni CV, Gasparin FR, Júnior AS, Carreño FO, Constantin RP, Bracht A, Ishii Iwamoto EL and Constantin J (2013) Catabolism of amino acids in livers from cafeteria-fed rats. *Mol Cell Biochem* 373:265-77. doi: 10.1007/s11010-012-1499-0
 40. Jobgen W, Meininger CJ, Jobgen SC, Li P, Lee MJ, Smith SB, Spencer TE, Fried SK and Wu G (2009) Dietary L-arginine supplementation reduces white fat gain and enhances skeletal muscle and brown fat masses in diet-induced obese rats. *J Nutr* 139:230-7. doi: 10.3945/jn.108.096362
 41. Benoit B, Plaisancié P, Awada M, Géloën A, Estienne M, Capel F, Malpuech-Brugère C, Debard C, Pesenti S, Morio B, Vidal H, Rieusset J and Michalski MC (2013) High-fat diet action on adiposity, inflammation, and insulin sensitivity depends on the control low-fat diet. *Nutr Res* 33:952-60. doi: 10.1016/j.nutres.2013.07.017
 42. Raso GM, Simeoli R, Iacono A, Santoro A, Amero P, Paciello O, Russo R, D'Agostino G, Di Costanzo M, Canani RB, Calignano A and Meli R (2014) Effects of a *Lactobacillus paracasei* B21060 based synbiotic on steatosis, insulin signaling and toll-like receptor expression in rats fed a high-fat diet. *J Nutr Biochem* 25:81-90. doi: 10.1016/j.jnutbio.2013.09.006

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
43. Sawada K, Ohtake T, Hasebe T, Abe M, Tanaka H, Ikuta K, Suzuki Y, Fujiya M, Hasebe C and Kohgo Y (2014) Augmented hepatic Toll-like receptors by fatty acids trigger the pro-inflammatory state of non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Hepatol Res* 44:920-34. doi: 10.1111/hepr.12199
44. Liu J, Zhuang ZJ, Bian DX, Ma XJ, Xun YH, Yang WJ, Luo Y, Liu YL, Jia L, Wang Y, Zhu ML, Ye DW, Zhou G, Lou GQ and Shi JP (2014) Toll-like receptor-4 signalling in the progression of non-alcoholic fatty liver disease induced by high-fat and high-fructose diet in mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 41:482-8. doi: 10.1111/1440-1681.12241
45. Krause M, Keane K, Rodrigues-Krause J, Crognale D, Egan B, De Vito G, Murphy C and Newsholme P (2014) Elevated levels of extracellular heat-shock protein 72 (eHSP72) are positively correlated with insulin resistance in vivo and cause pancreatic beta-cell dysfunction and death in vitro. *Clin Sci (Lond)* 126:739-52. 10.1042/CS20130678
46. Petry ER, Cruzat VF, Heck TG, Homem de Bittencourt PI, Jr. and Tirapegui J (2015) 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* 25:188-97. doi: 10.1123/ijsnem.2014-0131
47. Marineli RaS, Moura CS, Moraes É, Lenquiste SA, Lollo PC, Morato PN, Amaya-Farfan J and Maróstica MR (2015) Chia (*Salvia hispanica* L.) enhances HSP, PGC-1 α expressions and improves glucose tolerance in diet-induced obese rats. *Nutrition* 31:740-8. doi: 10.1016/j.nut.2014.11.009
48. Kavanagh K, Wylie AT, Chavanne TJ, Jorgensen MJ, Voruganti VS, Comuzzie AG, Kaplan JR, McCall CE and Kritchevsky SB (2012) Aging does not reduce heat shock protein 70 in the absence of chronic insulin resistance. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 67:1014-21. doi: 10.1093/gerona/gls008
49. Henstridge DC, Bruce CR, Drew BG, Tory K, Kolonics A, Estevez E, Chung J, Watson N, Gardner T, Lee-Young RS, Connor T, Watt MJ, Carpenter K, Hargreaves M, McGee SL, Hevener AL and Febbraio MA (2014) Activating HSP72 in rodent skeletal muscle increases mitochondrial number and oxidative capacity and decreases insulin resistance. *Diabetes* 63:1881-94. doi: 10.2337/db13-0967

Table 1. Body weight and biochemistry of untreated mice.

	STA	HFD
Body weight (g)	31.13± 0.78	35.41± 1.87*
Fat pad (g)	0.46± 0.07	1.29± 0.21*
Fasting glucose (mg/dL)	87.91± 4.83	118.50± 10.96*
TAG (mg/dL)	115.70± 9.61	106.10± 7.34
Total cholesterol (mg/dL)	106.00± 9.05	175.10± 10.16*
Liver glycogen (mg/g)	1.82± 0.28	0.78± 0.47
Liver TBA-RS (nmol/mg protein)	4.88± 0.80	1.86± 0.57*
Liver total glutathione (μmol/g)	19.31± 1.18	17.07± 1.27

Body weight, fat pad, blood biomarkers, liver glycogen, liver TBA-RS and total glutathione of mice maintained on a standard (STA) or high-fat diet (HFD) for 28 weeks. Data are the means ± S.E.M.

*P<0.05 for the comparison with STA group by the Student's *t* test.

Table 2. Body weight and biochemistry of glutamine supplemented mice.

	HFD-Con	HFD-Dip	HFD-Ala	HFD-Gln	HFD-Ala+Gln
Body weight (g)	35.41±1.87	33.70±1.02	40.97±3.50	35.53±1.82	35.44±1.19
Fat pad (g)	1.29±0.21	1.26±0.17	1.91±0.41	1.46±0.19	1.09±0.21
Fasting glucose (mg/dL)	118.50±10.96	114.80±5.66	114.70±11.36	109.50±10.32	118.50±12.07
TAG (mg/dL)	106.10±7.34	115.90±7.81	116.80±15.93	123.40±12.30	115.00±10.48
Total cholesterol (mg/dL)	175.10±10.16	192.40±9.10	153.70±8.51	173.10±10.23	158.50±11.76
Muscle glutamine (nmol/g)	6.30±1.16	6.16±0.96	7.13±0.92	7.34±0.37	6.56±0.73
Liver glycogen (mg/g)	0.78±0.47	1.01±0.67	2.08±0.56	0.63±0.49	1.12±0.39
Liver TBA-RS (nmol/mg protein)	1.86±0.57	3.08±0.82	2.63±1.02	2.81±1.05	3.43±1.62
Liver total glutathione (μmol/g)	17.07±1.27	22.37±6.41	27.05±5.75	20.81±2.74	19.74±1.70

Body weight, fat pad, blood biomarkers, muscle glutamine, liver glycogen, liver TBA-RS and total glutathione of mice maintained on high-fat diet (HFD) for 20 weeks and supplemented or not for the last 8 weeks of water (HFD-Con), dipeptide L-alanyl-l-glutamine (HFD-Dip), L-alanine (HFD-Ala), L-glutamine (HFD-Gln) and with L-alanine plus L-glutamine in their free forms (HFD-Ala+Gln). Data are the means ± S.E.M.

Figure captions

Fig. 1 Experimental design

Fig. 2 Glycemic curve and incremental areas under the curves (AUC; insets) of mice fed a standard diet (STA) for 28 weeks or high-fat diet (HFD) for 20 weeks plus 8 weeks under glutamine supplementations as follows: control groups received water (HFD-Con); supplemented animals received either L-alanyl-L-glutamine dipeptide (HFD-Dip), L-alanine (HFD-Ala), L-glutamine (HFD-Gln) or L-alanine plus L-glutamine in their free forms (HFD-Ala+Gln). A) oral glucose tolerance test (OGTT), B) intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT), C) insulin tolerance test (ITT). Results are expressed as mean \pm standard error. AUC are given in $\text{mg}\cdot\text{dL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$. * $P < 0,05$ versus the STA group (ANOVA)

Fig. 3 Immunocontents of IR and Akt of mice on a standard diet (STA) for 28 weeks or HFD diet for 20 weeks plus 8 weeks of HFD supplemented with water (HFD-Con), dipeptide L-alanyl-L-glutamine (HFD-Dip), L-alanine (HFD-Ala), L-glutamine (HFD-Gln) and L-alanine plus L-glutamine in their free forms (HFD-Ala+Gln) in a) Soleus IR-P, b) Soleus Akt-P, c) Liver IR, d) Liver Akt-P. Results are expressed as mean \pm standard error. No significant differences

Fig. 4 Immunocontents of TLR4 of mice on a standard diet (STA) for 28 weeks or HFD diet for 20 weeks plus 8 weeks of HFD supplemented with water (HFD-Con), dipeptide L-alanyl-L-glutamine (HFD-Dip), L-alanine (HFD-Ala), L-glutamine (HFD-Gln) and L-alanine plus L-glutamine in their free forms (HFD-Ala+Gln) in a) Soleus TLR4, b) Liver TLR4. Results are expressed as mean \pm standard error. No significant differences

Fig. 5 Immunocontents HSP70 of mice on a standard diet (STA) for 28 weeks or HFD diet for 20 weeks plus 8 weeks of HFD supplemented with water (HFD-Con), dipeptide L-alanyl-L-glutamine (HFD-Dip), L-alanine (HFD-Ala), L-glutamine (HFD-Gln) and L-alanine plus L-glutamine in their free forms (HFD-Ala+Gln) in a) Soleus HSP70, b) Liver HSP70. Results are expressed as mean \pm standard error. * $P < 0,05$ versus the STA group. No significant differences between HFD groups

Supplemental Fig. S1 Glycemic responses of C57BL/6J mice fed a high-fat diet (HFD) in comparison with its controls maintained on a standard (STA) rodent chow. (A) oral glucose tolerance test; (B) incremental area under glycemic curves (AUC)

Figure 1

[Click here to download Figure: Figure 1.pdf](#)

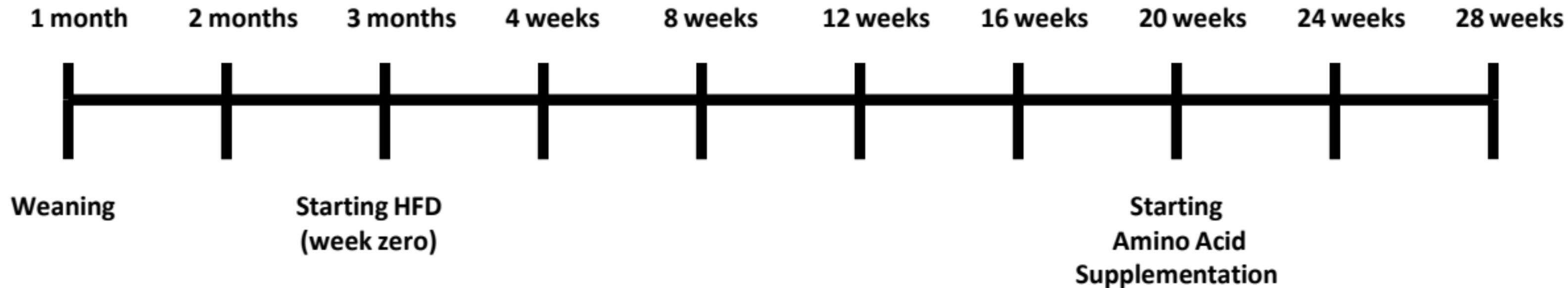
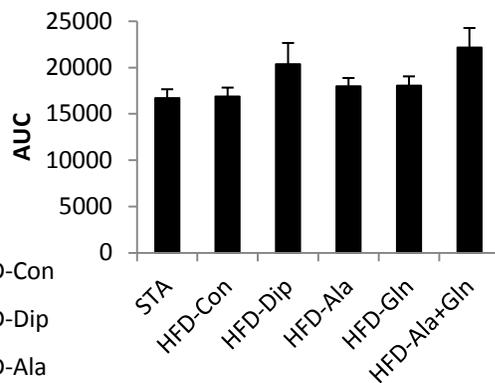
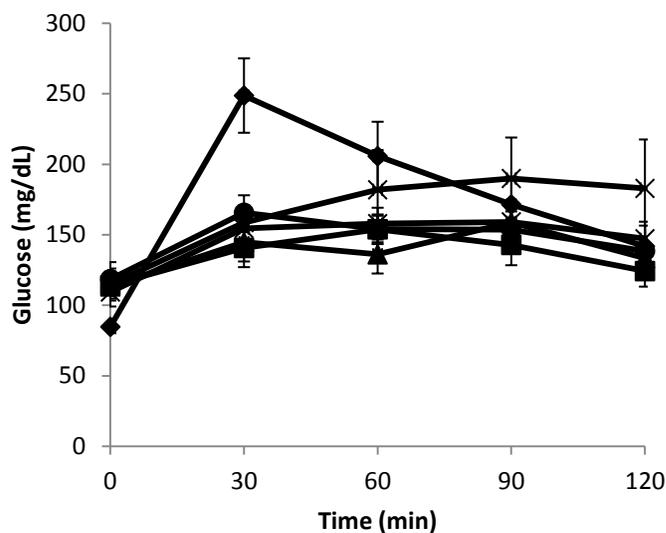
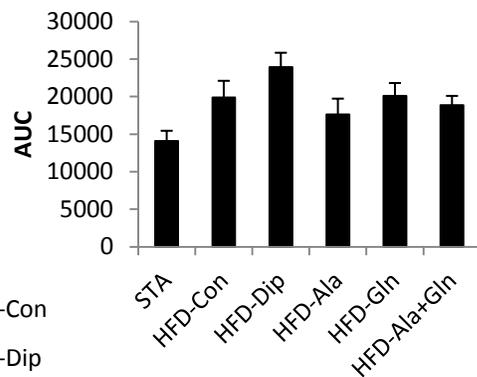
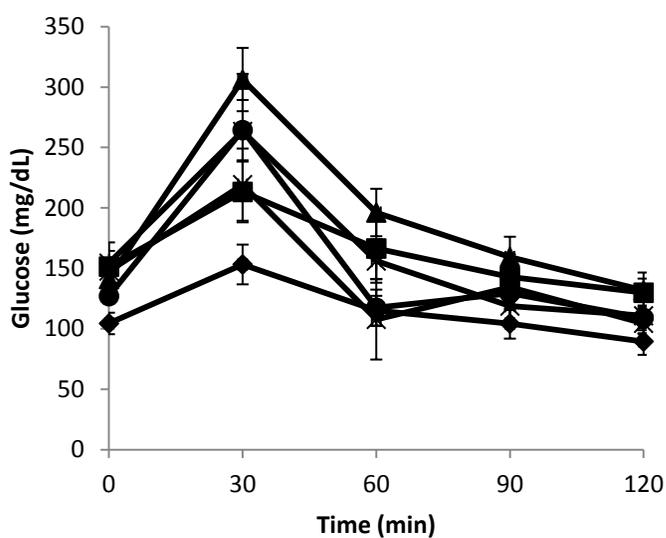


Figure 2
Click here to download Figure: Figure 2.pdf

A



B



C

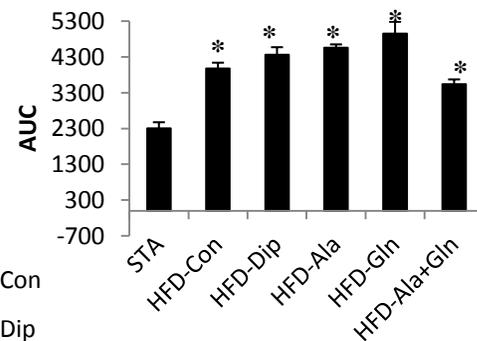
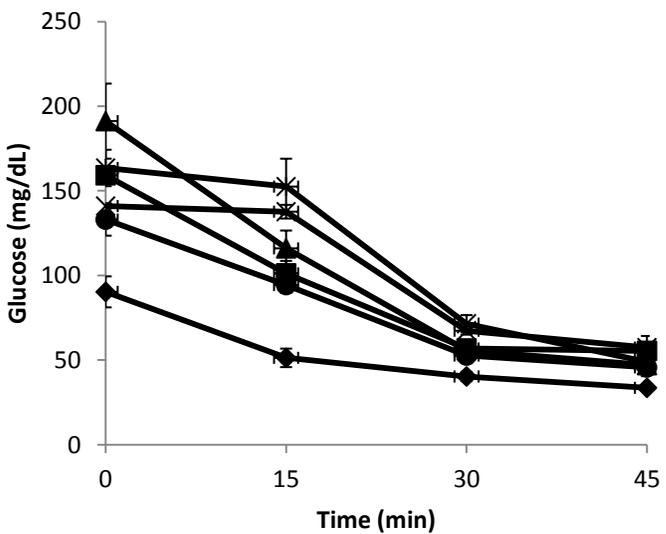
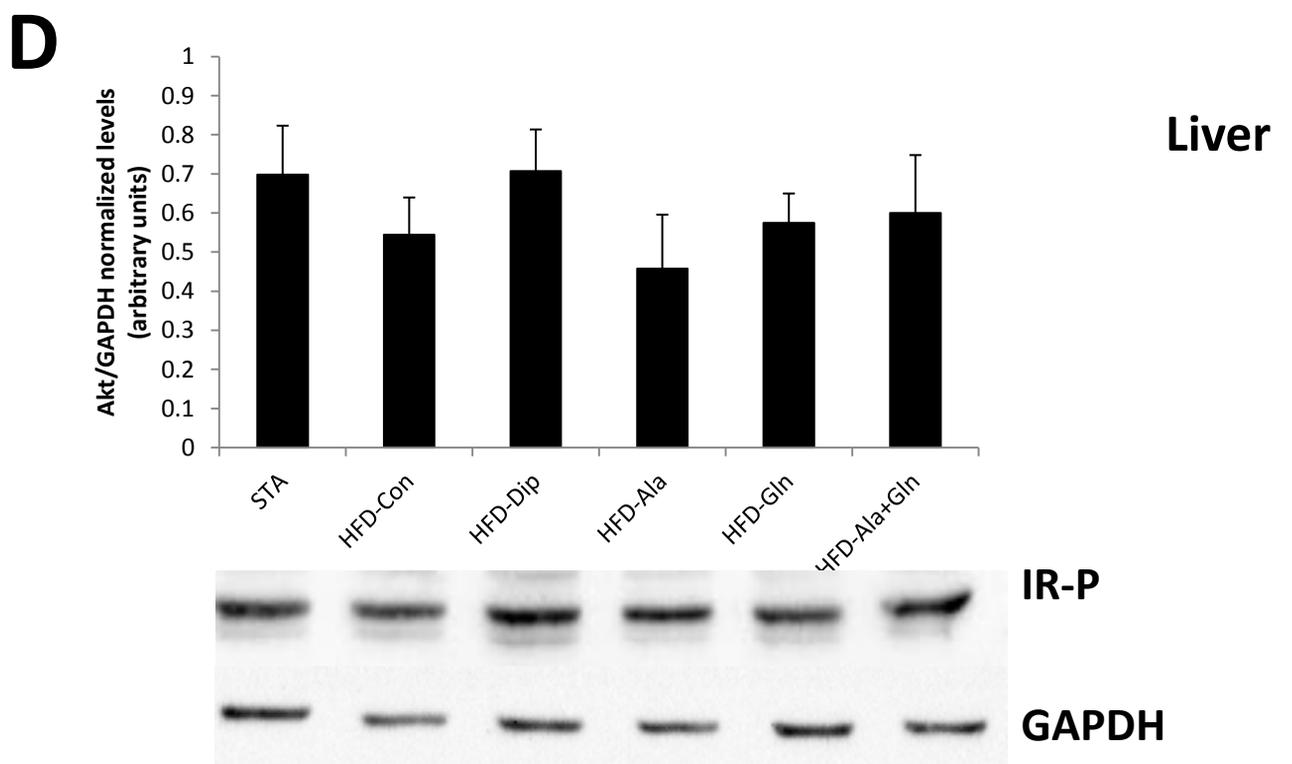
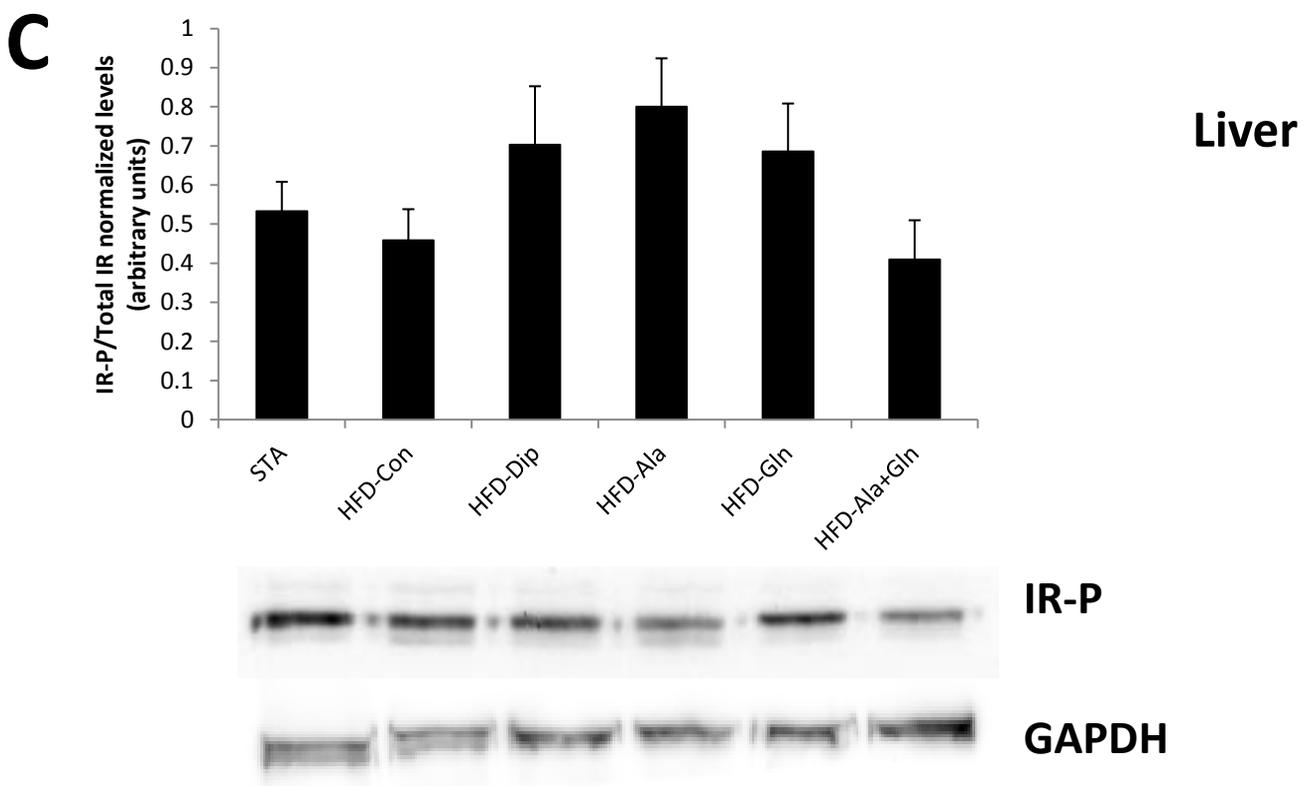
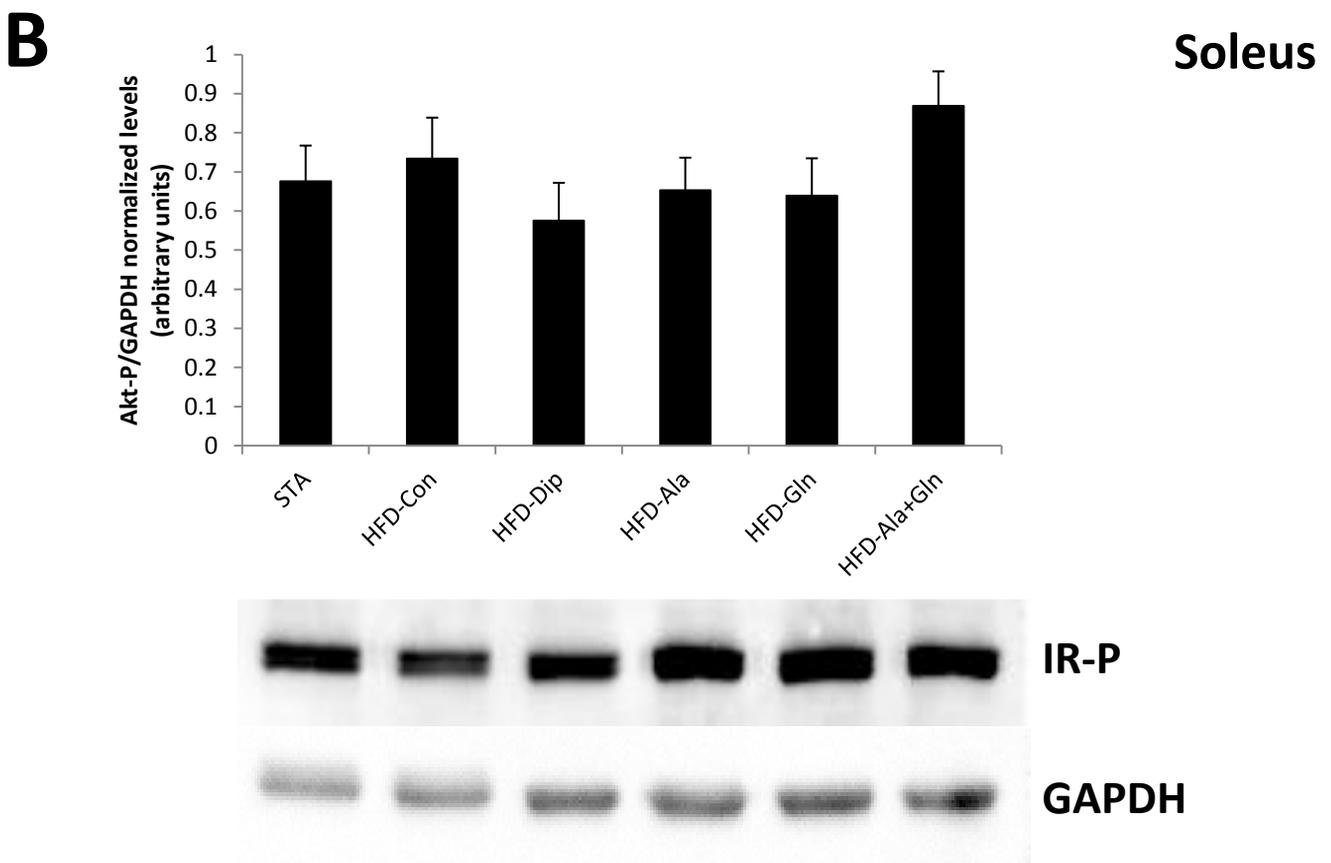
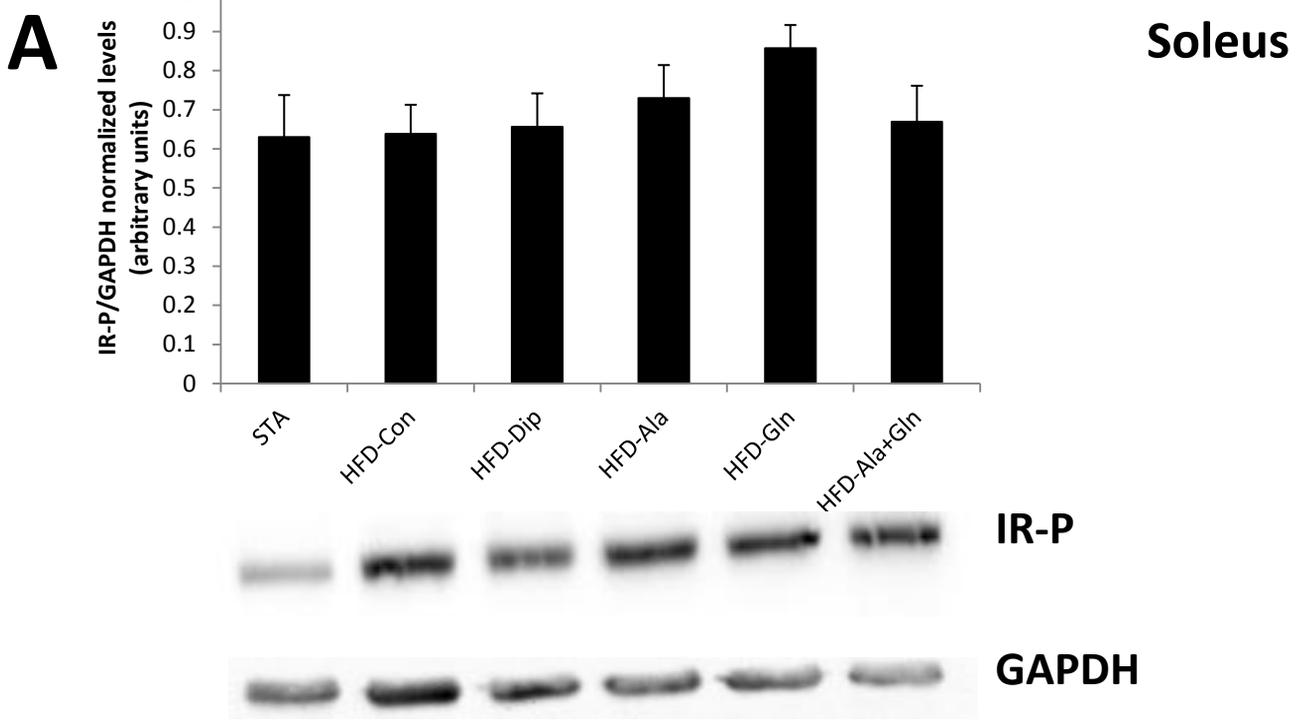
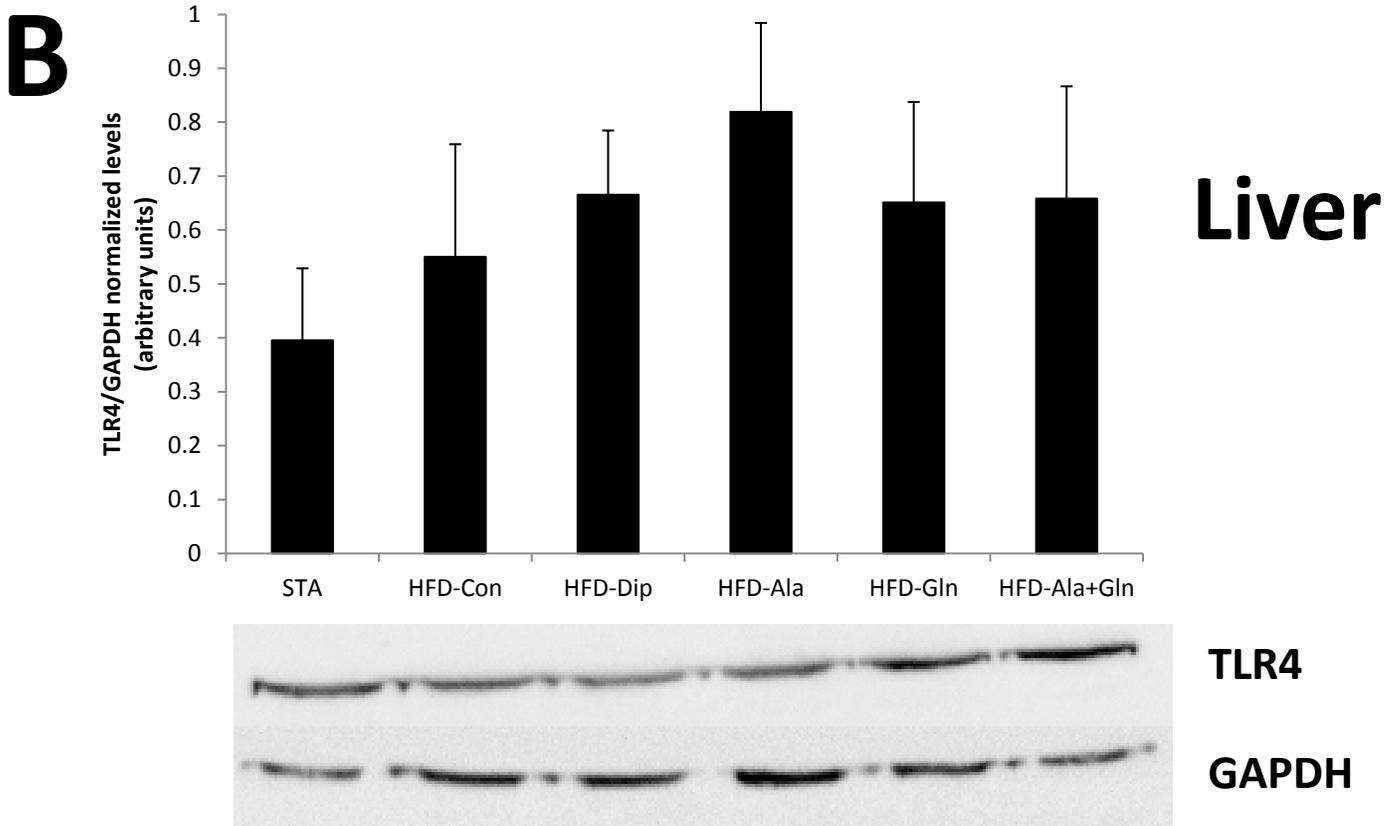
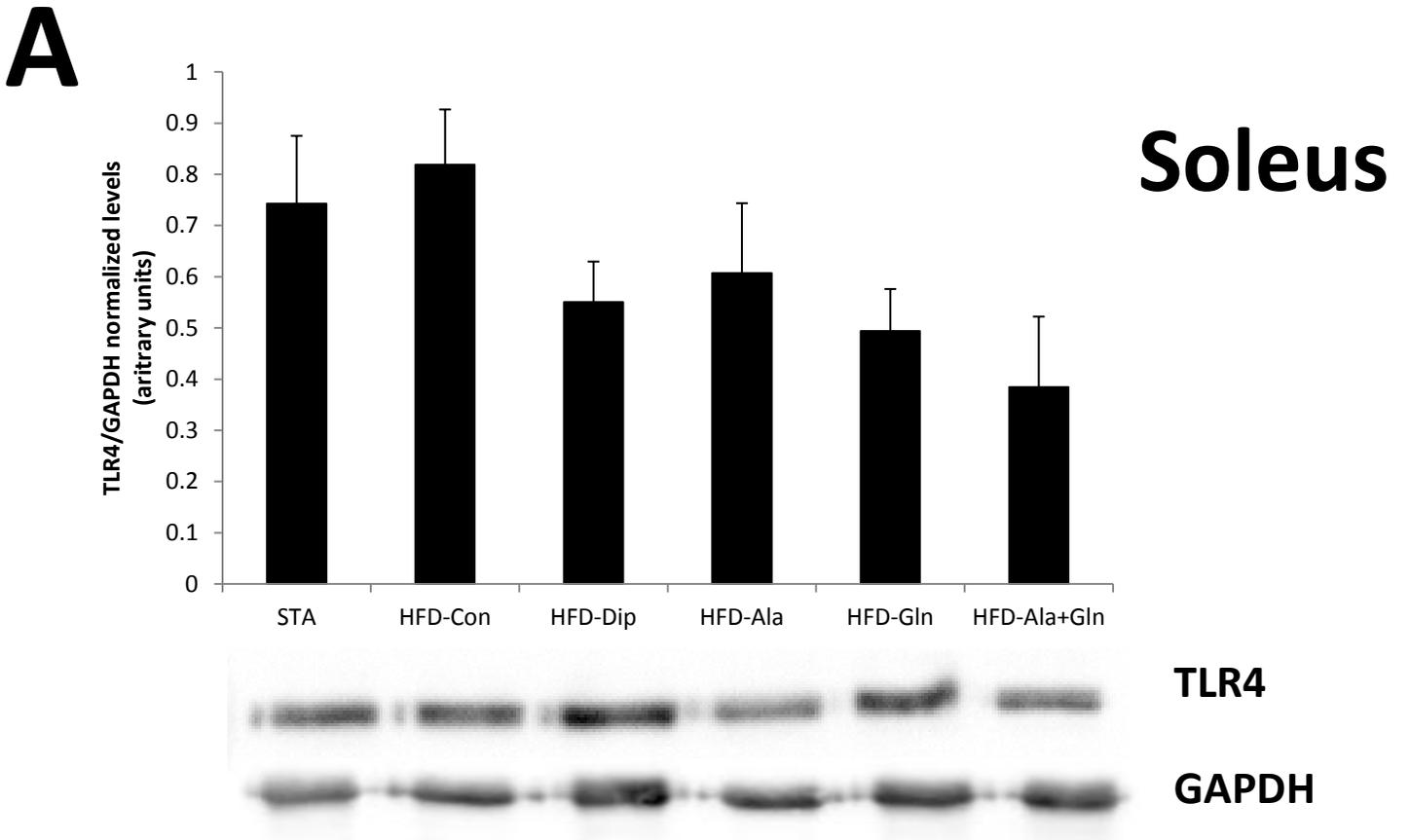
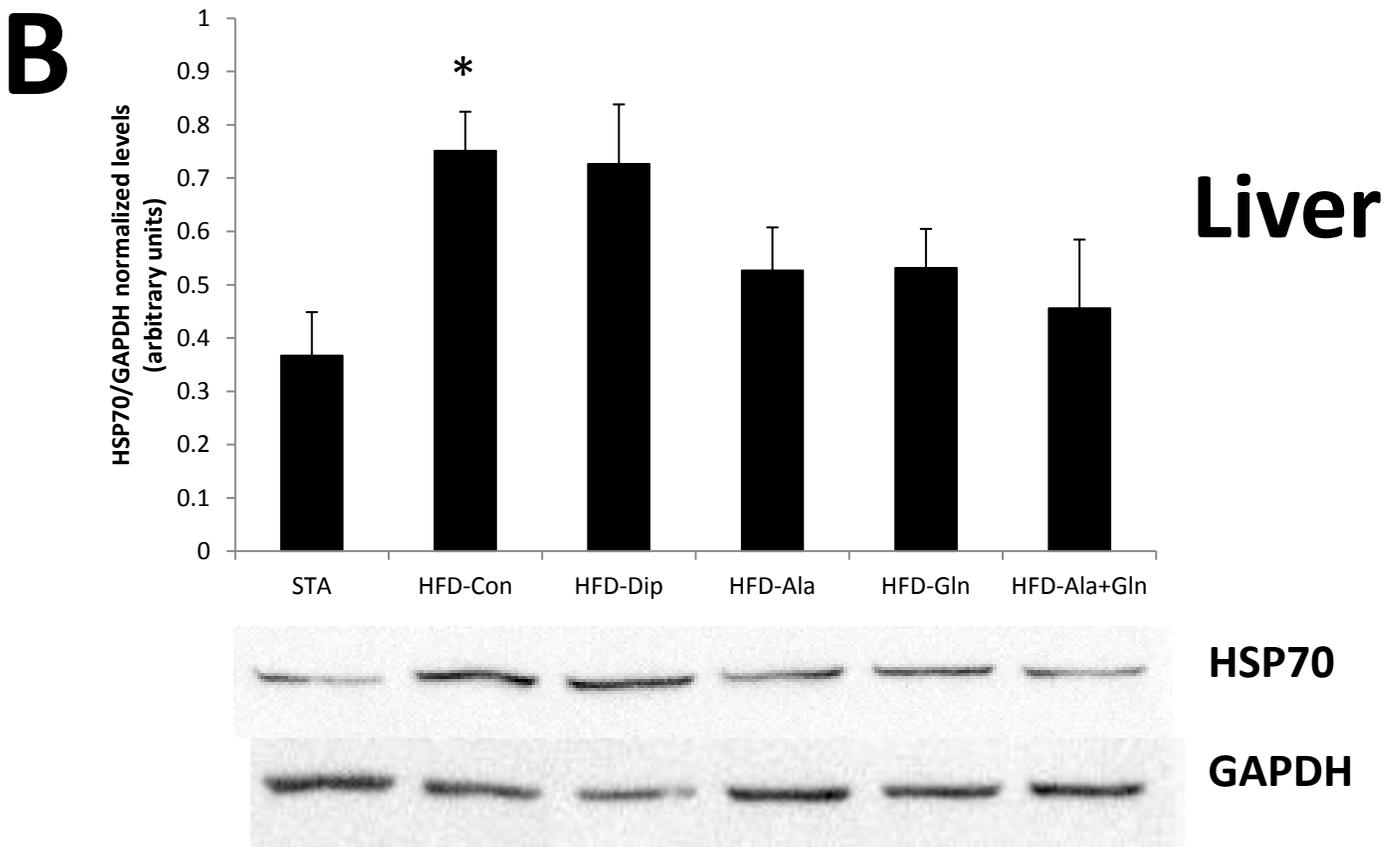
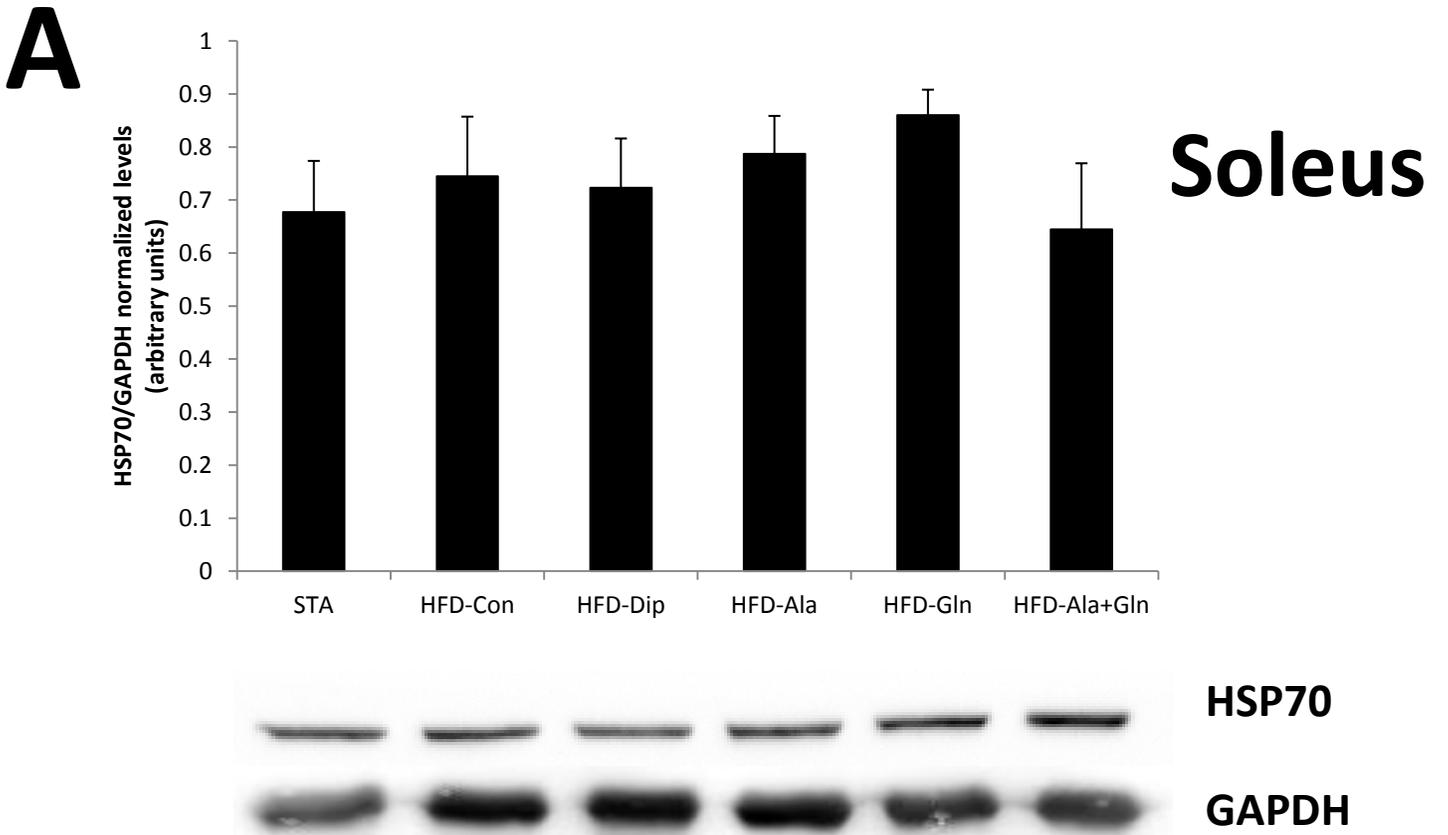


Figure 3

[Click here to download Figure: Figure 3.pdf](#)





Supplementary Figure S1

[Click here to download Supplementary Material: Suppl Fig. S1.pdf](#)