

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

SILVIA CARLA SANTANA FERREIRA AZEVEDO

**EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO ENTRE INSULINOTERAPIA E  
SUPLEMENTAÇÃO ORAL COM L-GLUTAMINA SOBRE A  
MORFOFISIOLOGIA HEPÁTICA DE RATOS WISTAR DIABÉTICOS TIPO 1**

**Maringá**

**2019**

SILVIA CARLA SANTANA FERREIRA AZEVEDO

**EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO ENTRE INSULINOTERAPIA E  
SUPLEMENTAÇÃO ORAL COM L-GLUTAMINA SOBRE A  
MORFOFISIOLOGIA HEPÁTICA DE RATOS WISTAR DIABÉTICOS TIPO 1**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (área de concentração - Biologia Celular e Molecular), da Universidade Estadual de Maringá para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas.

Orientador: Maria Raquel Marçal Natali

Maringá

2019

SILVIA CARLA SANTANA FERREIRA AZEVEDO

**EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO ENTRE INSULINOTERAPIA E  
SUPLEMENTAÇÃO ORAL COM L-GLUTAMINA SOBRE A  
MORFOFISIOLOGIA HEPÁTICA DE RATOS WISTAR DIABÉTICOS TIPO 1**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (área de concentração - Biologia Celular e Molecular), da Universidade Estadual de Maringá para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas.

Orientador: Maria Raquel Marçal Natali

Aprovado em 28/08/2019

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dra. Maria Raquel Marçal Natali  
Universidade Estadual de Maringá - UEM

---

Dra. Maria Montserrat Dias Pedrosa  
Universidade Estadual de Maringá - UEM

---

Dr. Jurandir Fernando Comar  
Universidade Estadual de Maringá - UEM

---

Dra. Larissa Carla Lauer Schneider  
Universidade Estadual de Maringá - UEM

---

Dra. Márcia Aparecida Carrara  
Centro Universitário Ingá – UNINGÁ

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

A994e Azevedo, Sílvia Carla Santana Ferreira  
Efeitos da associação entre insulinoterapia e suplementação oral com L-glutamina sobre a morfofisiologia hepática de ratos Wistar diabéticos Tipo 1 / Sílvia Carla Santana Ferreira Azevedo. -- Maringá, PR, 2019.  
85 f.: figs., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Raquel Marçal Natali.  
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular), 2019.

1. Metabolismo hepático . 2. L-glutamina - Suplementação . 3. Diabetes mellitus tipo 1. 4. Reposição hormonal - Insulina. 5. Estresse oxidativo hepático. I. Natali, Maria Raquel Marçal , orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Biológicas. Departamento de Biologia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular). III. Título.


CDD 23.ed. 572.4



**ATA DA DEFESA DE TESE DA PÓS-GRADUANDA SILVIA CARLA SANTANA FERREIRA AZEVEDO.** Aos vinte e oito dias do mês de agosto de dois mil e dezenove, quarta-feira, realizou-se na sala 102 do bloco H79, no campus universitário, a sessão pública da defesa de tese intitulada: **“Efeitos da associação entre insulino terapia e suplementação oral com L-glutamina sobre a morfofisiologia hepática de ratos Wistar diabéticos tipo 1”**, apresentada pela pós-graduanda Sílvia Carla Santana Ferreira Azevedo, “Licenciada em Ciências Biológicas” pela Universidade Estadual de Maringá, que concluiu os créditos exigidos para obtenção do grau de “Doutora em Ciências Biológicas”. Os trabalhos foram instalados às 14 horas, pela professora Dra. Maria Raquel Marçal Natali, presidente da banca examinadora, e constituída pelos seguintes professores: Dra. Márcia Aparecida Carrara, Dra. Maria Montserrat Diaz Pedrosa, Dr. Jurandir Fernando Comar, Dra. Larissa Carla Lauer Schneider como membros. A banca examinadora, tendo se decidido a aceitar a tese, passou à arguição pública da candidata. Encerrados os trabalhos de arguição às 17:30 horas, os examinadores deram parecer final, considerando a tese Aprovada. Proclamado o resultado pela Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e lavrada a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora. Maringá, aos vinte e oito dias do mês de agosto de dois mil e dezenove.

  
Profa. Dra. Maria Raquel Marçal Natali

  
Profa. Dra. Márcia Aparecida Carrara

  
Profa. Dra. Maria Montserrat Diaz Pedrosa

  
Prof. Dr. Jurandir Fernando Comar

  
Profa. Dra. Larissa Carla Lauer Schneider

## **BIOGRAFIA**

Silvia Carla Santana Ferreira Azevedo nasceu em Maringá/PR em 26/05/1987. Em 2011 graduou-se em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Maringá. Em 2013 iniciou o programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Área de concentração – Biologia Celular e Molecular) em nível de mestrado, na Universidade Estadual de Maringá (UEM), cuja conclusão ocorreu em 2015. Em 2015 iniciou o nível de doutorado no mesmo programa. Tem experiência na área de Fisiologia, Histologia, Biologia Celular e Bioquímica, atuando nos temas Metabolismo Hepático, Histologia Hepática, L-glutamina e diabetes mellitus tipo 1.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois só ele sabe o caminho que percorri para chegar até aqui. Agradeço meus pais e irmão, pelo apoio incondicional. Agradecimento especial ao meu esposo, que é o meu amor e está sempre ao meu lado. Tudo que eu faço é por vocês.

À minha orientadora professora Dra. Maria Raquel por ter permanecido ao meu lado até a conclusão desse trabalho. À professora Dra. Vilma, que tem sido minha inspiração desde a graduação, e por toda ajuda na conclusão desse trabalho. Agradeço também a professora Dr. Maria Montserrat, que sempre me ajudou em todo esse processo.

As técnicas do laboratório de Fisiologia e Histologia por me auxiliarem em tudo que precisei nesses quatro anos. Agradecimento especial a Maria Ângela pelo apoio e palavras incentivadoras.

Aos professores Dr. Jurandir Fernando Comar e Dra. Anacharis Babeto de Sá pelo apoio e colaboração neste trabalho.

Aos meus amigos Dr. Carlos Dalto da Rosa, Me. Camila Bataglini, Me. Ana Luiza Wunderlich, Me. Nayra Branquinho, Me. Isabela Ramos, Me. Laís Yamada e Me. Thamara Thaianne pelo apoio emocional e laboratorial em todos os momentos. Eu aguentei a barra graças a vocês, meus queridos.

Ao meu filho Leonardo, que se faz presente nessa defesa dentro do forquinho. Todo meu esforço para defender esse trabalho é por você, filho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro para a execução deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas e a todos os professores e colegas pela oportunidade e apoio, junto a Universidade Estadual de Maringá.

Ao Departamento de Ciências Fisiológicas e Morfológicas pelo suporte todos esses anos.

Aos professores componentes desta banca, pela disponibilidade em avaliar nosso trabalho.

E a todos os demais que contribuíram nesta jornada, muito obrigado.

## APRESENTAÇÃO

Esta tese é composta de 2 artigos científicos intitulados “*A associação de L-glutamina oral com as Insulina Degludeca e Regular modifica os parâmetros plasmáticos e o estresse oxidativo hepático em modelo animal de diabetes tipo 1*” e “*Glutamina oral modula a ação da Insulina Degludeca e da Insulina Regular em ratos Wistar diabéticos tipo 1*”. Em consonância com as regras do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, os artigos foram redigidos de acordo com as normas das revistas.

O primeiro artigo será submetido a revista *Journal of Diabetes and Its Complications* (ISSN 1056-8727), fator de impacto 2.684. Qualis CAPES B1. Este artigo apresenta os efeitos da suplementação com L-glutamina associada a Insulina Degludeca ou Regular sobre parâmetros fisiológicos, bioquímicos e estresse oxidativo hepático. As normas desta revista se encontram em anexo (<https://www.elsevier.com/journals/journal-of-diabetes-and-its-complications/1056-8727/guide-for-authors>).

O segundo artigo será submetido a revista *Diabetes & Metabolism* (ISSN 1262-3636), fator de impacto 4.008. Qualis CAPES B2. Este artigo apresenta os efeitos da suplementação com L-glutamina associada a Insulina Degludeca ou Regular sobre parâmetros fisiológicos, metabolismo hepático de glicose e L-lactato e histologia hepática. As normas desta revista se encontram em anexo (<https://www.elsevier.com/journals/diabetes-and-metabolism/1262-3636/guide-for-authors>).



## RESUMO GERAL

**INTRODUÇÃO:** O diabetes mellitus tipo 1 (T1DM) é uma doença crônica resultante da destruição imunológica das células  $\beta$ -pancreáticas, que leva a perda da secreção endógena de insulina. A incapacidade dos tecidos insulino-dependentes de captar glicose leva a desregulação do metabolismo hepático de glicose, o que resulta em hiperglicemia. Vários tipos de insulina são utilizados na reposição hormonal obrigatória de pacientes T1DM, que variam entre ultrarápida, rápida, intermediária e de longa duração. Por outro lado, o aminoácido L-glutamina (GLN) tem a capacidade de promover redução do estresse oxidativo e das complicações crônicas associadas ao T1DM, porém sua concentração plasmática encontra-se geralmente diminuída nestes pacientes. Isto abre a possibilidade de suplementação da GLN concomitante com a reposição hormonal com insulina.

**OBJETIVOS:** Avaliar os efeitos da reposição hormonal com Insulina Degludeca (longa duração - basal) ou Insulina Regular (duração rápida), associadas ou não à suplementação oral com GLN, sobre parâmetros fisiológicos e plasmáticos, estresse oxidativo, metabolismo hepático e sobre as características histológicas do fígado de ratos Wistar T1DM.

**METODOLOGIA:** Ratos Wistar machos (50 dias de idade) foram distribuídos em um grupo padronização (P) e sete grupos experimentais. No grupo P, os animais diabéticos foram utilizados para caracterização da dose-resposta da Insulina Degludeca sobre a glicemia. Os sete grupos experimentais foram distribuídos em: Grupo controle (C), diabético (D), diabético com GLN (DG), diabético com Insulina Degludeca (DIT), diabético com Insulina Degludeca e GLN (DITG), diabético com Insulina Regular (DIR) e diabético com Insulina Regular e GLN (DIRG). Os animais receberam suplementação oral diária durante 30 dias com solução salina 0,9% ou GLN 400 mg/Kg e, também, injeção subcutânea de solução salina 0,9% ou Insulina Degludeca (5,0 U/Kg), ou ainda injeção intraperitoneal de Insulina Regular (1,0 U/Kg). Durante o tratamento, a glicemia em jejum e pós-prandial, ingestão alimentar e massa corporal foram avaliadas semanalmente. Passado o período de tratamento, os animais foram submetidos

a eutanásia por sobredose anestésica e amostras de sangue foram coletadas, via punção cardíaca, para dosagem de glicose, frutossamina, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), proteínas totais, ureia e amônia, avaliação da capacidade antioxidante total (TAC) e avaliação de parâmetros bioquímicos relacionados ao perfil lipídico. Ainda, o fígado foi coletado e amostras foram processadas para análise morfológica e histoquímica. Em cortes corados em Hematoxilina-Eosina avaliou-se o número e área de hepatócitos e, em cortes corados com Ácido Periódico de Schiff, avaliou-se o percentual de glicogênio intracelular. Amostras de fígado também foram utilizadas para avaliação do estresse oxidativo hepático. Uma alíquota de fígado homogeneizado com tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,4) foi utilizado para determinar o conteúdo de glutatona oxidada (GSSG) e reduzida (GSH) em espectrofluorímetro. O homogenato remanescente foi centrifugado e o sobrenadante utilizado para determinar a atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) e os níveis das proteínas carboniladas em espectrofotômetro. Para análise do metabolismo hepático de glicose, animais em jejum foram anestesiados e submetidos à técnica de perfusão com colagenase 3%; os hepatócitos isolados foram incubados durante 1 hora na ausência ou presença dos agentes glicogenolíticos glucagon, cortisol, adrenalina, isoproterenol (agonista  $\beta$ -adrenérgico), e dos substratos gliconeogênicos como o glicerol, L-lactato, L-alanina ou L-glutamina. Por fim, após centrifugação, os líquidos de incubação foram utilizados para determinação da glicose e L-lactato. Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão. A determinação da dose de Insulina Degludeca foi feita por teste 't' de Student. Os dados paramétricos foram comparados por análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey. Os dados não-paramétricos foram comparados por análise de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunns,  $p < 0,05$ .

**RESULTADOS E DISCUSSÃO:** A dose de 5,0 U/Kg da Insulina Degludeca promoveu redução ( $p < 0,05$ ) da glicemia no estado alimentado (8h, 3º dia) e após jejum noturno (8h, 4º dia) e, dessa forma, foi a dose escolhida para o tratamento nos grupos DIT e DITG. T1DM promoveu aumento das glicemias de jejum e pós-prandial e perda de massa corporal, o que são características da doença. A reposição hormonal com a Insulina Degludeca (DIT) foi eficaz em diminuir a

glicemia de jejum com 30 dias de tratamento, embora sem alcançar os valores do grupo C. Já a perda de massa corporal foi menor nos grupos tratados com ambas insulinas (DIT e DIR), sendo que GLN interferiu nesse parâmetro quando associado a Insulina Regular (DIRG). As diferenças entre as cinéticas de liberação das insulinas do tecido subcutâneo para a corrente sanguínea, pode ter sido responsável pelos efeitos fisiológicos observados. A ausência de insulina em T1DM promove alterações na lipólise, proteólise e injúria tecidual associada a hiperglicemia. A produção excessiva de triglicérides em T1DM, foi aumentada pela Insulina Degludeca, o que pode estar associada a redução da glicemia de jejum via aumento da lipogênese *de novo* hepática a partir da glicose circulante. Além disso, a ausência de alterações no padrão de ingestão alimentar associado à redução da perda de massa corporal podem indicar um efeito diferenciado desta insulina sobre a regulação da lipólise e do nível de degradação proteica. A Insulina Regular também promoveu um aumento dos triglicérides, todavia, este aumento foi 50% menor comparado a DIT. A associação de GLN aos grupos tratados com ambas insulinas parece atenuar os efeitos do diabetes no que diz respeito ao perfil lipídico. Os grupos tratados com Degludeca (DIT e DITG) foram capazes de aumentar a concentração de proteínas totais e diminuir as dosagens de ureia em relação ao grupo diabético D, o que indica um efeito positivo dessa insulina sobre esse aspecto e pode estar relacionado com a menor degradação proteica e preservação de massa corporal observado nesses grupos. A GLN isolada, ou associada a Insulina Regular, não interferiu nesses parâmetros, demonstrando um efeito de Degludeca *per se*. Embora GLN (DG) não tenha alterado as dosagens de frutamina, aumentou em 2 vezes os valores de AST e ALT, o que necessita de maiores investigações. A adição de GLN a Insulina Regular também aumentou as dosagens das transaminases a valores excessivos, o que poderia indicar a influência desse aminoácido sobre a expressão de determinadas proteínas e vias metabólicas, que influenciariam o acúmulo de lipídios ou a inflamação. Por outro lado, o tratamento com Degludeca reduziu todos esses parâmetros. Ambas insulinas promoveram aumento de CAT e SOD e diminuição das proteínas carboniladas. No entanto, a adição de GLN à Insulina Regular promoveu aumento nos níveis de GSH, GSH+GSSG e GSH/GSSG. Todos os grupos diabéticos apresentaram aumento da área dos hepatócitos, no entanto, somente em DIT isto foi acompanhado de maior

acúmulo de glicogênio. A adição de GLN (DITG) promoveu diminuição desse acúmulo e da área, e restaurou o número de hepatócitos, diminuído em DIT. Dessa forma, a redução dos triglicerídeos e do conteúdo de glicogênio em DITG podem ser responsáveis pela falta de efeitos sobre a glicemia de jejum. Na ausência (basal) e presença de todos os precursores gliconeogênicos utilizados, T1DM promoveu diminuição da capacidade gliconeogênica, o que pode ser devido a um desvio da glicose para síntese indireta de glicogênio. Dessa forma, o acúmulo de glicogênio encontrado pode ser resultado tanto da síntese de glicogênio, como da hiperglicemia e da deterioração do sistema contrarregulador da glicemia. Para todos os precursores gliconeogênicos testados, o aumento da produção de glicose observado em DIT, pode ser um dos fatores responsáveis pelo maior acúmulo de glicogênio e hipertrigliceridemia via lipogênese de novo (LDN) a partir do excedente de glicose. A associação com GLN (DITG) reverte ambos parâmetros, que pode ser devido a redução da gliconeogênese. Ambas as insulinas aumentam a capacidade e a intensidade da resposta glicogenolítica. Esse efeito foi compartilhado pela GLN isolada (DG), indicando um efeito da GLN *per se*, e não da associação sobre este parâmetro. Por outro lado, a GLN, isolada e associada as insulinas, aproxima os valores  $\beta$ -adrenérgicos dos valores do grupo D, não promovendo a melhora esperada. A associação das insulinas com GLN também resultou em alterações contrárias na produção de L-lactato, basal e estimulado, resultando em aumento em DITG e diminuição em DIRG. Isso pode ter ocorrido devido a alteração no potencial redox, sem interferir com a gliconeogênese. Os tratamentos não alteraram a produção de L-lactato a partir da L-alanina, mas aumentaram a produção de glicose. De modo geral, na presença de glicerol e L-glutamina, a produção de L-lactato aumentou nos grupos tratados, mesmo o L-lactato não sendo produto direto desses precursores, o que pode indicar que estes tenham tornado o ambiente celular reduzido.

**CONCLUSÃO:** A associação de GLN com as insulinas atenua os efeitos do diabetes sobre o perfil lipídico e conteúdo de glicogênio hepático. A produção exacerbada de VLDL e triglicerídeos, e o elevado estoque de glicogênio, podem estar associados a redução da glicemia de jejum, com 30 dias de tratamento com Degludeca. A elevada gliconeogênese hepática sugere que o mecanismo seja

via lipogênese *de novo*. A GLN associada a Degludeca normaliza as transaminases plasmáticas, mas somente GLN associada a Insulina Regular modifica a glutatona do sangue. Pelo fato dos diferentes tipos de Insulina apresentarem perfis regulatórios diferenciados e a GLN modificar a ação insulínica, a utilização da GLN não deve ser indiscriminada em estados catabólicos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Metabolismo Hepático, Insulina Degludeca, Insulina Regular, L-glutamina, Diabetes tipo 1, Estresse oxidativo hepático

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Type 1 diabetes mellitus (T1DM) is a chronic disease resulting from the immune destruction of  $\beta$ -pancreatic cells, which leads to loss of endogenous insulin secretion. The inability of insulin-dependent tissues to collect glucose leads to dysregulation of hepatic glucose metabolism which results in hyperglycemia. Several types of insulin are used in the compulsory hormone replacement of T1DM patients, ranging from ultrafast, fast, intermediate and long-term. On the other hand, the amino acid L-glutamine (GLN) has the ability to reduce oxidative stress and chronic complications associated with T1DM, however, its plasma concentration are generally decreased in these patients. This opens the possibility of GLN supplementation concomitant with hormone replacement with insulin.

**AIMS:** Evaluate the effects of hormone replacement with Degludeca Insulin (long duration - basal) or Regular Insulin (rapid duration), associated or not with oral supplementation with GLN, on physiological and plasma parameters, oxidative stress, liver metabolism and liver histological characteristics of Wistar T1DM rats.

**METHODS:** Male Wistar rats (50 days old) were divided into one standardization group (P) and seven experimental groups. In P group, diabetic animals were used to characterize the dose response of Degludeca insulin on blood glucose. The seven experimental groups were divided into: Control group (C), diabetic (D), diabetic with GLN (DG), diabetic with Degludeca insulin (DIT), diabetic with Degludeca insulin and GLN (DITG), diabetic with Regular Insulin (DIR) ) and diabetic with Regular Insulin and GLN (DIRG). The animals received daily oral supplementation for 30 days with 0.9% saline or GLN 400 mg / kg and also subcutaneous injection of 0.9% saline or Degludeca Insulin (5.0 U / Kg), or intraperitoneal injection of Regular Insulin (1.0 U / kg). During treatment, fasting and postprandial blood glucose, food intake and body mass was assessed weekly. After the treatment period, the animals was euthanized by anesthetic overdose and blood samples were collected via cardiac puncture for glucose, fructosamine, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total protein, urea and ammonia, evaluation of total antioxidant capacity

(TAC) and evaluation of biochemical parameters related to lipid profile. In addition, the liver was collected and samples were processed for morphological and histochemical analysis. In hematoxylin-eosin stained sections, the number and area of hepatocytes were evaluated, and in sections stained with Schiff Periodic Acid, the percentage of intracellular glycogen was evaluated. Liver samples were also used for evaluation of hepatic oxidative stress. An aliquot of liver homogenized with 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4) was used to determine the oxidized (GSSG) and reduced (GSH) glutathione content in a spectrofluorimeter. The remaining homogenate was centrifuged and the supernatant used to determine the activity of catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) antioxidant enzymes and carbonylated protein levels in a spectrophotometer. For analysis of hepatic glucose metabolism, fasting animals were anesthetized and submitted to the 3% collagenase perfusion technique; isolated hepatocytes were incubated for 1 hour in the absence or presence of glycogenolytic agents glucagon, cortisol, adrenaline, isoproterenol ( $\beta$ -adrenergic agonist), or gluconeogenic substrates such as glycerol, L-lactate, L-alanine or L-glutamine. Finally, after centrifugation, incubation fluids were used to determine glucose and L-lactate. Results were presented as mean  $\pm$  standard error. Parametric data were compared by analysis of variance (ANOVA) and Tukey post-test. Nonparametric data were compared by Kruskal-Wallis analysis and Dunns post-test,  $p < 0.05$ .

**RESULTS AND DISCUSSION:** The 5.0 U / kg dose of Degludec Insulin caused a reduction ( $p < 0.05$ ) of blood glucose in the fed state (8h, 3rd day) and after night fasting (8h, 4th day) and was the dose chosen for treatment in the DIT and DITG groups. T1DM promoted increase in fasting and postprandial blood glucose levels and loss of body mass, which are characteristic of the disease. Hormone replacement with Degludec Insulin (DIT) was effective in decreasing fasting blood glucose after 30 days of treatment, although without reaching the values of group C. The loss of body mass was lower in the groups treated with both insulins (DIT and DIR), and GLN interfered with this parameter when associated with Regular Insulin (DIRG). The differences between the kinetics releases of insulins from subcutaneous tissue to the bloodstream may have been responsible for the observed physiological effects. Absence of insulin in T1DM promotes changes in

lipolysis, proteolysis and tissue injury associated with hyperglycemia. Degludec Insulin increased excessive triglyceride production in T1DM, which may be associated with reduced fasting glucose via increased new hepatic lipogenesis from circulating glucose. In addition, the absence of changes in dietary intake pattern associated with reduced body mass loss may indicate a differentiated effect of this insulin on the regulation of lipolysis and the level of protein degradation. Regular Insulin promoted an increase in triglycerides, however, this increase was 50% lower compared to DIT. The association of GLN with the groups treated with both insulins seems to attenuate the effects of diabetes regarding the lipid profile. Degludec treated groups (DIT and DITG) were able to increase total protein concentration and decrease urea dosages compared to diabetic group D which indicates a positive effect of this insulin on this aspect and may be related to lower protein degradation and preservation of body mass observed in these groups. GLN alone or associated with Regular Insulin didn't interfere with these parameters, demonstrating an effect of Degludec per se. Although GLN (DG) didn't change the fructosamine dosages and increased in 2 times the AST and ALT values which needs further investigation. The addition of GLN to Regular Insulin also increased transaminase dosages to excessive values which could indicate the influence of this amino acid on the expression of certain proteins and metabolic pathways that would influence lipid accumulation or inflammation. On the other hand, treatment with Degludec reduced all these parameters. Both insulins promoted increase of CAT and SOD and decrease of carbonylated proteins. However, the addition of GLN to Regular Insulin promoted increase in GSH, GSH + GSSG and GSH / GSSG levels. All diabetic groups showed increase hepatocyte area; however, only in DIT this was accompanied by higher glycogen accumulation. The addition of GLN (DITG) promoted decrease of this accumulation and area, and restored the number of hepatocytes, decreased in DIT. Therefore, the reduction in triglycerides and glycogen content in DITG may be responsible for the lack of effects on fasting glucose. In the absence (basal) and presence of all gluconeogenic precursors used, T1DM promoted decrease in gluconeogenic capacity, which may be due to a deviation of glucose for indirect glycogen synthesis. Thus, the accumulation of glycogen may be the result of both glycogen synthesis, hyperglycemia and deterioration of the glycemic counterregulatory system. For all gluconeogenic



precursors tested, the increase glucose production observed in DIT may be one of the factors responsible for the higher glycogen accumulation and hypertriglyceridemia via de novo lipogenesis (LDN) from glucose surplus. The association with GLN (DITG) reverse both parameters, which may be due to reduced gluconeogenesis. Both insulins increase the capacity and intensity of the glycogenolytic response. This effect was shared by GLN alone (DG), indicating an effect of GLN *per se* rather than the association on this parameter. On the other hand, GLN isolated and associated with insulins approximates the  $\beta$ -adrenergic values to those of group D, not promoting the expected improvement. The association of insulin with GLN also resulted in contrary changes in basal and stimulated L-lactate production, resulting in increase in DITG and decrease in DIRG. This may have occurred to a change in redox potential without interfering with gluconeogenesis. The treatments didn't alter L-lactate production from L-alanine, but increased glucose production. In general, in the presence of glycerol and L-glutamine, L-lactate production increased in the treated groups, even though L-lactate was not a direct product of these precursors which may indicate that they have reduced the cellular environment.

**CONCLUSION:** The association of GLN with insulins attenuate the effects of diabetes on lipid profile and hepatic glycogen content. Exacerbated production of VLDL and triglycerides, and high glycogen stores may be associated with reduced fasting glucose with 30 days of treatment with Degludec. The elevated hepatic gluconeogenesis suggest that the mechanism is via de novo lipogenesis. GLN associated with Degludec Insulin normalize plasma transaminases but only GLN associated with Regular Insulin modifies blood glutathione. Because different types of insulin have different regulatory profiles and GLN modifies insulin action, the use of GLN shouldn't be indiscriminate in catabolic patients

**KEYWORDS:** Hepatic Metabolism, Degludec Insulin, Regular Insulin, L-glutamine, Type 1 Diabetes, Hepatic Oxidative Stress.

## SUMÁRIO

<b>1. Artigo científico 1:</b> A associação de L-glutamina oral com as Insulinas Degludeca e Regular modifica os parâmetros plasmáticos e o estresse oxidativo hepático em modelo animal de Diabetes tipo 1 .....	20
1.1. Resumo .....	21
1.2 Abstract .....	22
1.3 Introdução .....	23
1.4 Materiais e métodos .....	25
1.5 Resultados .....	29
1.6 Discussão.....	37
1.7 Conclusão .....	43
1.8 Agradecimentos .....	44
1.9 Referências .....	45
<b>2. Artigo Científico 2:</b> Glutamina oral modula a ação da Insulina Degludeca e da Insulina Regular em ratos Wistar Diabéticos tipo 1 .....	51
2.1 Resumo .....	52
2.2 Abstract .....	53
2.3 Introdução .....	54
2.4 Materiais e Métodos .....	55
2.5 Resultados e Discussão .....	59
2.6 Conclusão .....	70
2.7 Referências .....	71
<b>3. Considerações Finais .....</b>	<b>75</b>
<b>4. ANEXO I:</b> Normas da revista Journal of Diabetes and Its Complications ....	<b>77</b>
<b>5. ANEXO II:</b> Normas da Revista Diabetes & Metabolism .....	<b>80</b>
<b>6. ANEXO III:</b> Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais - UEM .....	<b>82</b>
<b>7. ANEXO IV:</b> Bula Insulina Degludeca (Tresiba®, Novo Nordisk®) .....	<b>84</b>
<b>8. ANEXO V:</b> Bula Insulina Regular (Humulin® R, Eli Lilly®) .....	<b>85</b>



**A ASSOCIAÇÃO DE L-GLUTAMINA ORAL COM AS INSULINAS DEGLUDECA OU REGULAR MODIFICA OS PARAMETROS PLASMÁTICOS E O ESTRESSE OXIDATIVO HEPÁTICO EM MODELO ANIMAL DE DIABETES TIPO 1**

Silvia Carla Santana Ferreira Azevedo<sup>1\*</sup>, Ana Luiza Machado Wunderlich<sup>2</sup>, Laís Akemi Yamada<sup>2</sup>, Vilma Aparecida Ferreira de Godoi<sup>2</sup>, Maria Raquel M. Natali<sup>1</sup>

1. Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil.

2. Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil.

\*Autor correspondente: [silviacarlasantana@gmail.com](mailto:silviacarlasantana@gmail.com)

Endereço: Avenida Colombo, 5790. Bloco H79, sala 101, Campus Universitário.  
CEP 87030-900, Maringá, PR. Fone: (44) 3011-4704

## RESUMO

Considerando a necessidade diária de insulina e os efeitos metabólicos/reguladores da L-glutamina (GLN) no diabetes mellitus tipo 1 (T1DM), o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da reposição hormonal com as Insulinas Degludeca ou Regular, associadas ou não a GLN. Foram utilizados ratos Wistar T1DM distribuídos em 8 grupos e foram avaliados os parâmetros fisiológicos, bioquímicos e o estresse oxidativo hepático. A Insulina Degludeca reduziu a glicemia de jejum sem restabelecer a normoglicemia, promoveu menor perda de peso e melhorou significativamente parâmetros bioquímicos sanguíneos e do estresse oxidativo hepático. Embora a Insulina Regular não tenha alterado os parâmetros fisiológicos, também promoveu melhora dos parâmetros bioquímicos sanguíneos e do estresse oxidativo hepático. A GLN aumentou os valores plasmáticos dos indicadores de lesão hepática (AST e ALT), no entanto, associada as insulinas, diminuiu os níveis de triglicerídeos e proteínas carboniladas, e aumentou a atividade da catalase e superóxido dismutase. As diferenças encontradas entre os diferentes tratamentos demonstram que a suplementação com GLN interfere com a ação insulínica nos tecidos. Portanto, a utilização de GLN em diabéticos tipo 1 não deve ser indiscriminada e necessita de ampla avaliação metabólica.

**Palavras-chave:** Insulina degludeca, L-glutamina, Estresse oxidativo hepático, Diabetes mellitus tipo 1, Insulina regular

## ABSTRACT

Considering the daily need for insulin and the metabolic/regulatory effects of L-glutamine (GLN) in type 1 diabetes mellitus (T1DM), the aim of this study was to evaluate the effects of hormone replacement with Degludeca or Regular Insulin, whether or not associated with GLN. Wistar T1DM rats were used and distributed in 8 groups. Were evaluated the physiological, biochemical parameters and liver oxidative stress. Insulin Degludeca reduced fasting glucose without restoring normoglycemia, promoted less weight loss and improved blood biochemical parameters and liver oxidative stress. Although Regular Insulin didn't have altered the physiological parameters, it also improved blood biochemical parameters and liver oxidative stress. GLN increased plasma values that indicates liver injury (AST and ALT), however, associated with insulin, decreased triglycerides and carbonylated proteins, and increased the activity of catalase and superoxide dismutase. The differences found between the different treatments demonstrate that GLN supplementation interferes with insulin action in the tissues. The differences found between the different treatments demonstrate that GLN supplementation interferes with insulin action in the tissues. Therefore, the use of GLN in type 1 diabetics shouldn't be indiscriminate and requires extensive metabolic evaluation.

**Keywords:** Degludec insulin, L-glutamine, Liver oxidative stress, Type 1 diabetes mellitus, Regular insulin

## INTRODUÇÃO

Todos os nutrientes provenientes da dieta são absorvidos pelos enterócitos e atinge o fígado, via veia porta, antes de ganhar a circulação sistêmica<sup>1</sup>. O fígado desempenha funções importantes, relacionadas com a síntese de macromoléculas, desintoxicação e tem papel central no metabolismo energético<sup>2</sup>. Por ser um órgão intensivamente envolvido com o metabolismo da glicose, ele é afetado por doenças metabólicas como o diabetes.

O Diabetes mellitus tipo 1 (T1DM) é uma desordem metabólica crônica que resulta da perda da secreção de insulina pelas células  $\beta$ -pancreáticas, levando ao desenvolvimento de um quadro de hiperglicemia<sup>3</sup>. É caracterizada por inflamação crônica, que leva a disfunções vasculoneuropáticas ao longo da vida e ao estresse oxidativo<sup>4</sup>. Em quantidades moderadas, as espécies reativas de oxigênio (EROs) são fisiologicamente importantes, no entanto, quando sua produção excede a capacidade de neutralização do sistema antioxidante, eles podem promover danos irreversíveis ao DNA, lipídios, proteínas e vias metabólicas<sup>5</sup>. Os danos promovidos por EROs podem, inclusive, causar prejuízo funcional aos tecidos, o que caracteriza o quadro de estresse oxidativo<sup>6</sup>. No T1DM, o estresse oxidativo se manifesta, em grande parte, devido a hiperglicemia. A glicose da corrente sanguínea promove o surgimento dos produtos de glicação avançada (AGEs), aumento do fluxo através da via dos polióis e a ativação de isoformas da proteína C quinase. Todos esses fenômenos contribuem no desenvolvimento das complicações associadas ao diabetes<sup>7,8</sup>.

A L-glutamina é o aminoácido mais abundante no plasma sanguíneo<sup>9</sup> e sua concentração varia em função da razão síntese/consumo pelo organismo. Apresenta papel importante em atenuar processos inflamatórios<sup>10</sup> e seu efeito protetivo quando suplementado advém de suas propriedades antioxidantes, mediadas pela glutatona, e seus alvos moleculares específicos, como fatores de transcrição. Além disso, tem a capacidade de regular a expressão gênica de proteínas relacionadas ao metabolismo energético via *swelling* celular<sup>11,12</sup>. A redução patológica da GLN plasmática e sua reposição, vem sendo amplamente utilizada com resultados positivos para indivíduos catabólicos, inclusive diabéticos, o que a torna um bom alvo para suplementação<sup>13</sup>.

Considerando a insulinoterapia obrigatória do T1DM, o mercado farmacêutico apresenta uma grande variedade de tipos de insulina, que se

diferenciam quanto ao seu modo de ação e tempo de duração dos efeitos. A Insulina Regular é o tipo de insulina mais comum utilizada, sendo classificada como um análogo rápido, com atividade em “*bolus*”. Ela apresenta pico de ação de 2-3 horas após aplicação e seus efeitos perduram de 6 a 8 horas. No entanto, a Insulina Regular (rápida), assim como análogos de ação ultra-rápida, podem levar o indivíduo a crises alternadas de hipo e hiperglicemia, de acordo com o tipo de dieta e atividade física<sup>14</sup>. Também existem insulinas com uma cobertura mais ampla, como a Insulina Degludeca, a qual é classificada como um análogo lento, de longa duração, com atividade basal. Ela não apresenta pico de ação e seus efeitos podem perdurar por períodos superiores a 24 horas. Isso decorre pela organização molecular em hexâmetros complexados com zinco, que proporciona uma liberação lenta para a corrente sanguínea<sup>15</sup>. Apesar disso, evitar as descompensações bruscas da glicemia não protege o indivíduo no período prandial. Por isso, uma associação entre diferentes tipos de insulinas tem sido aceito como o melhor padrão de insulinização.

O T1DM descompensado promove deficiência de GLN no sangue, devido ao estado catabólico avançado decorrente da ausência ou inadequada reposição de insulina<sup>16</sup>. Como a GLN é um aminoácido fisiologicamente importante para o equilíbrio anti-oxidante, mas também regulador do metabolismo intermediário hepático<sup>10,11,12</sup>, a interação entre os efeitos de GLN e os efeitos dos diferentes tipos de insulina necessita de esclarecimentos. Diante da carência de estudos associando a utilização de diferentes tipos de insulina e a suplementação com GLN, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da reposição hormonal com as Insulinas Degludeca e Regular, associadas ou não a GLN, sobre os parâmetros fisiológicos, bioquímicos sanguíneos e sobre o estresse oxidativo hepático em modelos experimentais de ratos Wistar T1DM induzidos por estreptozotocina.



## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Drogas e reagentes**

A estreptozotocina utilizada neste estudo foi obtida da Sigma-Aldrich, USA. Os anestésicos Thiopental sódico (Thiopentax®) e cloridrato de lidoicaina 2%, foram fornecidos pela Cristália - Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda e pela Syntec do Brasil Ltda, respectivamente. A L-glutamina foi obtida em farmácia de manipulação. A Insulina Degludeca (Tresiba® Flextouch®, Novo Nordisk® Farm. do Brasil Ltda) e a Insulina Regular (Humulin® R, Eli Lilly do Brasil Ltda,) foram obtidas em farmácia comercial. O glicosímetro e tiras de dosagem Optium Xceed foram adquiridas da Abbott, Brasil. Os kits de dosagens laboratoriais foram fornecidos pela Gold Analisa Diagnósticos Ltda., Brasil.

### **Grupos experimentais**

Os animais foram organizados em um grupo padronização (P) e sete grupos experimentais. No grupo P (n=20), os animais diabéticos foram utilizados para determinação da dose de Insulina Degludeca sobre a glicemia. Para isso foram coletadas amostras de sangue por transecção da extremidade caudal, e realizadas medidas de glicemia durante 4 dias. Cada dose testada (0,4; 1,0; 5,0; 10,0 U/kg) compôs um grupo com 5 animais. As 8 horas da manhã foi aplicada a insulina, seguido de medidas de glicemia as 8, 12 e 17 horas. Do primeiro ao terceiro dia os animais estavam alimentados, e no quarto dia sob jejum noturno de 15 horas para monitorar a glicemia no jejum.

Os grupos sete experimentais foram distribuídos em grupo C, animais controle que receberam solução salina 0,9 % por gavagem e injeção subcutânea de solução salina 0,9% por 30 dias (n=5); grupo D, animais T1DM que receberam solução salina 0,9 % por gavagem e injeção subcutânea de solução salina 0,9% por 30 dias (n=5); grupo DG, animais T1DM que receberam GLN por gavagem e injeção subcutânea de solução salina 0,9% por 30 dias (n=5); grupo DIT, animais T1DM que receberam solução salina 0,9% por gavagem e injeção subcutânea de Insulina Degludeca por 30 dias (n=5); grupo DITG, animais T1DM que receberam GLN por gavagem e injeção subcutânea de Insulina Degludeca por 30 dias (n=5); grupo DIR, animais T1DM que receberam solução salina 0,9% por gavagem e injeção intraperitoneal de Insulina Regular por 30 dias (n=5);

grupo DIRG, animais T1DM que receberam GLN por gavagem e injeção intraperitoneal de Insulina Regular por 30 dias (n=5).

Durante o período experimental foram realizadas avaliações semanais da glicemia de jejum (mg/dL) e pós-prandial (mg/dL), ingestão alimentar (g) e peso corporal (g).

### **Tratamento**

Foram utilizados 55 ratos Wistar machos (50 dias de idade), provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá e mantidos em caixas de polipropileno, com ciclos de claro e escuro de 12 horas e temperatura de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , no Biotério Setorial do Departamento de Ciências Fisiológicas. Todos os procedimentos seguiram as normas estabelecidas pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Estadual de Maringá (parecer n. 9584021115).

A diabetização foi realizada após jejum noturno de 15 horas, por injeção endovenosa de estreptozotocina (60 mg/kg de peso corporal, Sigma-Aldrich, USA) em tampão citrato, pH 4,5 (10mM). Foram considerados diabéticos tipo 1 os animais que apresentaram, após 4 dias, glicemia de jejum  $\geq 250$  mg/dL.<sup>21</sup> Nos animais controle foi utilizado somente tampão citrato.

Os animais foram diariamente suplementados por 30 dias, com solução salina 0,9% ou GLN 400 mg/kg por via oral (gavagem), além de injeção subcutânea (via bomba de infusão - Insight Equipamentos Ltda) de solução salina 0,9% ou Insulina Degludeca (a ser determinado a partir do grupo padronização), ou injeção intraperitoneal de Insulina Regular (1,0 U/kg). A dose de Insulina Regular foi previamente estabelecida em experimentos anteriores<sup>17</sup>.

### **Parâmetros plasmáticos e séricos**

Sob jejum noturno de 15 horas, os animais foram pesados e anestesiados (i.p.), com Thiopental sódico e Lidocaina (120/10 mg/kg de peso corporal). A eutanásia ocorreu por sobredose anestésica. A coleta de sangue foi realizada por punção cardíaca, e as amostras coletadas foram centrifugadas (3,500 rpm, 15 min) a fim de obter plasma e soro. O plasma foi utilizado para as dosagens de glicose, avaliação da capacidade antioxidante total (TAC) e o teor de proteínas, e o soro para as dosagens de colesterol total e HDL, triglicérides,

aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), frutossamina, proteínas totais, ureia e amônia. Os valores referentes ao colesterol VLDL foram obtidos através da equação de Friedewald<sup>18</sup>.

### **Parâmetros do estresse oxidativo hepático**

Após punção cardíaca, foi realizada laparotomia vertical para coleta de amostras de fígado, que foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80°. Posteriormente as mesmas foram homogeneizadas com 8mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,4), sendo uma alíquota separada como homogenato total, utilizado no ensaio da glutathiona. O homogenato remanescente foi centrifugado (11,000 rpm, 20 min) a fim de obter o sobrenadante da amostra, utilizado nas dosagens das proteínas carboniladas e avaliação da atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD)<sup>19</sup>.

A análise das proteínas carboniladas foi realizada em espectrofotômetro, utilizando 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) e os valores foram expressos como nmol.(mg/proteína)<sup>-1</sup> <sup>20</sup>. A análise da glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) foram realizadas em espectrofluorímetro (excitação 350 nm e emissão 420 nm) pelo método do O-ftalaldeído (OPT)<sup>21</sup>. Para os ensaios de GSSG, as amostras foram previamente incubadas com 10 mL de N-etilmaleimida (NEM) e posteriormente com NaOH 1M e 0,4 µM de OPT para detectar fluorescência. Para os cálculos dos resultados foi utilizada uma curva padrão preparada com GSH ou GSSG e os valores foram expressos como nmol.(mg/proteína)<sup>-1</sup>.

A atividade das enzimas antioxidantes foi realizada em espectrofotômetro. A atividade da CAT foi estimada pela medida das alterações na absorbância a 240 nm utilizando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como substrato, com resultados expressos como µmol.min.(mg/proteína)<sup>-1</sup> <sup>22</sup>. A atividade da SOD foi estimada pela capacidade de inibir a auto oxidação do pirogallol em meio alcalino a 420 nm<sup>23</sup>. Uma unidade de SOD foi considerada a quantidade de enzima que promove 50% de inibição, com resultados expressos como U.SOD.(mg/proteína)<sup>-1</sup>.

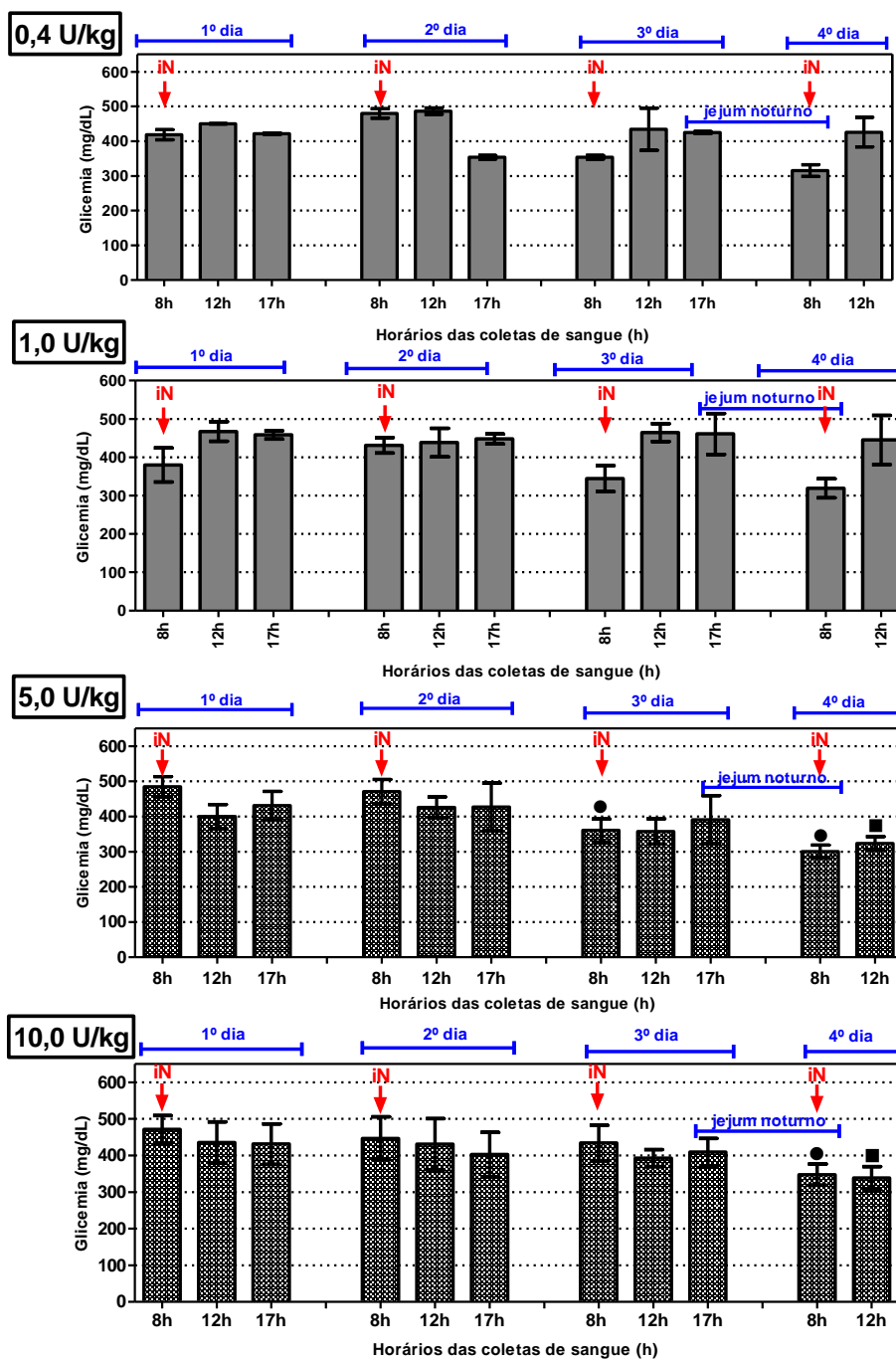
### **Análise Estatística**

Os dados foram submetidos ao teste Kolmogorov-Smirnov (K-S) para verificação da normalidade. Para os dados não-paramétricos (Ingestão alimentar) foi utilizada a análise de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns. Para os dados paramétricos (demais parâmetros) foi utilizada a análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey. A determinação da dose de Insulina Degludeca foi feita por teste 't' de Student. O nível de significância foi prefixado em 95% ( $p < 0,05$ ), com o auxílio do programa GraphPad Prism – versão 5.0.

## RESULTADOS

### **Determinação da relação entre dose de Insulina Degludeca e resposta glicêmica**

A figura 1 apresenta os resultados obtidos com as doses de Insulina Degludeca de 0,4 U/kg, 1,0 U/kg, 5,0 U/kg, 10,0 U/kg. As doses de 0,4 U/kg e 1,0 U/kg não foram capazes de promover mudança glicêmica ( $p > 0,05$ ). No entanto, embora as doses de 5,0 U/kg e 10,0 U/kg terem sido capazes de reduzir ( $p < 0,05$ ) a glicemia após o jejum noturno (8 e 12h, 4º dia), apenas a dose de 5,0 U/kg também o fez ( $p < 0,05$ ) no estado alimentado (8h, 3º dia). Dessa forma, a dose de 5,0 U/kg de Insulina Degludeca foi escolhida para o tratamento por 30 dias dos grupos DIT e DITG.



**Figura 1.** Determinação da variação da glicemia após injeção de Insulina Degludeca. Teste realizado após injeção subcutânea de Insulina Degludeca em ratos T1DM, por quatro dias consecutivos, com as doses de 0,4 U/kg, 1,0 U/kg, 5,0 U/kg, 10,0 U/kg. ● $p < 0,05$  8h do 4º dia vs 8h do 1º dia, ■  $p < 0,05$  12h do 4º dia vs 12h do 1º dia. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EP e analisado por teste "t" de Student,  $n = 5$  /grupo.

### Análises Fisiológicas

Os parâmetros fisiológicos (Tabela 2) ao final do tratamento mostraram menor peso corporal ( $p < 0,05$ ) e aumento das glicemias ( $p < 0,05$ ) no grupo D comparado ao grupo C. Não foi observada diferença na ingestão alimentar no grupo D ( $p > 0,05$ ).

A ingestão alimentar foi aumentada ( $p < 0,05$ ) pelos tratamentos nos grupos DITG, DIR e DIRG comparados ao grupo C. A massa corporal foi reduzida ( $p < 0,05$ ) em todos os grupos quando comparados ao grupo C. Todavia, nos grupos tratados com insulina (DIT e DIR) houve menor perda ( $p < 0,05$ ) de peso corporal comparado ao grupo D, embora não tenham alcançado os valores do grupo C ( $p < 0,05$ ). A associação da GLN não modificou o resultado da Insulina Degludeca (DITG), porém a associação da GLN com Insulina Regular resultou em peso equivalente ao grupo D (Tabela 2).

A glicemia de jejum se mostrou aumentada ( $p < 0,05$ ) em todos os grupos diabéticos quando comparados ao grupo C. No entanto, o tratamento com Insulina Degludeca (DIT) promoveu diminuição ( $p < 0,05$ ) da glicemia quando comparado ao grupo D e DITG. Já a glicemia pós-prandial se mostrou aumentada ( $p < 0,05$ ) em todos os grupos, sem alterações promovidas pelos tratamentos ( $p > 0,05$ ) (Tabela 2).

**Tabela 2.** Parâmetros Fisiológicos. Ingestão alimentar (g), peso corporal (g), glicemia jejum (mg/dL) e glicemia pós-prandial (mg/dL) de ratos após 30 dias de tratamento. Grupo controle (C), diabético (D), diabético com GLN (DG), diabético com Insulina Degludeca (DIT), diabético com Insulina Degludeca e GLN (DITG), diabético com Insulina Regular (DIR) e diabético com Insulina Regular e GLN (DIRG).

	C	D	DG	DIT	DITG	DIR	DIRG
<b>Ingestão alimentar</b>	28,9±0,100	33,3±0,46	31,5±0,20	33,6±0,67	39,9±1,43	36,4±1,40	35,8±0,56
					a	a	a
<b>Peso corporal</b>	337,8±5,46	183,6±3,44	178,5±5,83	234,6±4,98	231,3±7,92	216,5±6,08	185,3±4,05
		a	a	ab	ab	ab	ac
<b>Glicemia jejum</b>	105,8±2,20	551,9±16,31	437,5±42,40	353,8±19,53	574,5±24,93	592,4±19,61	478,5±28,88
		a	a	ab	ac	a	a
<b>Glicemia pós-prandial</b>	89,0±2,49	499,0±6,00	501,6±1,6	481,4±7,98	473,6±16,63	496,8±5,49	504,4±2,71
		a	a	a	a	a	a

Resultados expressos como média±EP (n=5). Letra diferentes na mesma linha indicam diferença significativa. a)  $p < 0,05$  C vs todos os grupos; b)  $p < 0,05$  D vs todos os tratamentos; c)  $p < 0,05$  DIT vs DITG e DIR vs DIRG. Dados não-paramétricos (Ingestão alimentar): Análise de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns. Dados paramétricos (Massa corporal, glicemia jejum e pós-prandial): Análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey.

### **Análises Bioquímicas**

A Tabela 3 apresenta os resultados referentes ao perfil lipídico, proteico e marcadores de injúrias celular. Houve redução ( $p < 0,05$ ) do colesterol total e HDL e aumento ( $p < 0,05$ ) dos triglicerídeos no grupo D comparado a C. Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) nas dosagens de VLDL. As proteínas totais e amônia foram reduzidas ( $p < 0,05$ ), no entanto, foi observado aumento ( $p < 0,05$ ) da ureia. Os marcadores de injúria AST, ALT e frutamina também se mostraram aumentados ( $p < 0,05$ ) no grupo D quando comparado ao grupo C.

A suplementação no grupo DG manteve a redução ( $p < 0,05$ ) do colesterol total e HDL, proteínas totais e amônia observados no grupo D. Da mesma forma, manteve o aumento ( $p < 0,05$ ) da ureia e frutamina, observados no grupo D, quando comparados ao grupo C. No entanto, o tratamento com GLN promoveu aumento ( $p < 0,05$ ) de AST e ALT em relação a ambos grupos C e D. Por outro lado, o tratamento também foi capaz de promover diminuição ( $p < 0,05$ ) dos triglicerídeos quando comparado ao grupo D.

Os grupos tratados com Insulina Degludeca (DIT e DITG) apresentaram diminuição ( $p < 0,05$ ) nas dosagens de amônia quando comparados ao grupo C, e de AST e ALT em relação ao grupo D. As dosagens de ureia e frutamina se mostraram diminuídas ( $p < 0,05$ ) quando comparadas ao grupo D, mas ainda superiores ( $p < 0,05$ ) ao grupo C. Os triglicerídeos e VLDL se mostraram aumentados ( $p < 0,05$ ) quando comparados aos grupos C e D, no entanto, no grupo DITG esse aumento se mostrou menor ( $p < 0,05$ ) quando comparado a DIT. A dosagem de HDL se mostrou diminuída ( $p < 0,05$ ) quando comparada a C no grupo DIT. Todavia, a adição de GLN (DITG) promoveu aumento ( $p < 0,05$ ) de HDL em relação a D e DIT. Com relação ao colesterol total, houve aumento ( $p < 0,05$ ) em DIT quando comparado a C e D. A adição de GLN fez com que esse aumento fosse superior ( $p < 0,05$ ) apenas a D. Não houve diferença significativa nas dosagens de proteínas totais ( $p > 0,05$ ) (Tabela 3).

Os grupos tratados com Insulina Regular (DIR e DIRG) apresentaram aumento ( $p < 0,05$ ) de ureia e diminuição ( $p < 0,05$ ) de amônia em relação ao grupo C. O colesterol total se mostrou diminuído ( $p < 0,05$ ) em relação a C. A redução ( $p < 0,05$ ) também foi observada nas dosagens de HDL em relação ao grupo C,



no entanto, houve aumento ( $p < 0,05$ ) em DIRG em relação ao grupo D. O grupo DIR apresentou aumento ( $p < 0,05$ ) de VLDL e triglicérides em relação a C e D. Por outro lado, a adição de GLN (DIRG) promoveu diminuição ( $p < 0,05$ ) destes em relação a DIR. As dosagens de frutossamina revelam aumento ( $p < 0,05$ ) em ambos os grupos em relação a C, no entanto, comparado a D, o grupo DIR se mostrou diminuído ( $p < 0,05$ ). Da mesma forma, ambos os grupos apresentaram aumento ( $p < 0,05$ ) de AST e ALT em relação ao grupo C. Todavia, a adição de GLN (DIRG) mostrou aumento ( $p < 0,05$ ) ainda maior em relação a D e DIR. As proteínas totais do sangue foram reduzidas pelo diabetes ( $p < 0,05$ ) e normalizadas pelo tratamento com ambas insulinas (DIT e DIR). A associação com GLN não alterou o resultado da Insulina Degludeca (DIT) mas aboliu o efeito da Insulina Regular (DIRG).

**Tabela 3.** Parâmetros Bioquímicos. Colesterol total (Col. T – mg/dL), HDL (mg/dL), VLDL (mg/dL), triglicerídeos (Trigli. - mg/dL), proteínas totais (Prot. T. - mg/dL), ureia (Ure. - mg/dL), amônia (Amn. - mg/dL), frutamina (Frut. -  $\mu\text{mol/L}$ ), aspartato aminotransferase (AST - U/L) e alanina aminotransferase (ALT - U/L) do plasma de ratos após 30 dias de tratamento. Grupo controle (C), diabético (D), diabético com GLN (DG), diabético com Insulina Degludeca (DIT), diabético com Insulina Degludeca e GLN (DITG), diabético com Insulina Regular (DIR) e diabético com Insulina Regular e GLN (DIRG).

	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>DG</b>	<b>DIT</b>	<b>DITG</b>	<b>DIR</b>	<b>DIRG</b>
<b>Col.T.</b>	82,8 $\pm$ 3,06	51,6 $\pm$ 2,18 a	47,4 $\pm$ 1,77 a	102,5 $\pm$ 3,66 ab	89,5 $\pm$ 2,76 b	57,2 $\pm$ 3,45 a	62,9 $\pm$ 3,10 a
<b>HDL</b>	44,0 $\pm$ 1,91	24,5 $\pm$ 0,75 a	28,6 $\pm$ 1,28 a	32,0 $\pm$ 2,47 a	44,3 $\pm$ 2,27 bc	29,2 $\pm$ 2,34 a	34,1 $\pm$ 1,94 ab
<b>VLDL</b>	5,7 $\pm$ 0,19	13,6 $\pm$ 1,32	6,3 $\pm$ 0,35	53,2 $\pm$ 4,65 ab	30,0 $\pm$ 2,58 abc	30,3 $\pm$ 4,14 ab	12,8 $\pm$ 0,88 c
<b>Trigli.</b>	28,7 $\pm$ 0,60	83,5 $\pm$ 0,90 a	31,80 $\pm$ 1,75 b	300,5 $\pm$ 19,85 ab	138,2 $\pm$ 7,53 abc	155,7 $\pm$ 20,30 ab	56,2 $\pm$ 4,26 c
<b>Prot. T.</b>	6,5 $\pm$ 0,07	5,6 $\pm$ 0,08 a	5,7 $\pm$ 0,14 a	6,4 $\pm$ 0,09 b	6,3 $\pm$ 0,05 b	6,2 $\pm$ 0,18 b	5,6 $\pm$ 0,09 ac
<b>Amn.</b>	5,1 $\pm$ 0,10	3,60 $\pm$ 0,18 a	4,0 $\pm$ 0,15 a	4,1 $\pm$ 0,06 a	3,8 $\pm$ 0,13 a	4,0 $\pm$ 0,05 a	4,0 $\pm$ 0,09 a
<b>Ure.</b>	33,7 $\pm$ 1,42	122,4 $\pm$ 2,94 a	121,5 $\pm$ 9,66 a	65,7 $\pm$ 1,36 ab	74,63 $\pm$ 4,13 ab	111,0 $\pm$ 5,64 a	100,1 $\pm$ 5,90 a
<b>Frut.</b>	1,4 $\pm$ 0,04	3,0 $\pm$ 0,24 a	3,2 $\pm$ 0,13 a	2,3 $\pm$ 0,15 ab	2,3 $\pm$ 0,05 ab	2,3 $\pm$ 0,09 ab	2,7 $\pm$ 0,07 a
<b>AST</b>	54,2 $\pm$ 1,36	145,1 $\pm$ 8,95 a	232,4 $\pm$ 19,42 ab	63,6 $\pm$ 4,53 b	53,3 $\pm$ 2,26 b	134,7 $\pm$ 12,13 a	219,6 $\pm$ 14,82 abc
<b>ALT</b>	21,4 $\pm$ 1,84	172,0 $\pm$ 5,41 a	263,2 $\pm$ 12,52 ab	74,1 $\pm$ 8,30 b	44,5 $\pm$ 1,25 b	150,1 $\pm$ 24,04 a	250,0 $\pm$ 18,31 abc

Resultados expressos como média $\pm$ EP (n=5). Letra diferentes na mesma linha indicam diferença significativa. a)  $p < 0,05$  C vs todos os grupos; b)  $p < 0,05$  D vs todos os tratamentos; c)  $p < 0,05$  DIT vs DITG e DIR vs DIRG. Análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey.

### **Análise do estresse oxidativo**

Os dados referentes aos parâmetros do estresse oxidativo estão presentes na Tabela 4. No grupo diabético (D), a atividade das enzimas CAT e SOD e as dosagens plasmáticas de TAC se mostraram diminuídas ( $p < 0,05$ ) quando comparada ao grupo C. A carbonilação proteica, por outro lado, se mostrou aumentada ( $p < 0,05$ ) no grupo D. Não foi observada diferença significativa ( $p > 0,05$ ) nos demais parâmetros avaliados.

A GLN (DG) (Tabela 4) promoveu aumento ( $p < 0,05$ ) da atividade de CAT e SOD em relação ao grupo D. Destes, apenas CAT apresentou atividade

diminuída ( $p < 0,05$ ) em relação a C. A carbonilação proteica mostrou-se diminuída ( $p < 0,05$ ) no grupo DG quando comparado ao grupo D, no entanto, se mostrou superior ( $p < 0,05$ ) ao grupo C. Foi observado aumento ( $p < 0,05$ ) nas dosagens plasmáticas de TAC quando comparado apenas a D. Além disso, apenas as dosagens de GSSG se mostraram alteradas, revelando aumento ( $p < 0,05$ ) em relação a D e C.

Os grupos tratados com Insulina Degludeca (DIT e DITG) apresentaram aumento ( $p < 0,05$ ) da atividade de SOD em relação aos grupos D e C. Ambos os grupos também mostraram aumento da atividade de CAT em relação ao grupo D, no entanto, a adição de GLN (DITG) promoveu diminuição de CAT em relação a C e DIT. A carbonilação proteica se mostrou diminuída ( $p < 0,05$ ) em relação a D e aumentada ( $p < 0,05$ ) em relação a C para ambos os grupos. Foi observado diminuição ( $p < 0,05$ ) nas dosagens plasmáticas de TAC em relação ao grupo C. Não foi observada diferença significativa ( $p > 0,05$ ) nos demais parâmetros avaliados para estes grupos (Tabela 4).

Os grupos tratados com Insulina Regular (DIR e DIRG) mostraram diminuição ( $p < 0,05$ ) da atividade de CAT e das dosagens plasmáticas de TAC em relação ao grupo C. No entanto, a adição de GLN (DIRG) promoveu aumento ( $p < 0,05$ ) de CAT em relação a DIR. Por outro lado, no grupo DIR, as dosagens de SOD se mostraram aumentadas ( $p < 0,05$ ) em relação a C e D. Já no grupo DIRG o aumento ( $p < 0,05$ ) se manteve em relação a D, mas a GLN promoveu diminuição ( $p < 0,05$ ) em relação a DIR. As dosagens referentes a carbonilação proteica mostram um aumento ( $p < 0,05$ ) em ambos em relação ao grupo C, e diminuição ( $p < 0,05$ ) em relação a D. Além disso, a adição de GLN (DIRG) resultou em diminuição ( $p < 0,05$ ) da carbonilação proteica em relação a DIR. Também a adição de GLN (DIRG) promoveu aumento ( $p < 0,05$ ) de GSH e GSH+GSSG quando comparado aos grupos C, D e DIR, enquanto GSH/GSSG aumentou ( $p < 0,05$ ) apenas em relação a D e DIR (Tabela 4).

**Tabela 4.** Parâmetros do estresse oxidativo. Catalase (CAT -  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot(\text{mg}/\text{protein})^{-1}$ ), Superóxido dismutase (SOD -  $\text{U}\cdot\text{SOD}\cdot(\text{mg}/\text{protein})^{-1}$ ), proteínas carboniladas (Prot. C. -  $\text{nmol}\cdot(\text{mg}/\text{protein})^{-1}$ ), glutathiona reduzida (GSH -  $\text{nmol}\cdot(\text{mg}/\text{protein})^{-1}$ ), glutathiona reduzida (GSSG -  $\text{nmol}\cdot(\text{mg}/\text{protein})^{-1}$ ), razão GSH/GSSG ( $\text{nmol}\cdot(\text{mg}/\text{protein})^{-1}$ ), soma GSH+GSSG ( $\text{nmol}\cdot(\text{mg}/\text{protein})^{-1}$ ) do tecido hepático e a capacidade antioxidante total (TAC –  $\text{mmol}\cdot(\text{ET})/\text{L}$ ) do plasma de ratos após 30 dias de tratamento. Grupo controle (C), diabético (D), diabético com GLN (DG), diabético com Insulina Degludeca (DIT), diabético com Insulina Degludeca e GLN (DITG), diabético com Insulina Regular (DIR) e diabético com Insulina Regular e GLN (DIRG).

	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>DG</b>	<b>DIT</b>	<b>DITG</b>	<b>DIR</b>	<b>DIRG</b>
<b>TECIDO HEPÁTICO</b>							
<b>CAT</b>	915,2±34,46	509,1±26,87	706,6±35,06	887,5±18,12	730,9±40,55	474,5±48,73	608,6±19,18
		a	ab	b	abc	a	ac
<b>SOD</b>	1,7±0,01	1,3±0,04	2,0±0,11	2,6±0,06	2,6±0,07	2,2±0,06	1,8±0,10
		a	b	ab	ab	ab	bc
<b>Prot. C.</b>	4,8±0,30	14,5±0,59	8,7±0,34	8,3±0,52	6,9±0,43	7,9±0,14	5,5±0,16
		a	ab	ab	ab	ab	abc
<b>GSH</b>	10,0±0,55	9,0±0,59	9,6±0,61	11,4±0,87	9,2±0,92	7,7±0,74	13,8±0,37
							abc
<b>GSSG</b>	0,8±0,03	0,8±0,02	1,0±0,06	0,9±0,06	0,8±0,03	1,0±0,06	0,8±0,02
			ab				
<b>GSH/GSSG</b>	11,6±0,77	9,3±0,91	10,5±1,81	12,4±0,81	10,7±1,00	8,7±1,52	15,2±0,23
							bc
<b>GSG+GSSG</b>	11,7±0,58	10,8±0,65	11,6±0,63	13,3±0,99	10,9±0,96	9,6±0,74	15,6±0,52
							abc
<b>PLASMA</b>							
<b>TAC</b>	454,7±12,10	343,6±5,52	424,4±16,22	324,4±10,34	277,7±19,93	295,8±24,74	330,2±1,22
		a	b	a	a	a	a

Resultados expressos como média±EP (n=5). Letra diferentes na mesma linha indicam diferença significativa. a)  $p < 0,05$  C vs todos os grupos; b)  $p < 0,05$  D vs todos os tratamentos; c)  $p < 0,05$  DIT vs DITG e DIR vs DIRG. Análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey.

## DISCUSSÃO

A perda de peso e a hiperglicemia são parâmetros fisiológicos alterados e característicos do T1DM<sup>24,25</sup>. Eles resultam da ausência de insulina, que impede os tecidos insulino-dependentes de captarem glicose e acabam por estimular a gliconeogênese hepática, resultando em hiperglicemia crônica<sup>26</sup>. Ainda, essa ausência de captação de glicose faz com que as reservas energéticas corporais (proteínas e lipídios) sejam utilizadas como fonte de energia alternativa, resultando em perda de peso. Os resultados obtidos neste estudo, revelaram a presença de ambas (hiperglicemia e perda de peso) indicando a instalação do quadro diabético<sup>25</sup>, como mostra a Tabela 2.

Como esperado, as duas insulinas utilizadas foram capazes de reduzir a perda de massa corporal (DIT e DIR), mas somente o tratamento com Insulina Degludeca (grupos DIT) foi capaz de reduzir a glicemia de jejum em relação ao grupo diabético (D), mesmo não alcançando os valores do grupo controle C, o que não foi observado nos demais tratamentos. As diferenças entre as cinéticas de liberação para a corrente sanguínea, concentração plasmática efetiva temporal das insulinas e nível de interação com seus receptores celulares, podem ter sido responsáveis pelos efeitos fisiológicos observados. A ausência de alterações no padrão de ingestão alimentar<sup>27</sup> associado à redução da perda de massa corporal podem indicar um efeito diferenciado desta insulina sobre a regulação da lipólise e do nível de degradação proteica<sup>28</sup>. No entanto, esse é um efeito da Insulina Degludeca, que desaparece na presença da associação com GLN.

No T1DM, a elevação da glicemia promove um total desbalanço metabólico<sup>29</sup>, que resulta em um quadro de dislipidemia. Esse quadro é consequência de alterações na lipólise na ausência de insulina endógena<sup>30</sup>. Isto promove o aumento dos triglicerídeos plasmáticos e de VLDL, e diminuição de HDL<sup>31</sup>. Nosso modelo experimental mostrou padrão de resposta equivalente, com tendência ao aumento de VLDL.

Os animais dos grupos tratados com Degludeca (DIT e DITG) apresentaram alterações em todo perfil lipídico. A associação de Degludeca e GLN (DITG) promoveu recuperação do colesterol total e HDL. Além de inibir a lipólise, a insulina também estimula a síntese de colesterol<sup>1,32</sup>, que associada a GLN apresentou os efeitos observados. Todavia, os triglicerídeos e VLDL foram

produzidos de maneira exacerbada nestes grupos. Os triglicerídeos resultantes de re-esterificação ou síntese de novo no fígado, são empacotados e transportados no sangue pela lipoproteína VLDL<sup>33</sup>. Associando isto com o fato da Insulina Degludeca *per se* ter reduzido a glicemia de jejum, parece provável que esta insulina possa estar aumentando a lipogênese hepática a partir da glicose circulante. A associação entre Degludeca e GLN (DITG) amenizou esses efeitos, promovendo diminuição desses valores, sem, no entanto, reduzir a glicemia de jejum.

Os grupos tratados com Insulina Regular não modificaram as dosagens do colesterol total e HDL, no entanto, assim como Degludeca isolada (DIT), a Insulina Regular isolada (DIR) também estimulou o aumento nas dosagens de triglicerídeos e VLDL. Todavia, esse aumento de triglicerídeos foi 50% menor quando comparado a Insulina Degludeca, o que aponta benefícios da Insulina Regular. Esses resultados indicam que a diferença na farmacocinética entre os dois tipos de insulinas testadas refletem diretamente no mecanismo de ação. Apesar do efeito aparentemente benéfico da Insulina Regular em produzir metade dos triglicerídeos plasmáticos comparada à Insulina Degludeca, não houve mudança da glicemia de jejum como em DIT. A associação entre Insulina Regular e GLN também foi capaz de reduzir esses parâmetros, o que reforça a hipótese de que, embora diferentes, ambas as insulinas quando associadas a suplementação com GLN parecem atenuar os efeitos do diabetes no que diz respeito ao perfil lipídico. Embora a utilização de GLN não ser capaz de substituir a insulina, o uso concomitante pode melhorar a compensação metabólica do T1DM.

A captação celular sódio-acoplada de GLN (SNAT3, Slc38a3) aumenta o volume celular (swelling), processo que regula a síntese de ácidos graxos, entre outros<sup>12</sup>. Esse efeito na redução dos triglicerídeos (DG, DITG e DIRG) pode estar relacionado com a capacidade de GLN em modular o metabolismo energético. Modelos de animais com dieta hiperlipídica e gavagem com GLN por quatro semanas tiveram baixo ganho de peso e aumentaram a oxidação de ácidos graxos em relação a dieta padrão<sup>34</sup>. Apesar da falta de efeito sobre o peso corporal no grupo DG, o aumento na beta-oxidação pode ser um dos mecanismos ativados pela GLN neste estudo, e que poderia justificar a redução dos triglicerídeos plasmáticos.

O diabetes também foi capaz de promover alterações no perfil proteico destes animais, restaurado pelo tratamento com ambas as insulinas. Associado à redução das proteínas totais do plasma no grupo diabético, houve aumento de 3 vezes nos valores de ureia referente ao grupo controle, e diminuição de 30% nas dosagens de amônia, indicando maior proteólise e conversão de amônia à ureia. Os grupos tratados com Insulina Degludeca (DIT e DITG) foram capazes de aumentar proteínas totais e diminuir as dosagens de ureia em relação ao grupo diabético D, o que indica um efeito positivo dessa insulina sobre esse aspecto, embora essa diminuição da ureia não ter sido suficiente para alcançar a normalidade. Esse aumento de proteínas totais e redução da ureia podem estar relacionadas com menor degradação proteica e preservação de massa corporal, como observado na Tabela 2. O grupo tratado com Insulina Regular (DIR) restaurou proteínas totais, mas não apresentou o mesmo resultado sobre a ureia, o que indica um efeito apenas da Insulina Degludeca. A associação com GLN (DIRG) aboliu o efeito da Insulina Regular sobre as proteínas totais do sangue.

O estresse oxidativo observado nos indivíduos diabéticos está intimamente relacionado com as complicações crônicas da doença, e a hiperglicemia tem papel importante nesse processo<sup>35</sup>. A hiperglicemia crônica conduz a danos celulares, que se devem, em grande parte, a formação dos AGEs<sup>36</sup>. Os AGEs são resultado da reação não enzimática da glicose sanguínea com componentes celulares, como proteínas, que são alterados de forma irreversível, levando a perda de função biológica<sup>37</sup>, sendo ainda capazes de induzir a formação de EROs e de moléculas pró-inflamatórias<sup>38</sup>.

A dosagem de frutossamina é uma forma de avaliar esses produtos de glicação avançada. No entanto, sua dosagem avalia apenas as semanas anteriores à amostragem, uma vez que a meia vida da maioria das proteínas é curta. O grupo diabético D apresentou aumento de 50% nas dosagens de frutossamina, o que era esperado e está associado à hiperglicemia diabética<sup>39</sup>. Além disso, a alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), usadas como marcadores de lesão celular, também se mostraram alteradas frente a doença<sup>40</sup>. A transaminase ALT é encontrada principalmente no fígado, sendo liberada na corrente sanguínea como resultado de dano nos hepatócitos<sup>41</sup>. Todo desbalanço metabólico observado no grupo D pode estar diretamente relacionado a esses possíveis danos. Embora a frutossamina não

tenha sido alterada pelo tratamento com GLN (DG), AST foi aumentada em 328% (em relação a C) e 60% (em relação a D), e ALT em 1.129% (em relação a C) e 53% (em relação a D).

O tratamento com a Insulina Degludeca (DIT e DITG) promoveu diminuição das transaminases e da frutossamina, mesmo que somente o grupo DIT tenha apresentado diminuição da glicemia de jejum, uma vez que as alterações na glicemia estão diretamente relacionadas com as alterações na frutossamina<sup>39</sup>. Esse efeito de Degludeca pode indicar uma diminuição dos efeitos deletérios promovidos pela doença. Por outro lado, a Insulina Regular (DIR e DIRG) também promoveu diminuição de frutossamina, mas não foi capaz de modificar a glicemia de jejum, o que não era um resultado esperado, uma vez que os dois parâmetros estão intimamente relacionados. De forma inespecífica, ambas as insulinas, associadas ou não à GLN, reduziram o nível de glicação de proteínas em relação ao grupo D.

A adição de GLN (DIRG) promoveu aumento das transaminases a valores elevados, assim como no grupo DG, o que poderia indicar alguma lesão hepática, como resultado de acúmulo de lipídios nos hepatócitos (esteatose hepática não-alcoólica) ou inflamação<sup>42</sup>. A GLN tem a capacidade de induzir *swelling* celular, modificando a expressão de diversas proteínas<sup>12</sup>. O aumento das transaminases na presença de GLN poderia indicar a influência desse aminoácido sobre a expressão de determinadas proteínas e vias metabólicas, que influenciariam o acúmulo de lipídios ou a inflamação. Esses resultados foram obtidos com a GLN isolada (DG) ou associada à Insulina Regular (DIRG), mas não com a Insulina Degludeca (DITG). Dessa forma, o efeito inespecífico da GLN sobre as transaminases parece ser abolido na presença de Degludeca, o que indica que a suplementação deve ser avaliada caso a caso.

As transaminases, como indicativo de lesão hepática<sup>41</sup>, e a hiperglicemia, estão grandemente associados ao aumento da produção de espécies reativas (RE)<sup>43</sup> e surgimento do estresse oxidativo. Em indivíduos normais, o sistema antioxidante desempenha seu papel de maneira eficiente, reduzindo os danos causados pelas RE<sup>44</sup>. No entanto, em indivíduos diabéticos a superprodução de RE excede a capacidade do sistema<sup>45</sup>, resultando em diminuição da capacidade antioxidante total (TAC), aumento da carbonilação de proteínas e alterações na atividade das enzimas do sistema antioxidante<sup>46</sup>.



TAC é um biomarcador importante, pois avalia a interação entre os diferentes componentes do plasma<sup>47</sup> e sua redução é indicativo de aumento das RE<sup>48</sup>. Além do plasma, amostras de fígado podem ser utilizadas para determinar tanto os componentes do sistema antioxidante, como o quadro de carbonilação proteica, que resultam de alterações pós-traducionais em aminoácidos devido a RE<sup>49</sup>. Os antioxidantes enzimáticos compreendem enzimas como a catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), que agem em conjunto a fim de combater o estresse oxidativo.

Embora não tenha sido observado alterações nos parâmetros que envolvem a glutathiona (GSH, GSSG, razão GSH/GSSG e GSH+GSSG), a diminuição de CAT, SOD e TAC, e aumento da carbonilação de proteínas<sup>46</sup>, indicam uma menor capacidade em lidar com a produção de RE e favorece o estresse oxidativo<sup>24</sup> no grupo D. Ainda que a GLN (DG) tenha apresentado efeitos discretos nos parâmetros avaliados até agora, a suplementação foi capaz de aumentar a atividade de CAT e SOD, as dosagens de TAC e diminuir a carbonilação proteica. Os resultados obtidos sem reposição hormonal podem estar associados a ação regulatória da GLN, sobre a expressão proteica e modificação na atividade enzimática<sup>12</sup>.

A suplementação com Insulina Degludeca (DIT, e DITG) resultou em aumento de CAT e SOD e diminuição das proteínas carboniladas. O tratamento com Insulina Regular (DIR) resultou em efeitos similares aos grupos tratados com Degludeca. No entanto, a adição de GLN (DIRG) aumentou os efeitos da Insulina Regular, com aumento de CAT e diminuição das proteínas carboniladas em relação a DIR. Além disso, promoveu aumento nas dosagens de GSH, GSH+GSSG e da razão GSH/GSSG, importante indicador do estado redox celular. Apesar dos resultados similares entre os grupos DG e DIRG, apenas o grupo DIRG promoveu alterações que refletem o antioxidante glutathiona, o que indica um efeito da associação entre a reposição hormonal e a suplementação sobre esse aspecto, uma vez que as mesmas alterações não foram observadas no grupo tratado apenas com GLN (DG). Além disso, os efeitos foram restritos à Insulina Regular, ou seja, a Insulina Degludeca aboliu os efeitos da GLN sobre esses parâmetros.

## CONCLUSÃO

A reposição hormonal com a Insulina Degludeca foi eficaz em diminuir a glicemia de jejum com 30 dias de tratamento. Essa diminuição pode estar associada ao aumento da produção triglicérides, via lipogênese hepática a partir da glicose circulante. A ausência de alterações na ingestão alimentar associado à menor perda peso e redução da ureia plasmática, indica um efeito desta insulina sobre a regulação da lipogênese e/ou lipólise periférica e proteólise. A associação de GLN aos grupos (DITG e DIRG) atenua os efeitos do diabetes no que diz respeito ao perfil lipídico. No entanto, suplementada isolada (DG) aumenta as dosagens das transaminases, o que pode indicar a influência do tratamento sobre o acúmulo de lipídios e glicogênio. A insulina Degludeca isolada reduziu todos esses parâmetros, e associada aboliu o efeito de GLN sobre as transaminases. Ademais, ambas Insulinas resultaram em aumento de CAT e SOD e diminuição das proteínas carboniladas, refletindo uma melhora no perfil oxidativo.

Os diferentes tipos de insulina disponíveis apresentam perfis regulatórios diferenciados, e reforça a dificuldade da escolha da melhor insulino terapia. Além disso, a suplementação com GLN interfere com a ação insulínica nos tecidos, de maneira diferente de acordo com a insulina utilizada. Portanto, a utilização de GLN em T1DM não deve ser indiscriminada, necessitando de ampla avaliação metabólica.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores são gratos pelo suporte técnico fornecido pelos departamentos de Bioquímica, de Ciências Fisiológicas e Ciências Morfológicas, da Universidade Estadual de Maringá. Além disso, gratos a CAPES pelo fomento.

## REFERÊNCIAS

1. Nelson DL, Cox MM. *Lehninger Principles of Biochemistry, (5th Ed.)*. New York: W. H. Freeman and Company; 343-389, 831-850; 2008.
2. Preziosi ME, Monga SP. Update on the mechanisms of liver regeneration. *Semin Liver Dis.* 2017; 37(2): 141-151.
3. Ravnicek DJ, Leberfinger NA, Ozbolat IT. Bioprinting and cellular therapies for type 1 diabetes. *Trends Biotechnol.* 2017; 35(11): 1025-1034.
4. Xie Z, Wu B, Shen G, Li X, Wu Q. Curcumin alleviates liver oxidative stress in type 1 diabetic rats. *Mol Med Rep.* 2018; 17: 103-108.
5. Fiorentino TV, Prioleto A, Zuo P, Folli F. Hyperglycemia-induced oxidative stress and its role in diabetes mellitus related cardiovascular diseases. *Curr Pharm Des.* 2013; 19(32): 5695-5703.
6. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: How should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* 2004; 142(2): 231-255.
7. Zhao L. Effects of free radicals in diabetes. *Free Radic Biol Med.* 2001; (77): 222.
8. Wajchenberg BL. Disfunção endotelial na diabetes Tipo 2. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2002; 46(5): 514-519.
9. Zabot GP, Carvalhal GF, Marroni NP, Licks F, Hartmann RM, Silva VD, Fillmann HS. Glutamine prevents oxidative stress in a model of portal hypertension. *World J Gastroenterol.* 2017; 23(25):4529-4537.
10. Curi R, Lagranha CJ, Doi SQ, Sellitti DF, Procopio J, Pithon-Curi TC, Corless M, Newsholme P. Molecular mechanisms of glutamine action. *J Cell Physiol.* 2005; 204: 392-401.
11. Lavoigne A, Husson A, Quillard M. Glutamine and the liver cell: metabolism, properties and the concept of metabolic regulation by cell swelling. *Eur J Pediatr.* 2017; 176(4): 529-536.
12. Cruzat V, Rogero MM, Keane KN, Curi R, Newsholme P. Glutamine: Metabolism and immune function, supplementation and clinical translation. *Nutrients.* 2018; 10(11): 1564. Doi: 10.3390/nu10111564.
13. Roldi LP, Pereira RVF, Tronchini EA, Rizo GV, Scoaris CR, Zanoni JN, Natali MR. Vitamin E (A-tocopherol) supplementation in diabetic rats: effects on

the proximal colon. *BMC Gastroenterology*, 2009; 23;9:88. Doi:10.1186/1471-230X-9-88.

14. Bazotte RB. *Paciente Diabético. Cuidados farmacêuticos*, (1th Ed.). Medbook; 72; 2010.

15. Tipos de insulina. <https://www.diabetes.org.br/publico/diabetes/insulina>. [accessed 25 May 2019].

16. Menge BA, Schrader H, Ritter PR, Ellrichmann M, Uhl W, Schmidt WE, Meier JJ. Selective amino acid deficiency in patients with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Regul pept*. 2010; 25:160(1-3): 75-80.

17. Santiago NA, Godoi-Gazolla VAF, Milani MF, Campos VC, Vilela VR, Pedrosa MMD, Bazotte RB. Oral glutamine is superior than oral glucose to promote glycemia recovery in mice submitted to insulin-induced hypoglycemia. *Inter J Endocrinol*. 2013, 1–7. Doi:10.1155/2013/841514.

18. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical Chemistry*. 1972; 18: 499-502.

19. Lowry OH, Rosebrough NJ, Lewis Farr A, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193: 265-275.

20. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*. 1990; 186: 464-478.

21. Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Analytical Biochemistry*. 1976; 74: 214-226.

22. Bergmeyer HU. *Methods of Enzymatic Analysis*. London: Verlag Chemie-Academic Press; 1974.

23. Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem*. 1974; 47: 469-474.

24. Malik A, Morya RK, Bhadada K, Rana S. Type 1 diabetes mellitus: Complex interplay of oxidative stress, cytokines and gastrointestinal motility and small intestinal bacterial overgrowth. *Eur J Clin Invest*. 2018; 48(11): e13021. Doi: 10.1111/eci.13021.

25. Tronchini EA, Trevizan AR, Tashima CM, Freitas P, Bazotte RB, Pereira MAS, Zanoni JN. Effects of L-glutamine on myenteric neuron and of the mucous of the ileum of diabetic rats. *An Acad Bras Cienc.* 2013; 85(3): 1165-1176.
26. Cryer PE. The barrier of hypoglycemia in diabetes. *Diabetes.* 2008; 57(12): 3169–3176.
27. Tambascia MA, Eliaschewitz FG. Degludec: the new ultra-long insulin analogue. *Diabetol Metab Syndr.* 2015; 7: 57.
28. Carvalheira JB, Zecchin HG, Saad MJA. Vias de sinalização da insulina. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2002; 46(4): 419-425.
29. Filla LA, Edwards JL. Metabolomics in diabetic complications. *Mol Biosyst.* 2016; 12(4): 1090-1105.
30. Atabek ME, Akyurek N, Eklioglu BS, Alp H. Impaired systolic blood dipping and nocturnal hypertension: an independent predictor of carotid intima–media thickness in type 1 diabetic patients. *J Diabetes Complications.* 2014; 28(1): 51–55.
31. Raghunathan S, Tank P, Bhadada S, Patel B. Evaluation of buspirone on streptozotocin induced type 1 diabetes and its associated complications. *Biomed Res Int.* 2014: 948427. [https://doi: 10.1155/2014/948427](https://doi.org/10.1155/2014/948427).
32. Voet D, Voet JG. *Biochemistry. (4th Ed.). USA: John Wiley & Sons, Inc; 336-459, 2011.*
33. Schaefer EJ, Gleason JA, Dansinger ML. Dietary fructose and glucose differentially affect lipid and glucose homeostasis. *J Nutr.* 2009; 139(6): 1257S-1262S.
34. Abboud KY, Reis SK, Martelli ME, Zordão OP, Tannihão F, Souza AZZ, Assalin HB, Guadagnini D, Rocha GZ, Saad MJA, Prada PO. Oral glutamine supplementation reduces obesity, pro-inflammatory markers, and improves insulin sensitivity in DIO wistar rats and reduces waist circumference in overweight and obese humans. *Nutrients.* 2019; 11(3): 536. Doi: 10.3390/nu11030536.
35. Wu MY, Yiang GT, Lai TT, Li CJ. The Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction during the Pathogenesis of Diabetic Retinopathy. *Oxi Med Cell Longev.* 2018: 3420187. Doi:10.1155/2018/3420187.

36. Peppas M, Uribarri J, Vlassara H. Glucose, advanced glycation end products, and diabetes complications: What is new and what works. *Clin Diabetes*. 2003; 21(4): 186-187.
37. Rowan S, Bejarano E, Taylor A. Mechanistic targeting of advanced glycation end-products in age-related diseases. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2018; 1864(12):3631-3643.
38. Zhang L, Zalewski A, Liu Y, Mazurek T, Cowan S, Martin JI, Hofmann SM, Vlassara H, Shi Y. Diabetes-induced oxidative stress and low-grade inflammation in porcine coronary arteries. *Circulation*. 2003; 108(4): 472-478.
39. Ribeiro RT, Macedo MP, Raposo JF. HbA1c, fructosamine, and glycated albumin in the detection of dysglycaemic conditions. *Curr Diabetes Rev*. 2016; 12(1): 14-19.
40. Oda S, Mullaney T, Bowles AJ, Durward R, Lynch B, Sugimura Y. Safety studies of L-alanyl-L-glutamine (L-AG). *Regul Toxicol Pharmacol*. 2007; 50(2): 226–238.
41. Barker DJP. The developmental origins of adult disease. *J Am Chem Soc*. 2004; 126(6): 588S-595S.
42. Barros BSV, Santos DC, Pizarro MH, Melo LGN, Gomes MB. Type 1 diabetes and non-alcoholic fatty liver disease: When should we be concerned? A Nationwide study in Brazil. *Nutrients*. 2017; 9(8): 878. Doi: 10.3390/nu9080878.
43. Asmat U, Abad K, Ismail K. Diabetes mellitus and oxidative stress-A concise review. *Saudi Pharm J*. 2016; 24(5):547–553.
44. Shami NJIE, Moreira EAM. Lycopene as an antioxidant agent. *Rev Nutr*. 2004; 17(2): 227-236.
45. Bandyopadhyay U, Das D & Banerjee RK. Reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis. *Curr Sci*. 1999; 77: 658–666.
46. Anupam K, Kaushal J, Prabhakar N, Bhatnagar A. Effect of redox status of peripheral blood on immune signature of circulating regulatory and cytotoxic T cells in streptozotocin induced rodent model of type I diabetes. *Immunobiology*. 2018; 223(10), 586–597.
47. Crews H, Alink G, Andersen R, Braesco V, Holst B, Maiani G, et al. A critical assessment of some biomarker approaches linked with dietary intake. *Br J Nutr*. 2000; 86(1): S5-35.

48. Han JH, Lee HJ, Choi HJ, Yun KE, Kang MH. Association between oxidative stress and blood pressure in Korean subclinical hypertensive patients. *Korean J Nutr.* 2013; 46(2):126-36.
49. Hauck AK, Bernlohr DA. Oxidative stress and lipotoxicity. *J Lipid Res.* 2016; 57(11):1976-1986.
50. Burgos RCR, Zhang W, Van Wijk EPA, Hankemeier T, Ramautar R, Van Ser Greef J. Cellular glutathione levels in HL-60 cells during respiratory burst are not correlated with ultra-weak photon emission. *J Photochem Photobiol B.* 2017; 175: 291–296.





## **GLUTAMINA ORAL MODULA A AÇÃO DA INSULINA DEGLUTECA E DA INSULINA REGULAR EM RATOS WISTAR DIABÉTICOS TIPO 1.**

Silvia Carla Santana Ferreira Azevedo<sup>1\*</sup>, Ana Luiza Machado Wunderlich<sup>2</sup>, Laís Akemi Yamada<sup>2</sup>, Vilma Aparecida Ferreira de Godoi<sup>2</sup>, Maria Raquel M. Natali<sup>1</sup>

1. Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil.

2. Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil.

\*Autor correspondente: [silviacarlasantana@gmail.com](mailto:silviacarlasantana@gmail.com)

Endereço: Avenida Colombo, 5790. Bloco H79, sala 101, Campus Universitário.  
CEP 87030-900, Maringá, PR. Fone: (44) 3011-4704.

## RESUMO

Considerando a associação entre insulinização e suplementação com L-glutamina (GLN) no equilíbrio metabólico do diabetes tipo 1 (T1DM), o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos das Insulinas Degludeca (basal) ou Regular (rápida), associadas ou não a GLN, sobre os parâmetros séricos e morfofisiologia hepática em ratos T1DM. Os ratos foram distribuídos em oito grupos e avaliados os parâmetros fisiológicos, histológicos e o metabolismo hepático após 30 dias de suplementação e reposição hormonal. A GLN reduziu a perda de peso e os triglicérides. A Degludeca reduziu a glicemia e a perda de peso, no entanto, aumentou triglicérides e glicogênio hepático. A associação de GLN com Degludeca reduziu triglicérides e o glicogênio, mas eliminou o efeito sobre a glicemia. A Insulina Regular aumentou triglicérides e a associação com GLN normalizou esse parâmetro. A gliconeogênese e glicogenólise foram aumentadas pela Degludeca, com reversão do efeito na associação com GLN. A adição de GLN à Regular aumentou a gliconeogênese sem alterar a glicogenólise. Ambas as insulinas aumentaram a resposta  $\alpha$ -adrenérgica do fígado e a associação com GLN aboliu essa resposta. A associação das insulinas com GLN alteraram o potencial redox do hepatócito sem interferir na gliconeogênese. Ainda, todos os grupos tratados apresentaram aumento da área do hepatócito, mas somente Degludeca diminuiu o número de hepatócitos. A utilização de GLN, associada à diferentes insulinas, por 30 dias, apresentou efeitos modulatórios importantes e diferenciados sobre a ação insulínica.

**Palavras-chave:** Metabolismo hepático, Diabetes tipo 1, L-glutamina, Insulina degludeca, Insulina regular, Histologia hepática

## ABSTRACT

Considering the association between insulinization and supplementation with L-glutamine (GLN) in the metabolic balance of type 1 diabetes (T1DM), the aim of this study was to evaluate the effects of Degludec (basal) or Regular (rapid) insulin, associated or not with GLN, on serum parameters and liver morphophysiology in T1DM rats. The rats were distributed in eight groups and evaluated the physiological, histological parameters and hepatic metabolism after 30 days of supplementation and hormone replacement. GLN reduced weight loss and triglycerides. Degludec reduced blood glucose and weight loss. However, it increased triglycerides and hepatic glycogen. The association of GLN with Degludec reduced triglycerides and glycogen, but abolished the effect on glycemia. Regular increased triglycerides and the association with GLN normalized this parameter. The gluconeogenesis and glycogenolysis were increased by Degludec, with reversal of the effect in association with GLN. The addition of GLN to Regular increased gluconeogenesis without altering glycogenolysis. Both insulins increased the  $\alpha$ -adrenergic response of the liver and the association with GLN abolished this response. The association of insulin with GLN altered the hepatocyte redox potential without interfering with gluconeogenesis. Still, all treated groups showed an increase in area, but only Degludec decreased the number of hepatocytes. The use of GLN associated with different insulins for 30 days showed important and differentiated modulatory effects on insulin action.

**Keywords:** Hepatic metabolism, Type 1 diabetes, L-Glutamine, Degludec insulin, Regular insulin, Liver histology.

## INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus tipo 1 (T1DM) é uma doença crônica resultante da destruição imunológica das células  $\beta$ -pancreáticas, que leva a perda da secreção endógena de insulina [1]. Isto altera a captação insulino-dependente de glicose [2] e o metabolismo hepático, pois modifica a atividade das enzimas da via glicogenogênica, gliconeogênica e lipogênica [3,4]. O resultado é a hiperglicemia, dislipidemia [5] e a desregulação do metabolismo dos hepatócitos [6]. Esses, estão organizados em lóbulos [7] e regionalizados em periportais e perivenosos, que apresentam oxigenação, disponibilidade de nutrientes e expressão enzimática distintas [8]. Portanto são afetados pelo T1DM.

Para a insulinoterapia obrigatória do T1DM existem diferentes tipos de insulina com diferentes tempos de liberação [9]. Dentre essas, a insulinoterapia mista parece ser superior por atender as diferentes demandas de insulina ao longo do dia. No entanto, o alto custo e complexidade desta forma de tratamento restringe sua implantação pelos sistemas públicos de saúde. Por isso, associar suplementos não-hormonais a insulinoterapia, com função aditiva e/ou sinérgica sobre o metabolismo da glicose, pode ser uma boa opção.

Dentro deste contexto, a L-glutamina (GLN), aminoácido não essencial mais abundante do sangue, pode se encontrar reduzido em situações de estresse metabólico, como no T1DM descompensado. A GLN é substrato para a síntese proteica e gliconeogênese [10] e participa, via *swelling* celular, da regulação da expressão e da atividade de enzimas do metabolismo da glicose e lipídios [11]. Por isso, há vasta indicação do seu uso em pacientes catabólicos.

Apesar da utilização de GLN ser um tópico controverso [12,13], já foram demonstrados benefícios da sua utilização em modelos experimentais de estresse metabólico [14]. Todavia, a literatura carece de estudos que associem a suplementação com GLN com diferentes insulinoterapias, que podem apresentar diferentes interações com a GLN.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar parâmetros fisiológicos, bioquímicos, histológicos e o metabolismo hepático em ratos Wistar T1DM tratados com insulina de curta (Insulina Regular, pico plasmático entre 2-3 horas e efeitos entre 6-8 horas) ou longa duração (Insulina Degludeca, sem pico plasmático e efeitos acima de 24 horas), associadas ou não a suplementação oral com GLN.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Animais e tratamento**

Ratos Wistar machos (n=90, 50 dias de idade), provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá foram mantidos em caixas de polipropileno (ciclo claro/escuro de 12/12 horas,  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) no Biotério Setorial do Departamento de Ciências Fisiológicas. Os anestésicos utilizados foram fornecidos pelo Abbott laboratórios do Brasil e pela Syntec do Brasil Ltda. Todos os procedimentos seguiram as normas estabelecidas pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Estadual de Maringá (parecer 9584021115).

A diabetização foi realizada por injeção endovenosa de estreptozotocina (60 mg/kg de peso corporal, Sigma-Aldrich, USA) em tampão citrato, pH 4,5 (10mM), após jejum noturno de 15 horas. Foram considerados diabéticos os animais que, após 4 dias, apresentaram glicemia de jejum  $\geq 250$  mg/dL [21]. Em animais controle foi utilizado somente tampão citrato.

Os animais foram suplementados durante 30 dias, com solução salina 0,9% ou GLN 400 mg/kg por via oral (gavagem), e receberam injeção subcutânea (bomba de infusão - Insight Equipamentos Ltda) de solução salina 0,9% ou Insulina Degludeca (a ser determinada), ou injeção intraperitoneal de Insulina Regular (1,0 U/kg). A dose de Insulina Regular foi previamente estabelecida [15]. A GLN foi obtida em farmácia de manipulação, e a escolha da dose foi baseada na dose diária indicada para a suplementação em pacientes hospitalizados, que varia comumente entre 300-500 mg/Kg/dia [16]. A Insulina Degludeca (Tresiba®, Novo Nordisk®) e a Insulina Regular (Humulin® R, Eli Lilly®) foram obtidas em farmácia comercial.

### **Grupos experimentais**

Os animais foram organizados em um grupo padronização e sete grupos experimentais. No grupo padronização (n=20), a resposta glicêmica a diferentes doses da Insulina Degludeca foi determinada. O sangue foi coletado por transecção caudal, durante 4 dias. As 8 horas da manhã foi aplicada a insulina, seguido de medidas de glicemia as 8, 12 e 17 horas. Do primeiro ao terceiro dia os animais estavam alimentados, e no quarto dia sob jejum noturno

de 15 horas para monitorar a glicemia no jejum. Os demais grupos estão descritos na Tabela 1.

**Tabela 1.** Grupos experimentais tratados durante 30 dias.

<b>Grupos</b>	<b>Tratamentos</b>	
<b>Controle</b>	Grupo C (n=10)	
	Gavagem de solução salina 0,9% e injeção subcutânea de solução salina 0,9%	
<b>Tratados</b>	Grupo D (n=10)	
	Grupo DG (n=10)	Gavagem com 400 mg/kg de glutamina e injeção subcutânea de solução salina 0,9%
	Grupo DIT (n=10)	Gavagem de solução salina 0,9% e injeção subcutânea de Insulina Degludeca (a ser determinado)
	Grupo DITG (n=10)	Gavagem com 400 mg/kg de glutamina e injeção subcutânea de Insulina Degludeca (a ser determinado)
	Grupo DIR (n=10)	Gavagem de solução salina 0,9% e injeção intraperitoneal de Insulina Regular (1,0 U/kg)
	Grupo DIRG (n=10)	Gavagem com 400 mg/kg de glutamina e injeção intraperitoneal de Insulina Regular (1,0 U/kg)

Durante o período experimental (30 dias) foram realizadas avaliações semanais do peso corporal e glicemia de jejum (glicosímetro e tiras de dosagem Optium Xceed, Abbott do Brasil).

### **Coleta de material biológico**

Após 30 dias de tratamento, os animais, sob jejum de 15 horas, foram anestesiados com Tiopental sódico (Thionembutal®) e Cloridrato de Lidocaína 2% (120/10 mg/kg de peso corporal, i.p.). A eutanásia ocorreu por sobredose anestésica. A coleta de sangue foi realizada por punção cardíaca, as amostras

centrifugadas (3.500 rpm, 15 min) e o soro utilizado para as dosagens de triglicerídeos e proteínas totais. Após, foi realizada laparotomia vertical para pesagem e coleta do fígado, fixação das amostras em Bouin/24 horas e armazenamento em solução de álcool 70%.

### **Processamento e Análise Histológica Hepática**

As amostras de fígado foram desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Posteriormente foram realizados cortes histológicos transversais semi-seriados, de 6  $\mu\text{m}$  de espessura, em micrótomo rotativo (Leica® RM2245), para análise morfométrica e histoquímica.

### **Análise Morfométrica**

Os cortes histológicos foram corados com Hematoxilina de Harris e Eosina (H.E.). Foram capturadas imagens da região próxima à veia central, em microscópio óptico Olympus BX41® (objetiva de 20x) com câmera Olympus Q-Color® 3, acoplado a um computador com o programa Q-Capture®. Foi mensurada a área ( $\mu\text{m}^2$ ) de 200 hepatócitos/animal (1000 hepatócitos/grupo), e avaliado o número de hepatócitos em 30 imagens/animal (150 imagens/grupo), pelo programa Image Pró-Plus® 4.5 (Media Cybernetics).

### **Análise Histoquímica**

Os cortes histológicos foram corados com Ácido Periódico de Schiff (P.A.S.). Foram capturadas imagens da região próxima a veia central, em microscópio óptico Olympus BX41® (objetiva de 40x) com câmera Olympus 26 Q-Color® 3, acoplado a um computador com o programa QCapture®. A avaliação do percentual de glicogênio foi realizada pela análise colorimétrica da área contendo glicogênio em 30 imagens/animal (150 imagens/grupo), pelo programa Image Pró-Plus® 4.5 (Media Cybernetics).

### **Isolamento de hepatócitos**

Após jejum de 15 horas, os animais foram anestesiados com Tiopental sódico (Thionembatal®) e Cloridrato de Lidocaína 2% (40/10 mg/Kg de peso corporal) e submetidos à laparotomia. A eutanásia ocorreu por choque



hipovolêmico. O isolamento foi realizado por perfusão hepática com tampão Krebs-Henseleit-Bicarbonato (KH) contendo colagenase 3% [17].

Os hepatócitos ( $1 \times 10^6$  céls/mL) com viabilidade  $> 75\%$ , foram incubados (KH saturado com  $O_2/CO_2$ , a  $37^\circ C$ , sob agitação constante) durante 1 hora na ausência (basal) ou presença dos agentes glicogenolíticos glucagon (1nM), cortisol, adrenalina (1mM, agonista  $\alpha$  e  $\beta$ -adrenérgico) e isoproterenol (20nM, agonista  $\beta$ -adrenérgico); ou dos substratos gliconeogênicos (5mM) glicerol, L-lactato, L-alanina ou L-glutamina.

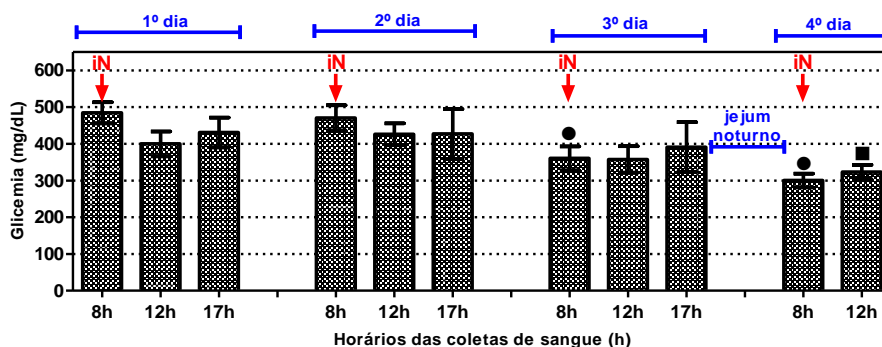
As amostras foram centrifugadas e a fração solúvel coletada para determinação de glicose e L-lactato [18]. A presença de diferença estatística entre os frascos basais e os frascos testes representou a quantidade produzida pelos hepatócitos.

### **Análise Estatística**

Os dados foram submetidos ao teste Kolmogorov-Smirnov (K-S), considerados paramétricos e submetidos a análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey. A determinação da dose de Insulina Degludeca foi feita por teste 't' de Student. O nível de significância foi prefixado em 95% ( $p < 0,05$ ), com o auxílio do programa GraphPad Prism, versão 5.0.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a avaliação da resposta glicêmica foram testadas quatro doses (0,4 U/kg, 1,0 U/kg, 5,0 U/kg e 10,0 U/kg). As doses de 0,4 U/kg e 1,0 U/kg não diferiram entre o primeiro e os demais dias de teste. No entanto, as doses de 5,0 U/kg e 10,0 U/kg promoveram redução da glicemia após jejum noturno (8h, 4º dia), mas somente a dose de 5,0 U/kg também o fez no estado alimentado (8h, 3º dia) e, por isso, foi escolhida para o tratamento dos grupos DIT e DITG (Figura 1).



**Figura 1.** Determinação da variação da glicemia após injeção de Insulina Degludeca. Teste realizado em ratos T1DM após injeção subcutânea de Insulina Degludeca, por quatro dias consecutivos, com a dose de 5,0 U/kg. ●  $p < 0,05$  8h do 3º e 4º dias vs 8h do 1º dia, ■  $p < 0,05$  12h do 4º dia vs 12h do 1º dia. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EP e analisado por teste "t" de Student,  $n = 5$ .

A perda de peso corporal (54%), o aumento (421%) da glicemia de jejum, e dos triglicerídeos (190%) e redução (14%) nas proteínas totais do sangue (Tabela 2), do grupo D comparado ao C, indicam que o modelo diabético foi devidamente estabelecido pelo protocolo experimental utilizado [19, 20, 21].

As insulinas não normalizaram o peso corporal, mas reduziram a perda de peso promovida por T1DM em 30% no grupo DIT e 35% no DIR, quando comparados ao C. Ainda, todos os grupos tratados com insulina normalizaram as proteínas totais do sangue comparado ao grupo C, o que reforça o forte efeito anti-proteolítico do hormônio [22]. Porém, esse efeito é perdido quando GLN é associada a Insulina Regular (DIRG). Assim, GLN associada a Degludeca (DITG) apresenta melhor efeito sobre a preservação da massa corporal, assim como efeito diferenciado sobre a regulação do metabolismo de lipídeos e carboidratos, e nível de degradação proteica (Tabela 2).

**Tabela 2.** Parâmetros fisiológicos e bioquímicos do sangue após 30 dias de tratamento. Peso corporal (g), glicemia jejum (mg/dL), triglicerídeos (mg/dL) e proteínas totais (mg/dL) de ratos dos grupos controle (C), diabético (D), diabético com GLN (DG), diabético com Insulina Degludeca (DIT), diabético com Insulina Degludeca e GLN (DITG), diabético com Insulina Regular (DIR) e diabético com Insulina Regular e GLN (DIRG).

	C	D	DG	DIT	DITG	DIR	DIRG
<b>PARÂMETROS FISIOLÓGICOS</b>							
<b>Peso corporal</b>	337,8±5,46	183,6±3,44	178,5±5,83	234,6±4,98	231,3±7,92	216,5±6,08	185,3±4,05
		a	a	ab	ab	ab	ad
<b>Glicemia de jejum</b>	105,8±2,20	551,9±16,31	437,5±42,40	353,8±19,53	574,5±24,93	592,4±19,61	478,5±28,88
		a	a	ab	ac	a	ad
<b>PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DO SANGUE</b>							
<b>Triglicerídeos</b>	28,7±0,60	83,5±0,90	31,8±1,75	300,5±19,85	138,2±7,53	155,7±20,30	56,2±4,26
		a	b	ab	abc	ab	d
<b>Proteínas Totais</b>	6,5±0,07	5,6±0,08	5,7±0,14	6,4±0,09	6,3±0,05	6,2±0,18	5,6±0,09
		a	a	b	b	b	ad

Resultados expressos como média±EP (n=5). Letra diferentes na mesma linha indicam diferença significativa. a) p<0,05 C vs todos os grupos; b) p<0,05 D vs todos os tratamentos; c) p<0,05 DIT vs DITG e d) DIR vs DIRG. Os dados foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey.

A Degludeca (DIT) foi capaz de reduzir a glicemia de jejum em 36% após 30 dias de tratamento (Tabela 2), valor equivalente ao obtido com quatro dias de tratamento (40% de redução da glicemia de jejum do 4º dia vs 1º dia, Figura 1). Isto demonstra que em ratos T1DM o efeito da Degludeca sobre a glicemia é precoce, refletindo alterações metabólicas significativas já no início do tratamento, efeito não observado com a Regular e a GLN. No entanto, a associação de GLN com Degludeca (DITG) aboliu a capacidade da insulina em reduzir a glicemia de jejum. De forma contrária, a associação da Regular com GLN (DIRG) reduz em 20% a glicemia de jejum comparado a DIR. Aparentemente, os mecanismos de ação das insulinas sobre o metabolismo energético são diferentes.

O tratamento com GLN (DG) normalizou os triglicerídeos plasmáticos. Em contrapartida, o tratamento com Degludeca (DIT) promoveu um aumento de 260% e com a Regular (DIR) de 86%, comparados ao grupo D. A menor perda de massa corporal e diminuição da glicemia de jejum em DIT indicam um possível desvio da glicose para a lipogênese *de novo* (LDN) e forte efeito da Degludeca sobre essa via no fígado. No entanto, o aumento dos triglicerídeos no grupo DIR não é acompanhado de diminuição da glicemia de jejum. Neste caso,

pode ser que a ausência da Regular, 6-8h após a administração, promova períodos de surtos lipolíticos, equivalentes ao grupo diabético sem tratamento (D). Se este for o caso, a dislipidemia do DIR poderia resultar de efeito relacionado a regulação da lipólise periférica.

A adição de GLN às insulinas reduziu os triglicerídeos (50% DITG vs DIT, e 64% DIRG vs DIR), no entanto, em DITG há preservação da massa corporal sem alteração da glicemia. Neste caso, se pelo menos parte dos triglicerídeos advém da LDN a partir da glicose plasmática, a associação de GLN com Degludeca parece interferir neste mecanismo. No DIRG, a adição de GLN normaliza os triglicerídeos em relação a C, um resultado que advém da GLN, uma vez que DG apresentou o mesmo efeito.

A captação celular sódio-acoplada de GLN (Transportador SNAT3, Slc38a3) aumenta a hidratação e o volume celular (*swelling*), processo que regula a síntese de glicogênio e ácidos graxos, e reduz a proteólise [13,23,24]. O efeito da GLN na redução dos triglicerídeos pode estar relacionado com essa capacidade em modular o metabolismo energético. Ratos submetidos a dieta hiperlipídica e gavagem com L-glutamina por quatro semanas ganharam menos peso, aumentaram o consumo de O<sub>2</sub> e aumentaram a oxidação de ácidos graxos em relação a dieta padrão [4]. Apesar não haver efeito sobre o peso corporal no grupo DG, o aumento na beta-oxidação pode ser um dos mecanismos ativado pela GLN neste estudo, e que poderia justificar parcialmente a redução dos triglicerídeos plasmáticos. Um efeito anti-insulínico importante.

Mesmo diabéticos, os fígados dos animais mantiveram as características macroscópicas do órgão, tais como coloração padrão avermelhada, brilhante e com textura homogênea para todos os grupos. Microscopicamente, a organização histológica também foi mantida entre os grupos, que apresentaram organização histológica típica, formada por cordões de hepatócitos, circundados por sinusoides, que convergiam para a veia central. A veia porta, artéria hepática e ducto biliar se mostraram bem definidos.

Apesar disso, houve um aumento de 40% no peso do fígado no grupo D, pode resultar de maior acúmulo de lipídios, resultante da hipertrigliceridemia [21,25] e/ou do maior acúmulo de glicogênio [26,27], como observado no grupo D (Tabela 3). Embora não tenham sido observadas alterações no número de hepatócitos em T1DM, houve aumento de 14% da área comparado a C, que

pode ser associado ao acúmulo de glicogênio observada nesse grupo. Dentre os grupos tratados, apenas DIR reduziu o peso do fígado comparado a D (53%). Considerando que DIR apresentou trigliceridemia 86% maior que D e estoque de glicogênio equivalente a D, essa redução de massa hepática necessita maior investigação.

Os tratamentos com GLN e com Degludeca aumentaram ainda mais a área dos hepatócitos em relação ao grupo D (DG - 26%, DIT - 21% e DITG - 13%) (Tabela 3). Além disso, todos os grupos diabéticos apresentaram estoque de glicogênio hepático aumentado em no mínimo 70%. Esse percentual aumentado de glicogênio caracteriza um quadro de glicogenose secundária, que é o acúmulo anormal de glicogênio resultante do alto fluxo de glicose [26], um quadro acompanhado de hipertrigliceridemia [21, 26]. De todos os grupos, somente em DIT o número de hepatócitos foi reduzido em 14% e o aumento de área celular foi acompanhado de maior acúmulo de glicogênio quando comparados aos grupos C (de 82%) e D (de 58%). A adição de GLN em DITG promoveu diminuição da área do hepatócito e do glicogênio em relação a DIT, e isto, assim como o aumento de triglicérides (via LDN), poderia ser associado a falta de efeito da associação sobre a glicemia de jejum em DITG.

Todavia, em camundongos selvagens que superexpressam SNAT2 (transportador de aminoácidos) somente no fígado, apresentam hipertrigliceridemia e VLDL aumentado, sem alteração na LDN hepática. A causa é a redução da hidrólise dos triglicérides do sangue via *downregulation* da lipase de lipoproteína do tecido adiposo (LPL). Sinais metabólicos gerados no hepatócito pela entrada de aminoácidos (via mTOR/S6K) produzem sinais neuronais aferentes do fígado transmitidos via nervo vago, e sinais eferentes via nervos simpáticos mediam a comunicação fígado-tecido adiposo e/ou aminoácidos-lipídios [28]. Pela mesma via descrita acima, o aumento do estoque de glicogênio hepático também suprime a LPL resultando em hipertrigliceridemia [29]. Como todos os grupos diabéticos apresentaram, provavelmente, essa superexpressão de SNAT2 e elevado estoque de glicogênio, essa poderia ser parte da explicação da hipertrigliceridemia do T1DM e do agravamento deste quadro nos grupos tratados com as insulinas, já que a insulina é um potente inibidor da LPL. Além disso, direcionaria a diminuição da glicemia de jejum em DIT para a glicogenogênese (síntese de glicogênio).

A GLN, isolada e associada as insulinas, mostrou potente efeito sobre a redução da trigliceridemia, um efeito que antagoniza a ação insulínica. Estudos independentes mostraram que a suplementação com GLN via oral aumentou a expressão de SNAT2 em neurônios de camundongos [30], e promoveu resistência à insulina em tecido adiposo de ratos pela associação da N-acetilglicosamina-O-ligada ao IRS1 [4]. No nosso caso, maiores investigações são necessárias para esclarecer se o mecanismo é hepático e/ou periférico.

**Tabela 3.** Peso do fígado (g/100 g de peso corporal), número de hepatócito (13.581.450 $\mu$ m<sup>2</sup>/grupo), área de hepatócito (1000 hepatócitos/grupo) e porcentagem (%) de glicogênio (150 imagens/grupo) de hepatócitos de ratos após 30 dias de tratamento. Grupo controle (C), diabético (D), diabético com GLN (DG), diabético com Insulina Degludeca (DIT), diabético com Insulina Degludeca e GLN (DITG), diabético com Insulina Regular (DIR) e diabético com Insulina Regular e GLN (DIRG).

	C	D	DG	DIT	DITG	DIR	DIRG
<b>Peso do fígado</b>	3,25 $\pm$ 0,06	5,40 $\pm$ 0,10 a	5,02 $\pm$ 0,10 a	5,26 $\pm$ 0,17 a	4,97 $\pm$ 0,19 a	2,51 $\pm$ 0,10 ab	4,88 $\pm$ 0,08 ad
<b>N. de hepatócito</b>	1127,0 $\pm$ 31,91	1140,0 $\pm$ 29,10	1051,0 $\pm$ 26,47	977,9 $\pm$ 11,49 ab	1111,0 $\pm$ 29,84 c	1095,0 $\pm$ 24,81	1057,0 $\pm$ 22,11
<b>Área de hepatócito</b>	220,5 $\pm$ 2,25	256,3 $\pm$ 13,41 a	346,1 $\pm$ 2,17 ab	324,3 $\pm$ 1,28 ab	293,7 $\pm$ 2,37 abc	265,9 $\pm$ 1,72 a	258,9 $\pm$ 1,81 a
<b>% de glicogênio</b>	4,28 $\pm$ 0,06	15,93 $\pm$ 1,42 a	16,11 $\pm$ 1,28 a	25,17 $\pm$ 1,07 ab	16,97 $\pm$ 0,80 ac	17,75 $\pm$ 0,54 a	16,42 $\pm$ 0,75 a

Resultados expressos como média $\pm$ EP (n=5). Letra diferentes na mesma linha indicam diferença significativa. a)p<0,05 C vs todos os grupos; b)p<0,05 D vs todos os tratamentos; c)p<0,05 DIT vs DITG e d)DIR vs DIRG. Os dados foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey.

A evolução do T1DM descompensado leva também a perda progressiva da secreção e/ou ação do glucagon, e alteração do limiar para a secreção de catecolaminas, principais hormônios envolvidos na regulação da glicogenólise e gliconeogênese hepática [31]. Dessa forma, o fígado, como órgão alvo desses hormônios, se torna altamente comprometido e responsável pela hiperglicemia observada. Considerando as alterações já descritas, o metabolismo hepático da glicose foi avaliado em hepatócitos isolados (Tabela 4). Além disso, apesar de somente a L-alanina produzir L-lactato de forma direta, outros precursores podem alterar o balanço redox celular, a razão NAD<sup>+</sup>/NADH e a formação de L-lactato e glicose [32]. Da mesma forma, os agentes glicogenolíticos podem ativar a glicólise e levar à formação de L-lactato. Dessa forma, a avaliação

concomitante da produção de L-lactato (Tabela 5) pode ser utilizada para avaliar o estado redox celular e a direção preferencial de uma determinada via metabólica.

**Tabela 4.** Produção (gliconeogênese) e liberação hepática (glicogenólise) de glicose ( $\mu\text{mol glicose}/ 10^6 \text{ céls.h}$ ), a partir de hepatócitos isolados de ratos após 30 dias de tratamento. Grupo controle (C), diabético (D), diabético com GLN (DG), diabético com insulina Degludeca (DIT), diabético com insulina Degludeca e GLN (DITG), diabético com insulina regular (DIR) e diabético com insulina regular e GLN (DIRG).

	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>DG</b>	<b>DIT</b>	<b>DITG</b>	<b>DIR</b>	<b>DIRG</b>
<b>Basal</b>	0,114 $\pm$ 0,001	0,064 $\pm$ 0,002	0,138 $\pm$ 0,008	0,283 $\pm$ 0,029	0,252 $\pm$ 0,018	0,147 $\pm$ 0,003	0,166 $\pm$ 0,008
		a	b	ab	ab	b	b
<b>PRECURSOR</b>	<b>GLICONEOGÊNESE</b>						
<b>Glicerol</b>	0,258 $\pm$ 0,012	0,111 $\pm$ 0,008	0,214 $\pm$ 0,009	0,622 $\pm$ 0,009	0,276 $\pm$ 0,009	0,139 $\pm$ 0,007	0,248 $\pm$ 0,016
		a	b	ab	bc	a	bd
<b>L-lactato</b>	0,423 $\pm$ 0,026	0,237 $\pm$ 0,022	0,311 $\pm$ 0,010	0,666 $\pm$ 0,009	0,122 $\pm$ 0,007	0,211 $\pm$ 0,004	0,273 $\pm$ 0,007
		a	ab	ab	abc	a	a
<b>L-alanina</b>	0,529 $\pm$ 0,026	0,232 $\pm$ 0,009	0,327 $\pm$ 0,016	0,780 $\pm$ 0,021	0,352 $\pm$ 0,011	0,320 $\pm$ 0,021	0,317 $\pm$ 0,009
		a	ab	ab	abc	ab	ab
<b>L-glutamina</b>	0,336 $\pm$ 0,010	0,085 $\pm$ 0,003	0,208 $\pm$ 0,012	0,543 $\pm$ 0,005	0,287 $\pm$ 0,047	0,220 $\pm$ 0,006	0,227 $\pm$ 0,014
		a	ab	ab	bc	ab	ab
<b>Soma</b>	1,546	0,665	1,132	2,611	1,037	0,890	1,065
<b>AGENTE</b>	<b>GLICOGENÓLISE</b>						
<b>Glucagon</b>	0,083 $\pm$ 0,006	0,038 $\pm$ 0,001	0,158 $\pm$ 0,004	0,248 $\pm$ 0,008	0,161 $\pm$ 0,006	0,186 $\pm$ 0,005	0,189 $\pm$ 0,005
		a	ab	ab	abc	ab	ab
<b>Adrenalina</b>	0,129 $\pm$ 0,003	0,049 $\pm$ 0,001	0,145 $\pm$ 0,002	0,541 $\pm$ 0,024	0,227 $\pm$ 0,017	0,188 $\pm$ 0,010	0,210 $\pm$ 0,009
		a	b	ab	abc	ab	ab
<b>Isoproterenol</b>	0,080 $\pm$ 0,006	0,049 $\pm$ 0,004	0,135 $\pm$ 0,002	0,278 $\pm$ 0,007	0,224 $\pm$ 0,008	0,126 $\pm$ 0,002	0,185 $\pm$ 0,003
		a	ab	ab	abc	ab	abd
<b>Cortisol</b>	0,124 $\pm$ 0,002	0,059 $\pm$ 0,002	0,134 $\pm$ 0,004	0,227 $\pm$ 0,009	0,220 $\pm$ 0,015	0,251 $\pm$ 0,008	0,207 $\pm$ 0,005
		a	b	ab	ab	ab	abd
<b>Soma</b>	0,371	0,195	0,572	1,294	0,832	0,751	0,791

Resultados expressos como média $\pm$ EP (n=5). Letra diferentes na mesma linha indicam diferença significativa. a)  $p < 0,05$  C vs todos os grupos; b)  $p < 0,05$  D vs todos os tratamentos; c)  $p < 0,05$  DIT vs DITG e d) DIR vs DIRG. Os dados foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey.



Na ausência (basal) e presença dos precursores gliconeogênicos utilizados, o T1DM mostrou reduzida produção de glicose (Tabela 4) e de L-lactato (Tabela 5) em hepatócitos isolados, o que corrobora com resultados anteriores [18]. No entanto, como o glicogênio hepático (Tabela 3) aumenta 73% no T1DM, é possível que essa redução represente que a glicose recém-sintetizada esteja sendo dirigida para glicogenogênese indireta (via gliconeogênese). Dessa forma, o acúmulo hepático de glicogênio resultaria da glicogenogênese induzida pela hiperglicemia (glicose circulante) e gliconeogênese, e deterioração do sistema contrarregulador [21]. Ainda, a diminuição da produção de L-lactato (Tabela 5) pode indicar ambiente celular mais oxidado. Mudanças no estado redox celular indicam aumento do estresse oxidativo em indivíduos T1DM [33, 34], e esse novo ambiente favorece vias do catabolismo [35, 36] e a perda de massa corporal observada.

Os tratamentos mostraram produção de glicose basal maior que D. No entanto, há uma maior presença de glicose no líquido de incubação dos hepatócitos dos grupos DIT e DITG (Tabela 4). É possível que isto esteja associado ao maior acúmulo de glicogênio (DIT 58% maior que D) a partir da glicose extra e intracelular (Tabela 3). Além disso, a associação de Degludeca com GLN (DITG) resultou numa produção basal de glicose igualmente alta comparada ao grupo DIT, mas glicogênio similar ao grupo D. Essa pode ser a causa da ausência de efeito da associação sobre a glicemia de jejum no grupo DITG, ou seja, o efeito da Degludeca observado na ausência de GLN parece ser predominante sobre a glicogenogênese direta e indireta, e esses efeitos foram modulados pela GLN em DITG. Por sua vez, a redução do estoque de glicogênio hepático observado em DITG pode ter suprimido essa alça de feedback negativo autonômica sobre a LPL e reduzido a trigliceridemia.

Apesar dos tratamentos com GLN (DG) e Degludeca (DIT) reverterem o efeito de T1DM sobre a capacidade gliconeogênica a partir de L-lactato, o aumento observado em DIT excedeu em 36% comparado a C e 64% comparado a D. A adição de GLN em DITG aboliu esse efeito, reduzindo a gliconeogênese em 50% comparado a D. Assim como para o L-lactato, a gliconeogênese a partir do glicerol aumentou em DIT (58% maior que C e 82% maior que D) e a adição de GLN e GLN isolada, restabeleceu o valor de C (Tabela 4).

A produção de glicose a partir de L-alanina e L-glutamina se mostrou aumentada em todos os grupos tratados comparados ao D. Esse aumento também foi maior no DIT para ambos aminoácidos (L-alanina: 13% maior que C e 70% maior que D; L-glutamina: 38% maior que C e 84% maior que D), com diminuição dessa produção pela associação com GLN (DITG). O modelo de T1DM induzido por estreptozotocina em ratos superexpressa SNAT2 (transportador de L-alanina), mas não SNAT3 (transportador de L-glutamina), no fígado [24], e mesmo assim a produção de glicose pelos hepatócitos foi maior com L-glutamina que com L-alanina. Os tratamentos não alteraram a produção de L-lactato a partir da L-alanina, mas aumentaram a partir da L-glutamina (Tabela 5). Isto indica que a maior parte do esqueleto carbônico da L-alanina foi convertido em glicose e que a L-glutamina, por ser metabolizada na mitocôndria, pode estar transferindo unidades de carbono e equivalentes redutores para o citosol, favorecendo vias como a gliconeogênese. A produção aumentada de L-lactato a partir de todos os precursores gliconeogênicos em relação a D (Soma, Tabela 5), pode indicar um ambiente celular mais reduzido, o que indica favorecimento de vias anabólicas, como a gliconeogênese (Tabela 4).

Dessa forma, para todos os precursores gliconeogênicos testados, fica evidente que a Degludeca é o tratamento que mais intensifica a capacidade gliconeogênica hepática (Soma, Tabela 4), a valores acima de C. Ainda, a Degludeca (DIT) diminui e a Regular aumenta 50% a produção de L-lactato basal em relação a C e D. Isso também poderia explicar o grande aumento na produção de glicose no DIT e menor no DIR (Tabela 4 e 5). Este pode ser um dos fatores responsáveis pelo maior acúmulo de glicogênio pela via indireta (Tabela 3) em DIT. Além disso/Todavia, a GLN associada à Degludeca diminui esse acúmulo, em parte pelo efeito sobre a redução da gliconeogênese. A associação das insulinas com GLN altera a produção de L-lactato (Soma, Tabela 5) e isso se reflete na produção de glicose, em relação às insulinas isoladas. Neste caso é possível que a associação com GLN tenha alterado o potencial redox (mais reduzido em DITG e mais oxidado em DIRG) e tenha interferido diretamente na gliconeogênese.

Na presença dos agentes glicogenolíticos (Tabela 5), a GLN e a Insulina Regular isolada promoveram aumento de L-lactato, no entanto, a Insulina Degludeca isolada promoveu diminuição dessa produção (Soma, tabela 5) em

relação a D. Isto pode representar um efeito mais potente de GLN e Insulina Regular sobre a glicólise. A associação de GLN promoveu aumento da produção de L-lactato no DITG e redução em DIRG comparado as insulinas isoladas. No caso da associação com a Regular, a GLN parece ter alterado somente o potencial redox e não a glicogenólise pois não altera a glicose no líquido de incubação (Tabela 4).

**Tabela 5.** Produção hepática de L-lactato ( $\mu\text{mol L-lactato}/ 10^6 \text{ céls.h}$ ) a partir de hepatócitos isolados de ratos após 30 dias de tratamento. Grupo controle (C), diabético (D), diabético com GLN (DG), diabético com Insulina Degludeca (DIT), diabético com Insulina Degludeca e GLN (DITG), diabético com Insulina Regular (DIR) e diabético com Insulina Regular e GLN (DIRG).

	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>DG</b>	<b>DIT</b>	<b>DITG</b>	<b>DIR</b>	<b>DIRG</b>
<b>Basal</b>	0,039±0,002	0,042±0,003	0,038±0,001	0,024±0,001	0,043±0,001	0,072±0,005	0,028±0,002
				ab	c	ab	d
<b>PRECURSOR</b>	<b>PRECURSORES GLICONEOGÊNICOS</b>						
<b>Glicerol</b>	0,084±0,002	0,045±0,002	0,055±0,001	0,055±0,003	0,060±0,001	0,066±0,001	0,038±0,001
		a	ab	ab	abc	ab	ad
<b>L-alanina</b>	0,104±0,002	0,043±0,001	0,053±0,002	0,044±0,002	0,045±0,001	0,053±0,005	0,069±0,003
		a	a	a	a	a	abd
<b>L-glutamina</b>	0,074±0,003	0,030±0,001	0,054±0,001	0,040±0,001	0,057±0,001	0,051±0,001	0,040±0,002
		a	ab	ab	abc	ab	abd
<b>Soma</b>	0,262	0,118	0,162	0,139	0,162	0,170	0,147
<b>AGENTE</b>	<b>AGENTES GLICOGENOLÍTICOS</b>						
<b>Glucagon</b>	0,034±0,001	0,024±0,001	0,033±0,001	0,020±0,001	0,042±0,004	0,053±0,002	0,026±0,001
		a	b	a	bc	ab	d
<b>Adrenalina</b>	0,031±0,001	0,039±0,004	0,044±0,002	0,026±0,001	0,043±0,002	0,045±0,001	0,033±0,003
					c	a	
<b>Isoproterenol</b>	0,031±0,002	0,036±0,002	0,044±0,001	0,023±0,001	0,031±0,002	0,045±0,001	0,033±0,001
			ab	b		ab	d
<b>Cortisol</b>	0,041±0,001	0,025±0,001	0,037±0,001	0,036±0,001	0,035±0,004	0,061±0,003	0,063±0,005
		a				ab	ab
<b>Soma</b>	0,137	0,124	0,158	0,105	0,151	0,204	0,155

Resultados expressos como média±EP (n=5). Letra diferentes na mesma linha indicam diferença significativa. a)p<0,05 C vs todos os grupos; b)p<0,05 D vs todos os tratamentos; c)p<0,05 DIT vs DITG e d)DIR vs DIRG. Os dados foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey.

Como o acúmulo de glicogênio (Tabela 3) também pode indicar resistência a degradação imposta pelos tratamentos, particularmente Degludeca, a glicogenólise foi avaliada (Tabela 4) na presença de agentes glicogenolíticos clássicos. A soma dos valores glicogenolíticos (Soma, tabela 4)

nos indica que, assim como para a gliconeogênese, a capacidade glicogenolítica do T1DM mostrou-se reduzida. O tratamento com as insulinas aumenta a resposta glicogenolítica, a valores muito maiores que C. Efeito compartilhado pela GLN isolada, indicando um efeito da GLN *per se*. A redução na liberação de glicose do T1DM, mesmo com estoque de glicogênio aumentado, pode indicar dessensibilização a ação destes agentes e/ou deterioração na ação dos mesmos. A resposta obtida com os tratamentos com as insulinas e com GLN indicam uma melhora nesse aspecto.

A resposta  $\beta$ -adrenérgica é representada pela liberação de glicose a partir do isoproterenol (agonista  $\beta$ -adrenérgica). Já a diferença entre a glicose liberada pela adrenalina (agonista  $\alpha$  e  $\beta$ -adrenérgico) e pelo isoproterenol representam a ativação  $\alpha$ -adrenérgica (Tabela 4). A resposta  $\beta$ -adrenérgica correspondeu no C a 62%, D a 100%, DG a 93%, DIT a 52%, DITG a 99%, DIR a 67% e DIRG a 88%. De forma complementar, a resposta  $\alpha$ -adrenérgica correspondeu no C a 38%, D a 0%, DG a 7%, DIT a 48%, DITG a 1%, DIR a 33% e DIRG a 12%. A resposta predominante do grupo C é  $\beta$ -adrenérgica, enquanto no T1DM a resposta  $\alpha$ -adrenérgica desaparece, um efeito que pode resultar de neuropatia resultante da hiperglicemia descompensada, já que os receptores  $\alpha$  são encontrados predominantemente nas sinapses simpáticas do fígado [37]. Apesar das insulinas recuperarem os valores  $\alpha$  e  $\beta$ -adrenérgicos para valores próximos do C, a Insulina Degludeca é a que mais se aproxima. Por outro lado, a GLN, isolada e associada às duas insulinas, se aproxima dos valores  $\beta$ -adrenérgicos do grupo D, não promovendo a melhora esperada para o tratamento com relação a esse aspecto.

A razão pela qual as insulinas aumentam a resposta  $\alpha$ -adrenérgica não pode ser justificada pelos resultados, mas podem estar aumentando a resposta hepática à inervação simpática (predominantemente  $\alpha$ -adrenérgica), seja por ação hepática direta ou indireta através dos núcleos hipotalâmicos de controle do Sistema Nervoso Simpático. Os resultados apontam para maior eficiência da Insulina Degludeca isolada e menor eficiência para a GLN isolada e associada às insulinas. Como o T1DM descompensado altera o limiar de sensibilidade simpática e a resposta adrenérgica, o efeito das insulinas, particularmente da Degludeca, é positivo.

## CONCLUSÃO

A Insulina Degludeca reduz a glicemia de jejum, e este efeito sobre a sensibilidade adrenérgica associado aos outros efeitos já descritos anteriormente, indicam que esta promove maior controle metabólico. Os benefícios no uso de L-glutamina em indivíduos metabolicamente comprometidos se mostrou controverso. A suplementação por 30 dias com esse aminoácido, demonstra grande capacidade de modular o metabolismo *per se* e as ações insulínicas. A Insulina Degludeca foi a que melhor interagiu com L-glutamina e a responsável pelos resultados mais expressivos. A modulação do metabolismo energético exercido pela L-glutamina modifica os aspectos avaliados demonstrando que não é um composto inócuo e que seus efeitos associados a insulino terapia depende também do tipo de insulina que está sendo utilizada.

## REFERÊNCIAS

- [1] Centers for disease control and prevention (CDC). Diabetes by the numbers. [www.cdc.gov/diabetes/basics/diabetes.html](http://www.cdc.gov/diabetes/basics/diabetes.html) [accessed 30 May 2019].
- [2] Cryer PE. The barrier of hypoglycemia in diabetes. *Diabetes*. 2008; 57(12): 3169–3176. Doi:10.2337/db08-1084.
- [3] Charidemou E, Ashmore T, Li X, McNally BD, West JA, Liggi S, Harvey M, Orford E, Griffin JL. A randomized 3-way crossover study indicates that high-protein feeding induces de novo lipogenesis in healthy humans. *JCI Insight*. 2019; 4(12): e124819. Doi:10.1172/jci.insight.124819.
- [4] Abboud KY, Reis SK, Martelli ME, Zordão OP, Tannihão F, Souza AZZ, Assalin HB, Guadagnini D, Rocha GZ, Saad MJA, Prada PO. Oral glutamine supplementation reduces obesity, pro-inflammatory markers, and improves insulin sensitivity in DIO wistar rats and reduces waist circumference in overweight and obese humans. *Nutrients*. 2019; 11(3): 536. Doi: 10.3390/nu11030536.
- [5] Rowbottom DG, Keast D, Morton AR. The emerging role of glutamine as an indicator of exercise stress and overtraining. *Sports Medicine*. 1996; 21, 80-97. Doi: 10.2165/00007256-199621020-00002.
- [6] Duncan AW, Dorrell C, Grompe M. Stem cells and liver regeneration. *Gastroenterology*. 2009; 137(2): 466–481. Doi: 10.1053/j.gastro.2009.05.044.
- [7] Jungermann K, Kietzmann T. Zonation of parenchymal and nonparenchymal metabolism in liver. *Annu Rev Nutr*. 1996; 16(1): 179–203. Doi:10.1146/annurev.nu.16.070196.00114.
- [8] Kietzmann T. Metabolic zonation of the liver: The oxygen gradient revisited. *Redox biology*. 2017; 11(4): 622-630. Doi:10.1016/j.redox.2017.01.012.
- [9] Miller RG, Secrest AM, Sharma RK, Songer TJ, Orchard TJ. Improvements in the life expectancy of type 1 diabetes: The Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications study cohort. *Diabetes*. 2012; 61(11): 2987-2992. Doi:10.2337/db11-1625.
- [10] Gebhardt R. Metabolic zonation of the liver: regulation and implication for liver function. *Pharmacol Ther*. 1992; 53(3): 275-354. Doi:10.1016/0163-7258(92)90055-5.

- [11] Häussinger D, Graf D, Weiergräber OH. Glutamine and Cell Signaling in Liver. *J Nutri.* 2001; 131(9), 2509S–2514S. Doi:10.1093/jn/131.9.2509S.
- [12] Wernerman J. What is actually attributable to Glutamine? *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2017; 41(1): 9. Doi: 10.1177/0148607116637938.
- [13] Cruzat V, Rogero MM, Keane KN, Curi R, Newsholme P. Glutamine: Metabolism and immune function, supplementation and clinical translation. *Nutrients.* 2018; 10(11): 1564. Doi: 10.3390/nu10111564.
- [14] Pithon-curi TC, Levada AC, Lopes LR, Doi SQ, Curi R. Glutamine plays a role in superoxide production and the expression of p47phox, p22phox and gp91phox in rat neutrophils. *Clin Sci.* 2002; 103(4), 403–408. Doi:10.1042/cs1030403.
- [15] Schiavon FP, Gazola VA, Furlan MM, Barrena HC, Bazotte RB. Paradoxical increase in liver ketogenesis during long-term insulin-induced hypoglycemia in diabetic rats. *Exp. Biol. Med. (Maywood).* 2011; 236(2): 227-32. Doi:10.1258/ebm.2010.010266.
- [16] Haussinger D, Schliess F. Glutamine metabolism and signaling in the liver. *Front Biosci.* 2007; 1;12: 371-91.
- [17] Branquinho N, Loiola M, Crepaldi L, Yamada LA, Azevedo SCSF, Bataglini C, Brito M, Godoi VAF, Pedrosa MMD, Natali MR. Responses of the adult rat glucose metabolism to early life feeding, caloric restriction and refeeding. *J Pharm Pharmacol.* 2019; 6(4): 370-379. Doi: 10.17265/2328-2150/2018.04.008.
- [18] Bergmeyer HU, Bernt E. Lactate-dehydrogenase, UV-assay with pyruvate and NADH. In: Bergmeyer. H. U. (Ed.) *Methods of enzymatic analysis.* Academic Press, New York. 1974; 2: 574-579.
- [19] Uliana CH, Panizzon CPNB, Trevizan AR, Sehaber CC, Ramalho FV, Martins HÁ, Zanoni JN. Is L-Glutathione more effective than L-Glutamine in preventing enteric diabetic neuropathy? *Dig Dis Sci.* 2013; 59(5), 937-948. Doi:10.1007/s10620-013-2993-2
- [20] Malik A, Morya Rk, Bhadada, Sk, Rana S. Type 1 diabetes mellitus: Complex interplay of oxidative stress, cytokines and gastrointestinal motility and small intestinal bacterial overgrowth. *Eur J Clin Invest.* 2018; 48(11):e13021. Doi:10.1111/eci.13021.
- [21] Azevedo SCSF, Rosa CVD, Wunderlich ALM, Yamada LA, Mariano IR, Bataglini C, Branquinho NTD, Raposo SR, Bazotte RB, Baroni EA, Natali MRM,



Pedrosa MMD, Godoi VAF. Glutamine or glutamine dipeptide supplementation improves gluconeogenesis and liver glycogenesis in type 1 diabetic rats. *J Pharm Pharmacol*. 2019; 7: 398-407. Doi:10.17265/2328-2150/2019.07.005.

[22] Carvalheira JB, Zecchin HG, Saad MJA. Vias de sinalização da insulina. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2002; 46(4): 419-425. Doi:10.1590/S0004-27302002000400013.

[23] Baquet A, Maisin L, Hue L. Swelling of rat hepatocytes activates acetyl-CoA carboxylase in parallel to glycogen synthase. *Biochem J*. 1991; 15;278 (Pt 3): 887-890. Doi:10.1042/bj2780887.

[24] Varoqui H, Erickson JD. Selective Up-Regulation of System A Transporter mRNA in Diabetic Liver. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002; 290(3): 903-8. Doi:10.1006/bbrc.2001.6281.

[25] Tronchini EA, Trevizan AR, Tashima CM, Freitas P, BazotteRB, Marli ASP, Zanoni JN. Effects of L-glutamine on myenteric neuron and of the mucous of the ileum of diabetic rats. *An Acad Cienc*. 2013; 85(3): 1165-1176. Doi:10.1590/S0001-37652013005000052.

[26] Giordano S, Martocchia A, Toussan L, Stefanelli M, Pastore F, Devito A, Risicato MG, Ruco L, Falaschi P. Diagnosis of hepatic glycogenesis in poorly controlled type 1 diabetes mellitus. *World J Diabetes*. 2014; 5(6): 882-888. Doi: 10.4239/wjd.v5.i6.882 ERA 34.

[27] Santos BL, Souza CFM, Schuler-Faccini L, Refosco L, Epifanio M, Nalin T, Vieira SMG, Schwartz IVD. Glycogen storage disease type I: clinical and laboratory profile. *J Pediatr (Rio J)*. 2014; 90(6): 572-579. Doi: 10.1016/j.jped.2014.02.005.

[28] Uno K, Yamada T, Ishigaki Y, Imai J, Hasegawa Y, Sawada S, Kaneko K, Ono H, Asano T, Oka Y, Katagiri H. A hepatic amino acid/mTOR/S6K-dependent signalling pathway modulates systemic lipid metabolism via neuronal signals. *Nat Commun*. 2015; 13;6: 7940. Doi: 10.1038/ncomms8940.

- [29] Yahagi N. Hepatic control of energy metabolism via the autonomic nervous system. *J Atheroscler Thromb*. 2017; 24(1): 14-18. Doi: 0.5551/jat.RV16002.
- [30] Baek JH, Vignesh A, Son H, Lee DH, Roh GS, Kang SS, Cho GJ, Choi WS, Kim HJ. Glutamine supplementation ameliorates chronic stress-induced reductions in glutamate and glutamine transporters in the mouse prefrontal cortex. *Exp Neurobiol*. 2019; 28(2): 270-78. Doi: 10.5607/en.2019.28.2.270.
- [31] Winiarska K, Szymanski K, Gorniak P, Dudziak M, Bryla J. Hypoglycaemic, antioxidative, and nephroprotective effects of taurine in alloxan diabetic rabbits. *Biochimie*. 2009; 91(2): 261-270. Doi: 10.1016/j.biochi.2008.09.006.
- [32] Adeva M, González-Lucán M, Seco M, Donapetry C. Enzymes involved in l-lactate metabolism in humans. *Mitochondrion*. 2013; 13(6), 615–629. Doi: 10.1016/j.mito.2013.08.011.
- [33] Oktyabrsky ON, Smirnova GV. Redox regulation of cellular functions. *Biochemistry*. 2007; 72(2), 132-45.
- [34] Xie Z, Wu B, Shen G, Li X, Wu Q. Curcumin alleviates liver oxidative stress in type 1 diabetic rats. *Molec Med Reports*. 2018; 17: 103-108. Doi: 10.3892/mmr.2017.7911.
- [35] Sies H. Biochemistry of oxidative stress. *Angewandte Chemie International Edition in English*. 1986; 25(12):1058-1071. Doi:10.1002/anie.198610581.
- [36] Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev*. 2010; 4(8), 118-26. Doi: 10.4103/0973-7847.70902.
- [37] Verbeme AJM, Sabetghadam A, Korim WS. Neural pathway that control the glucose counterregulatory response. *Front Neurosci*. 2014; 26(8): 38. Doi: 10.3389/fnins.2014.00038.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o Diabetes (DM) causa em torno de 5% de todas as mortes globais por ano. As prioridades da organização para 2019 incluem o controle de doenças crônicas não transmissíveis, como DM, que atinge 13 milhões de pessoas só no Brasil. Estima-se que hoje, do total de pessoas diabéticas, 600.000 sejam portadoras do diabetes tipo 1 (T1DM). O aumento crescente no número de portadores gerou a necessidade do desenvolvimento de novos tratamentos e terapias de insulinização que amenizassem os danos da doença. Visto que o fígado é o grande regulador da homeostase glicêmica, seu papel no desenvolvimento da doença é relevante. A partir disso, neste trabalho, além de parâmetros fisiológicos e séricos, foram avaliados a histologia, metabolismo de glicose (gliconeogênese e glicogenogênese) e estresse oxidativo no tecido hepático, em ratos diabéticos tipo 1, induzido por estreptozotocina.

O uso de insulina é imprescindível no tratamento do T1DM e deve ser instituído assim que o diagnóstico for realizado. Embora a insulinização mista possa atender as diferentes demandas de insulina ao longo do dia, o alto custo e complexidade dessa forma de tratamento a torna inviável para grande parte dos portadores. Dessa forma, o modelo experimental de T1DM utilizado foi associado a reposição hormonal com dois tipos de insulina, com cinética e duração diferentes, a fim de estabelecer as diferenças no tratamento e desenvolvimento da doença na presença de cada uma delas. Devido a utilização das insulinas terem sido feitas de modo separado e não misto, o que reduz sua cobertura, foi associado o suplemento não-hormonal L-glutamina, aminoácido com ação conhecida sobre situações de estresse metabólico, como coadjuvante no tratamento da doença.

Os resultados obtidos desta tese, além de mostrar novas formas de estudo do diabetes, possibilitaram avaliar o real benefício da inserção de suplementações no tratamento da doença. Nossos resultados mostraram que a normoglicemia é um processo não-imediato, de progressão lenta e apenas os grupos tratados com a Insulina Basal Degludeca (DIT) foram capazes de diminuir a glicemia em relação ao grupo diabético. Todavia, para que a glicemia fosse diminuída, todo metabolismo hepático de glicose e lipídios foi modificado. Além disso, a utilização de GLN, associada ou não as insulinas, interfere de maneira

expressiva com os resultados encontrados nos grupos isolados (DIT e DIR). Ambas as insulinas diminuíram o estresse oxidativo hepático, assim como GLN isolada. As insulinas também aumentaram a capacidade e a intensidade da resposta glicogenolítica, a valores muito maiores que do grupo C. Os resultados referentes a produção hepática de L-lactato demonstram que a associação de GLN as insulinas parecem alterar o potencial redox, mas não interfere com a gliconeogênese.

Um aspecto interessante dos resultados foi a ativação da síntese de glicogênio (glicogenogênese) no grupo tratado com Degludeca, que parece estar relacionado com o aumento de triglicerídeos e a diminuição da glicemia e da gliconeogênese, via síntese indireta de glicogênio. Esse efeito de Degludeca em aumentar a glicogenogênese pode piorar o quadro de glicogenose secundária e poderia justificar o fato deste ter sido o único tratamento que reduziu o número de hepatócitos. A presença de GLN (DITG) alterou essa dinâmica, abolindo o efeito de Degludeca sobre a glicemia e aumentando a gliconeogênese em relação ao grupo DIT. Além disso, a associação parece melhorar esse quadro pois normaliza número de hepatócitos, reduz o conteúdo de glicogênio e reduz triglicerídeos plasmáticos. O mesmo efeito sobre a glicemia e gliconeogênese foi observado nos grupos tratados com Insulina Regular (DIR e DIRG) e GLN (DG).

Dessa forma, embora a Insulina Degludeca tenha promovido diminuição da glicemia, os mecanismos que permitiram essa diminuição necessitam de maiores investigações, assim como a utilização de GLN, que apresenta efeitos tanto isolada como associada a ambas insulinas.

**ANEXO I:** Normas da revista “Journal of Diabetes and Its Complications”**JOURNAL OF DIABETES AND ITS  
COMPLICATIONS****DESCRIPTION**

*Journal of Diabetes and Its Complications* (JDC) is a journal for health care practitioners and researchers that publishes original research about the pathogenesis, diagnosis and management of diabetes mellitus and its complications. JDC also publishes articles on physiological and molecular aspects of glucose homeostasis.

The primary purpose of *JDC* is to act as a source of information usable by diabetes practitioners and researchers to increase their knowledge about mechanisms of diabetes and complications development, and promote better management of people with diabetes who are at risk for those complications.

Manuscripts submitted to *JDC* can report any aspect of basic, translational or clinical research as well as epidemiology. Topics can range broadly from early prediabetes to late-stage complicated diabetes. Topics relevant to basic/translational reports include pancreatic islet dysfunction and insulin resistance, altered adipose tissue function in diabetes, altered neuronal control of glucose homeostasis and mechanisms of drug action. Topics relevant to diabetic complications include diabetic retinopathy, neuropathy and nephropathy; peripheral vascular disease and coronary heart disease; gastrointestinal disorders, renal failure and impotence; and hypertension and hyperlipidemia.

***Submission***

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All

correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

### *Submit your article*

Please submit your article via <https://www.evis.com/profile/#/JDC/login>.

### *Article types*

N.B. For reasons of available space, manuscripts that exceed the required word limits (below) will be declined automatically. All articles other than Editorials and Letters to the Editor are subject to full peer review.

1. **Editorials** are either written or commissioned by the Editors and should not exceed 1000 words (not including a maximum of 20 references; one small figure can be included).

2. **Commentaries** (1000 words not including a maximum of 20 references and one small figure) offer a stimulating, journalistic and accessible insight into issues of common interest. They are usually commissioned by the Editors but unsolicited articles will be considered. Debates comprise two commentaries of opposing or contrasting opinion written by two different groups of authors. Controversial opinions are welcomed as long as they are set in the context of the generally accepted view.

3. **Original Research Articles** should be a maximum of 5000 words. The word limit includes a combined total of five figures or tables with legends, but does not include up to 50 references and an abstract of up to 200 words structured according to Aims, Methods, Results, Conclusions and Keywords. Divide the manuscript into the following sections: Title Page; Structured Abstract; Introduction; Subjects, Materials and Methods; Results; Discussion; Acknowledgements; References; figures and tables with legends.

4. **Brief Reports** should not exceed 1000 words, including a summary of no more than 50 words (but not including up to 20 references) and may be a preliminary report of work completed, a final report or an observation not requiring a lengthy write-up.

5. **Review articles** should be a maximum of 5000 words, including a summary of no more than 200 words (not including up to 75 references) with subheadings in the text to highlight the content of different sections. The word limit includes a combined total of five figures or tables with legends. Reviews are generally commissioned by the Editors but unsolicited articles will be considered.

6. **Letters to the Editor** should be no more than 400 words.

### *Referees*

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our Support site. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

***Para mais informações acesse:*** AUTHOR INFORMATION PACK 2 Aug 2019  
[www.elsevier.com/locate/jdiacom](http://www.elsevier.com/locate/jdiacom)

## ANEXO II: Normas da Revista Diabetes & Metabolism



### DIABETES & METABOLISM

Official publication of the French Society for the study of Diabetes (SFD)

#### DESCRIPTION

*A high quality scientific journal with an international readership* Official publication of the SFD, *Diabetes & Metabolism*, publishes high-quality papers by leading teams, forming a close link between hospital and research units. *Diabetes & Metabolism* is published in English language and is indexed in all major databases with its impact factor constantly progressing.

*Diabetes & Metabolism* contains original articles, short reports and comprehensive reviews. The latter are updates written by internationally recognized specialists carefully edited in order to help clinicians and researchers keep informed about the latest developments in the field of diabetes.

#### *Types of article*

Contributions may be submitted in the form of: Original articles should not exceed 4 000 words, can include up to 6 tables and/or figures and a maximum of 40 references Review papers should not exceed 7 500 words, can include up to 8 tables and/or figures and up to 60 references Letters to the editor should not exceed 1 000 words, and up to 10 references Brief reports should not exceed 1 750 words plus one table or figure, and 15 references Commentaries should not exceed 1750 words plus one table or figure and up to 15 references Editorials, are usually solicited by the editors, should not exceed 1 500 words plus one table, and 15 references



## *PREPARATIONS*

### *Article structure*

The manuscript should be divided into sections: Introduction, Methods, Results, Discussion.

### *Introduction*

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

### *Material and methods*

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

### *Results*

Results should be clear and concise.

### *Discussion*

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

### *Conclusions*

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

**Para mais informações acesse:** AUTHOR INFORMATION PACK 19 Aug 2015  
[www.elsevier.com/locate/diabet](http://www.elsevier.com/locate/diabet)

## ANEXO III: Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais - UEM



Comissão de Ética no Uso de Animais

da

Universidade Estadual de Maringá

## CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO ORAL COM L-GLUTAMINA SOBRE O METABOLISMO SISTÊMICO E HEPÁTICO DE RATOS WISTAR DIABÉTICOS TIPO 1 SUBMETIDOS À INSULINO TERAPIA.", protocolado sob o CEUA nº 9584021115, sob a responsabilidade de **Vilma Aparecida Ferreira De Godol e equipe; Camila Bataglin; Elizete Rosa Dos Santos Silva; Juliana Nunes De Lima Martins; Jurandir Fernando Comar; Márcia Fabrício; Sílvia Carla Santana Ferreira Azevedo; Valéria Schoffen Romão Carrascoza** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (CEUA/UEM) em reunião de 04/12/2015.

We certify that the proposal "EVALUATION OF THE EFFECTS OF ORAL SUPPLEMENTATION WITH L-GLUTAMINE ON THE SYSTEMIC AND HEPATIC METABOLISM IN TYPE 1 DIABETIC WISTAR RATS SUBMITTED TO INSULIN THERAPY.", utilizing 264 Heterogenic rats (264 males), protocol number CEUA 9584021115, under the responsibility of **Vilma Aparecida Ferreira De Godol and team; Camila Bataglin; Elizete Rosa Dos Santos Silva; Juliana Nunes De Lima Martins; Jurandir Fernando Comar; Márcia Fabrício; Sílvia Carla Santana Ferreira Azevedo; Valéria Schoffen Romão Carrascoza** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes (or teaching) - it's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the State University of Maringá (CEUA/UEM) in the meeting of 12/04/2015.

Vigência da Proposta: de 03/2016 a 07/2019

Laboratório: Dfs/biofísica

Procedência: Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá

Espécie: Rato heterogêneo

Gênero: Machos

Idade: 50 dias

N: 264

Linhagem: wistar

Peso: 180 g

Resumo: A ausência de insulina no Diabetes Mellitus Tipo 1 (DM1) impede que a razão insulina/glucagon aumente, fazendo com que o fígado permaneça gliconeogênico. Associado a isto, há a incapacidade dos tecidos insulino-dependentes de captar glicose, promovendo hiperglicemia e o desenvolvimento de complicações crônicas, como a síntese e acúmulo contínuo e exacerbado de glicogênio (glicogenose secundária) nas células hepáticas. O aminoácido L-glutamina (GLN) tem a capacidade de promover redução do estresse oxidativo e das complicações crônicas associadas ao diabetes, no entanto, sua concentração plasmática encontra-se reduzida nestes pacientes. Resultados obtidos em nosso laboratório com ratos DM1 não tratados com insulina demonstraram que a GLN pode promover redução da gliconeogênese e glicogenose hepática no jejum, melhorando um possível quadro de injúria hepática. Levando em consideração que o processo de insulinização inadequado, que acompanha muitos pacientes DM1 metabolicamente descompensados, pode exacerbar o quadro de glicogenose hepática no estado alimentado, a avaliação do potencial terapêutico da suplementação com L-glutamina nestes indivíduos se torna relevante. Desta forma, o objetivo deste trabalho é avaliar o efeito da suplementação oral com GLN sobre a morfofisiologia hepática, estresse oxidativo e metabolismo geral, de ratos Wistar DM1 alimentados, submetidos ou não à insulina terapia. Ratos Wistar machos (50d e 180g) DM1 (STZ 60 mg/Kg) serão divididos em grupos: padronização da dose de insulina degluteca, submetidos a gavagem diária com salina ou GLN 400 mg/Kg, submetidos a insulina terapia com Insulina Regular Humana (1 U/Kg, tratado e metabolicamente descompensado) ou Insulina degluteca - Tresiba® (0,1 - 0,5 U/kg, tratado e metabolicamente compensado) com ou sem GLN, por 30 dias. Serão realizadas análises semanais (peso corporal, ingestão alimentar, glicemia), e após o período de 30 dias os animais terão a glicogenólise e gliconeogênese avaliada em hepatócitos isolados; a histologia hepática avaliada através das técnicas de hematoxilina-eosina (morfologia geral), Sudan III (histoquímica, inclusões lipídicas) e P.A.S. (histoquímica, glicogênio hepático); avaliação da concentração sanguínea de frutosemina, colesterol, triglicerídeos, AST, ALT, proteínas totais; e do estresse oxidativo (proteína carbonilada, ROS, glutathione e enzimas anti-oxidantes). Os resultados serão apresentados como média ± desvio padrão, comparados pela ANOVA one way ou teste t, e prefixando-se o nível de significância em 95%.

Maringá, 12 de janeiro de 2016



*Comissão de Ética no Uso de Animais*  
da *Universidade Estadual de Maringá*

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Alexandre', is written over a horizontal line.

Prof. Dr. Alexandre Ribas de Paulo  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Estadual de Maringá

**ANEXO IV: Bula Insulina Degludeca (Tresiba®, Novo Nordisk®)**

**Tresiba™ FlexTouch Tresiba™ Penfill® Insulina degludeca**

**IDENTIFICAÇÃO DO MEDICAMENTO**

Tresiba™ FlexTouch 100 U/mL Tresiba™ Penfill® 100 U/mL insulina degludeca

**APRESENTAÇÕES**

Tresiba™ FlexTouch 100 U/mL - embalagem com 1, 2, 3 ou 5 sistemas de aplicação preenchidos com 3 mL de solução injetável de insulina degludeca.

Tresiba™ Penfill□ 100 U/mL - embalagem com 1, 5 ou 10 carpules com 3 mL de solução injetável de insulina degludeca.

**VIA SUBCUTÂNEA USO ADULTO****COMPOSIÇÃO**

Tresiba™ FlexTouch 100 U/mL e Tresiba™ Penfill□ 100 U/mL

1 mL de solução contém:

Insulina degludeca ..... 100 U (equivalente a 3,66 mg de insulina degludeca).

Cada sistema de aplicação preenchido ou capsula contém 3 mL equivalente a 300 unidades. O sistema de aplicação preenchido pode fornecer uma dose máxima de 80 unidades em uma única injeção com incrementos de dose de 1 unidade.

Excipientes: glicerol, metacresol, fenol, acetato de zinco, ácido clorídrico, hidróxido de sódio e água para injetáveis.

A insulina degludeca é produzida por tecnologia do DNA recombinante em *Saccharomyces cerevisiae*.

**Para mais detalhes:**

[http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila\\_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=8267472014&pIdAnexo=2228173](http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=8267472014&pIdAnexo=2228173)

**ANEXO V: Bula Insulina Regular (Humulin® R, Eli Lilly®)**

CDS05FEV15



**HUMULIN® R**  
insulina humana  
(derivada de ADN\* recombinante)  
D.C.B. 04918

**APRESENTAÇÕES**

Preparação aquosa contendo 100 unidades (U-100) de insulina humana (ADN\* recombinante) por mL. Está disponível em embalagens contendo 2 refis de vidro tipo I com 3 mL de solução, para uso em canetas compatíveis para administração de insulina.

**PREFERENCIALMENTE PARA ADMINISTRAÇÃO SUBCUTÂNEA****USO ADULTO E PEDIÁTRICO ACIMA DE 3 ANOS****COMPOSIÇÃO**

Cada mL contém:

insulina humana derivada de ADN\* recombinante.....100

unidades Excipientes: metacresol, glicerol, água para injeção q.s.p.

Hidróxido de sódio e/ou ácido clorídrico podem ter sido adicionados para ajuste de pH.

\*ADN = Ácido Desoxirribonucleico

**INDICAÇÕES**

HUMULIN R é indicado para o tratamento de pacientes com diabetes mellitus que necessitam de insulina para a manutenção da homeostase de glicose.

**Para mais detalhes:**

[http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila\\_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=7523742017&pIdAnexo=6206483](http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=7523742017&pIdAnexo=6206483)