

LUCIANA SANTOS SOUZA PAULI

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A ASSOCIAÇÃO
MKP-3/FOXO1 EM TECIDO HEPÁTICO DE CAMUNDONGOS
OBESOS E DIABÉTICOS**

**LIMEIRA
2013**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS APLICADAS

LUCIANA SANTOS SOUZA PAULI

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A ASSOCIAÇÃO
MKP-3/FOXO1 EM TECIDO HEPÁTICO DE CAMUNDONGOS
OBESOS E DIABÉTICOS**

Dissertação apresentada a
Faculdade de Ciências Aplicadas
para obtenção do Título de Mestra
em Ciências da Nutrição e do
Esporte e Metabolismo, na área de
Metabolismo e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Rochete Ropelle

**LIMEIRA,
2013**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Aplicadas
Sueli Ferreira Júlio de Oliveira - CRB 8/2380

- P283e Pauli, Luciana Santos Souza, 1979-
Efeitos do exercício físico sobre a associação MKP-3/FoxO1 em tecido hepático de camundongos obesos e diabéticos / Luciana Santos Souza Pauli. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.
- Orientador: Eduardo Rochete Ropelle.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Aplicadas.
1. Obesidade. 2. Diabetes. 3. Transtornos do metabolismo de glucose. 4. Exercício físico. I. Ropelle, Eduardo Rochete. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Aplicadas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Effects of physical exercise on the MKP-3/FoxO1 association in liver of obese and diabetic mice

Palavras-chave em inglês:

Obesity

Diabetes

Glucose Metabolism Disorders

Physical exercise

Área de concentração: Metabolismo e Biologia Molecular

Titulação: Mestra em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

Banca examinadora:

Eduardo Rochete Ropelle [Orientador]

Fúlvia de Barros Manchado Gobatto

Angélica Rossi Sartori Cintra

Data de defesa: 29-07-2013

Programa de Pós-Graduação: Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

Limeira, 29 de julho de 2013

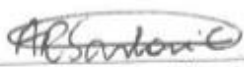
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Eduardo Rochete Ropelle



Profª. Drª. Fúlvia de Barros Machado Gobatto



Profa. Dra. Angélica Rossi Sartori Cintra

DEDICATÓRIA

Para meus pais, José Macedo de Souza e Adélia Aparecida Santos Souza. Com os ensinamentos e exemplo deles, aprendi o valor da vida e da ternura, também o significado de coragem e sabedoria, sobretudo da importância da dignidade e do caráter.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, de forma cordial, os muitos professores e pesquisadores indiretamente ou diretamente envolvidos com a pós-graduação da FCA - UNICAMP, que empregaram seu tempo e talento, contribuindo para o enriquecimento da minha formação.

Sou grata a todos os alunos de laboratório pela dedicação, entusiasmo e boa vontade em compartilhar seus conhecimentos e ajuda nos experimentos. Agradeço especialmente ao Rodolfo Marinho, Leandro Pereira de Moura, Bárbara de Almeida Rodrigues, Eloize Cristina Chiarreotto Ropelle.

Gostaria de agradecer a banca de qualificação Profas. Drs. Fúlvia de Barros Manchado Gobatto e Angélica Rossi Sartori Cintra pela revisão do trabalho, sou profundamente grata pelo tempo, comentários e sugestões construtivas para o aperfeiçoamento de todo o trabalho.

Quero também transmitir minha gratidão e respeito aos colegas de turma (1º turma de mestrado do Programa de Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo da FCA – UNICAMP) que influenciaram profundamente minha formação acadêmica e profissional.

Sou especialmente grata ao professor e orientador Eduardo Rochete Ropelle por todo auxílio, compreensão e entusiasmo na orientação prestada a este trabalho.

Quero agradecer também aos professores Dennys Esper Cintra e Claudio Teodoro de Souza pelo auxílio nos experimentos e colaboração em todo processo de execução do projeto de pesquisa.

Ao Rodrigo (meu esposo), pela paciência, carinho e aconchego nos períodos conturbados do mestrado. E ao meu filho Leônidas que nasceu durante o processo, dando a oportunidade de ser mãe, uma experiência fascinante e sublime, dádiva divina! A eles, minhas duas riquezas meus agradecimentos.

Por fim, para o desenvolvimento desse trabalho de pesquisa, foi fundamental o apoio financeiro da FAPESP (processo nº 2011/13779-0).

SUMÁRIO

	PÁG.
RESUMO	xv
ABSTRACT	xxi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Fisiologia molecular da regulação da gliconeogênese hepática.....	04
1.2. Papel da MKP-3 na resistência hepática à insulina e hiperglicemia.....	06
1.3. Exercício físico e resistência à insulina.....	08
2. OBJETIVOS	10
3. CAPÍTULO	
3.1. Artigo 1: Exercise training decreases MAPK phosphatase–3 and promotes the suppression of hepatic gluconeogenesis in obese mice.....	12
4. DISCUSSÃO	45
5. CONCLUSÃO	53
6. REFERÊNCIAS	55

ASO: Oligonucleotídeo antisense

Akt: proteína quinase B

CK2: caseína quinase 2

ERK: Quinase reguladas por sinais extracelulares

FoxO1: Membro da família forkhead Box O

G6Pase: Glicose-6-fosfatase

HNF-4 α : Factor nuclear 4 alfa de hepatocito

IR: Receptor de Insulina

IRS-1: Substrato 1 do receptor de insulina

IR β : Receptor de insulina subunidade beta

MAPK: Proteína quinase ativadora de mitose

MKP-3: MAPK fosfatase-3

mRNA: Ácido ribonucleico mensageiro

PI3K: fosfatidilinositol 3- quinase

PGC1 α : Co-ativador-1 'alfa' do receptor ativado por proliferador do peroxissoma

PEPCK: Fosfoenolpiruvato carboxiquinase

RESUMO

RESUMO

A proteína MKP-3 (MAPK phosphatase-3) possui capacidade de associar-se fisicamente e desfosforilar a FoxO1 no fígado, resultando em aumento da gliconeogênese e hiperglicemia na condição de obesidade e diabetes. Por outro lado, o exercício físico é uma das estratégias não farmacológicas mais utilizadas para a melhora do perfil glicêmico em pacientes diabéticos, no entanto, suas ações no tecido hepático são pouco conhecidas. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos do treinamento físico sobre a expressão proteica da MKP-3, bem como sua interação com a FoxO1 em fígado de animais obesos. Ademais, tem como objetivo avaliar o mecanismo pelo qual o exercício físico é capaz de inibir a proteína MKP-3 em tecido hepático. Foram utilizados camundongos Swiss machos que receberam por 16 semanas uma dieta padrão ou rica em gordura. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos: controle (C), obeso sedentário (OB), obeso exercitado (EXE), obeso tratado com oligonucleotídeo antisense MKP-3 (OB-ASO), obeso tratado com sense MKP-3 (OB-sense) e obeso submetido ao treinamento físico e ao tratamento com antisense MKP-3 concomitantemente (OB-EXE-ASO). O protocolo de treinamento físico consistiu de natação com sessões de 60 minutos, 5 vezes por semana, com carga equivalente a 5% da massa corporal total do animal. O tratamento com antisense foi realizado através de injeções duas vezes ao dia, com um volume total de 2.0 µl por dose (4.0 nmol/µl) por 5 dias. Ao final do experimento foram realizados os testes de tolerância ao piruvato (TTP) e teste de tolerância à insulina (TTI). Além disso, foram avaliados parâmetros fisiológicos (ingestão calórica, massa corporal, glicemia e insulinemia de jejum) e a análise molecular das proteínas (MKP-3, FoxO1, PGC1 α , HNF-4 α , PEPCCK, G6Pase e ERK) através das técnicas de imunoblot e imunoprecipitação. Utilizou-se a técnica de imunohistoquímica para análise da co-localização da MKP-3 no fígado dos animais. Os resultados obtidos demonstraram que o treinamento físico diminuiu expressão proteica de MKP-3 e a associação FoxO1/MKP-3 no fígado dos animais obesos. Além disso, camundongos obesos treinados apresentaram maiores níveis de FoxO1 fosforilada e diminuição da expressão das proteínas PGC-1 α e HNF-4 α no fígado se comparado aos animais obesos não submetidos ao treinamento físico. Verificam-se também menores níveis das enzimas gliconeogênicas PEPCCK e G6Pase nos animais obesos treinados se comparado aos seus pares sedentários. Estes resultados a nível molecular foram acompanhados por alterações fisiológicas incluindo aumento da sensibilidade à insulina no fígado, menor produção hepática de glicose e redução da hiperglicemia nos camundongos obesos, independentemente da redução da massa corporal total. Ademais, não foram encontrados efeitos aditivos sobre os parâmetros fisiológicos e moleculares com o tratamento de oligonucleotídeo antisense MKP-3 e treinamento físico realizado concomitantemente nos animais obesos. Por fim, os efeitos supressivos do treinamento físico sobre a proteína MKP-3 parecem estar relacionados, no mínimo em parte, a diminuição na fosforilação das ERKs no fígado de camundongos obesos.

Palavras chaves: Obesidade, diabetes, produção hepática de glicose, exercício físico e MKP-3.

ABSTRACT

ABSTRACT

The protein MKP-3 (MAPK phosphatase-3) has the ability to physically associate with and dephosphorylate the FoxO1 in the liver, resulting in increased gluconeogenesis and hyperglycemia in the condition of obesity and diabetes. On the other hand, exercise is one of the most used non-pharmacological strategies for improving glycemic control in diabetic patients; however, their actions in liver tissue are poorly explored. The objective of this study was to investigate the effects of exercise on the expression of MKP-3 and its interaction with FoxO1 in the liver of obese animals. Furthermore, aimed at evaluating the mechanism by which physical exercise is able to inhibit protein MKP-3 in the liver. We used male Swiss mice that received a standard diet or high fat for 16 weeks. The animals were randomly divided into six groups: control (C), sedentary obese (OB), obese exercised (EXE), obese treated with MKP-3 antisense oligonucleotide (ASO-OB), obese treated with sense MKP-3 (OB- sense) and obese subjected to physical training and treatment with antisense MKP-3 concomitantly (OB-EXE-ASO). The protocol consisted of swimming exercise training with sessions of 60 minutes, five times per week with a load equivalent to 5% of the total body mass of the animal. Treatment with antisense was performed by injection twice daily, with a total volume of 2.0 ul per dose (4.0 nmol / microl) for 5 days. At the end of the experiment were performed to pyruvate tolerance tests (PTT) and insulin tolerance test (ITT). Furthermore, physiological parameters were evaluated (caloric intake, body weight, blood glucose and fasting insulin) and molecular analysis of proteins (MKP-3, FoxO1, PGC1 α , HNF-4 α PEPECK, G6Pase and ERK) by immunoblotting and immunoprecipitation techniques. The immunohistochemistry technique was utilized to evaluate the co-localization of MKP-3 in the liver of the animals. The results showed that physical training decreased the protein expression of MKP-3 and association FoxO1/MKP-3. Further, trained obese mice had higher levels of phosphorylated FoxO1 and decreased PGC-1 α and HNF-4 α . There was also a decrease in the protein levels of PEPCK and G6Pase in the liver of mice exercised compared to sedentary obese mice. These results at molecular level were accompanied by physiological changes including increased insulin sensitivity in the liver, reduced hepatic glucose production and reduce hyperglycemia in obese mice, regardless of reducing total body mass. In addition, there were no additive effects of treatment with antisense oligonucleotide MKP-3 and physical training performed concurrently in obese animals. Finally, the suppressive effects of physical training on MKP-3 protein appear to be related at least in part, the decrease in phosphorylation of ERKs in the livers of obese mice.

Keywords: Obesity, diabetes, hepatic glucose production, physical exercise and MKP-3.

1- INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O diabetes *mellitus* tipo 2 (DM tipo 2) é a forma mais frequente da doença (aproximadamente 90% dos casos), com um marcante aumento em sociedades industrializadas (1). As mudanças no estilo de vida, com progressivo e acentuado consumo de alimentos hipercalóricos e inatividade física pela sociedade moderna, permite prever um prognóstico de aumento das taxas de prevalência de DM tipo 2. Este aumento exacerbado de DM tipo 2, acompanha a crescente aceleração do número de indivíduos obesos do planeta, num fenômeno chamado “diabesidade”. Aproximadamente 197 milhões de pessoas em todo o mundo apresentam intolerância à glicose (estágio pré-diabetes), O diagnóstico para o futuro próximo é de aumento, e a incidência deve ser de 420 milhões até 2025. Este aumento pronunciado da incidência de diabete atinge crianças e adolescentes, onerando ainda mais os gastos com a saúde pública (1).

Dentre as alterações marcadamente conhecidas que acompanham a resistência à insulina têm-se a produção excessiva de glicose pelo tecido hepático e a diminuição na captação desta hexose nos tecidos periféricos (músculo e tecido adiposo) levando ao estado de hiperglicemia. Sem dúvida entender os processos moleculares que provocam a resistência à insulina em tecidos como o fígado torna-se fundamental a prevenção do desenvolvimento do diabetes.

O fígado é um órgão de extrema importância para o metabolismo do organismo. Sendo que exerce papel fundamental na produção de glicose do organismo através da indução de gliconeogênese a partir de compostos aglicanos (não-carboidratos) como lactato, glicerol, aminoácidos (alanina) durante o jejum prolongado (2). Nesse processo, a insulina é considerada o hormônio mais importante para a supressão da síntese de nova glicose. No estado alimentado (pós-prandial), por exemplo, o nível de insulina aumenta e reprime a gliconeogênese hepática pela inibição da transcrição de genes gliconeogênicos (3). Este efeito da insulina é dependente das proteínas fosfatidilinositol-3-quinase (PI3q) e da serina treonina quinase Akt (também conhecida com proteína B) (4-6). A proteína Akt tem sido considerada uma mediadora relevante na supressão da expressão gênica da fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) e da glicose-6-

fosfatase (G6Pase) em resposta ao sinal molecular da insulina (5, 6). Isto revela que a ausência ou ineficácia na ação deste hormônio provoca no fígado distúrbios na produção de glicose.

Em resposta a sinalização da insulina a proteína Akt será ativada, provocando dentre os efeitos biológicos a fosforilação em serina do resíduo 256 da FoxO1 (*Forkhead box-containing gene, O subfamily*). Esta fosforilação leva a extrusão nuclear da Foxo1 e inativação (7, 8). Reconhecidamente, FoxO1 atua como fator de transcrição em diversos tipos celulares. Especificamente no fígado, a FoxO1 se liga aos genes promotores de PECK e G6Pase aumentando a transcrição gênica destas enzimas. Estas duas enzimas são responsáveis pelo controle da primeira e última etapa da síntese de glicose no fígado, respectivamente. Assim sendo, a inativação (aumento da fosforilação) da FoxO1 é a principal rota pela qual a insulina reprime a gliconeogênese hepática. No entanto, os mecanismos moleculares responsáveis pelo controle da FoxO1 em hepatócitos permanecem ainda não totalmente elucidados.

A FoxO1 é responsável pelo aumento da transcrição da proteína PGC1 α (PPAR γ coativador 1 α), que codifica um importante amplificador para gliconeogênese hepática (8). Por sua vez, a PGC1 α ativa a expressão de genes gliconeogênicos através da interação direta com FoxO1 e HNF4 α (*Hepatocyte Nuclear Factor 4*) (8, 9). A interrupção da interação entre PGC1 α e FoxO1 pela insulina reprime a gliconeogênese mediada pela PGC1 α (8). Desse modo, FoxO1 pode ser considerada uma proteína distal chave na via molecular da insulina durante a síntese de nova glicose pelo fígado. Contrariamente, a desfosforilação da FoxO1 e sua ativação nuclear induz hiperglicemia.

A luz desses achados, pesquisadores identificaram que a proteína MKP-3 (MAPK fosfatase-3) exerce efeito antagônico ao da insulina na supressão da transcrição da enzima PECK em cultura de células hepáticas (10). E mais recentemente, foi demonstrado que a MKP-3 regula o processo de gliconeogênese através do seu efeito sobre a FoxO1 (11). A MKP-3 possui capacidade de se associar fisicamente e desfosforilar a FoxO1, aumentando assim sua translocação para o núcleo celular e sua capacidade transcricional para genes envolvidos na gliconeogênese (11). Esse mecanismo de resistência à insulina revela novas possibilidades terapêuticas e de

entendimento da desregulação do metabolismo de glicose na condição de resistência à insulina.

A MKP-3 tem função específica de inativar proteínas da família da MAPK denominadas ERKs (quinases regulada por sinais extracelulares), sendo que esta interação entre as proteínas se dá fisicamente (12, 13). No entanto, a interação entre ERKs e MKP-3 é recíproca e por sua vez, ERK causa a ativação da MKP-3. Tal consideração é reforçada por estudo prévio que mostrou que na presença de ERK2 a atividade da MKP-3 intracelular foi 40 vezes maior (12, 13). Além do mais, é observado um aumento na expressão de ERKs e MKP-3 no estado de obesidade e inflamação que é acompanhado por resistência à insulina e consequente aumento na gliconeogênese (11).

Por outro lado, é reconhecida que a prática de exercício físico é capaz de melhorar a ação da insulina com efeitos observados sobre proteínas importantes a via de sinalização da insulina como a PI3-q e a Akt (14-16). Estudos prévios realizados em nosso laboratório e por outros pesquisadores demonstraram uma melhora na cascata de sinalização da insulina e menor produção hepática de glicose em resposta ao exercício físico (14-17). Entretanto, a respeito dos efeitos do exercício físico sobre a expressão da MKP-3 no fígado e regulação do metabolismo da glicose permanece sem ser elucidado, indicando a necessidade de mais estudos sobre o assunto.

FISIOLOGIA MOLECULAR DA REGULAÇÃO DA GLICONEOGÊNESE HEPÁTICA

A Akt é uma serina treonina quinase que possui três isoformas (Akt1, Akt2 e Akt3) expressas em diferentes tecidos periféricos (fígado, músculo, adiposo, entre outros) (18-20). Animais deficientes de Akt (nocaute da Akt) demonstraram características de diabetes severa, tais como hipertrofia das células beta, aumento na produção hepática de glicose, diminuída homeostase da glicose e exacerbada hiperglicemia (20, 21).

As proteínas FoxO são substratos da Akt *in vivo*. Este fator de transcrição é fosforilado pela Akt em dois resíduos de serina (Ser256 e Ser319) e um resíduo de

treonina (Thr24). A fosforilação desses três sítios da FoxO resulta em sua extrusão nuclear e sua conseqüente inativação (22-24). Técnicas como o Gel *Shift* mostrou que a FoxO1 se liga a sequência responsiva à insulina no promotor da G6Pase e da PECK (25) e a superexpressão da FoxO1 marcadamente aumenta a expressão endógena da G6Pase no fígado. Além disso, em camundongos nocautes, observou-se que a FoxO1 controla a homeostase da glicose e a gliconeogênese hepática através da via da insulina (25).

Outro componente transcricional, que possui papel relevante na gliconeogênese é a proteína PGC-1 α (8). Ela é ativada fisiologicamente no fígado durante o estado de jejum, pela ação do glucagon e glicocorticóides. É encontrada em níveis elevados em diversos modelos experimentais de diabetes ou de deficiência na sinalização da insulina (8).

Sabe-se que a expressão de PGC-1 α em níveis fisiológicos é quem inicia todo o programa gliconeogênico, por interagir com a Foxo1 e aumentar sua ação transcricional, promovendo maior expressão das enzimas gliconeogênicas PECK e G6Pase (8). Entretanto, na presença de insulina, a ativação da Akt regula a ação transcricional da PGC-1 α . Após a ativação, a Akt promove a fosforilação da Foxo1, provocando sua extrusão nuclear, e interrompe a interação Foxo1/PGC-1 α . Inativando esta interação, a Akt diminui a produção hepática de glicose, reduzindo a gliconeogênese, pois sozinha, a PGC-1 α não consegue ativar os genes promotores da expressão das enzimas PECK e G6Pase (8). Níveis reduzidos de PGC-1 α podem também reduzir a expressão de HNF4 α e a transcrição de PECK e G6Pase. Sabidamente, HNF4 α é outro componente nuclear com participação importante na gliconeogênese.

Estudos revelam que este fator de transcrição tem papel importante tanto na gliconeogênese quanto na glicólise em condição de jejum e alimentado (26). Na ausência de insulina, FoxO1 está localizado no núcleo, simultaneamente, FoxO1 e HNF4 α sinergicamente ativam o gene promotor da G6Pase, presumidamente via PGC-1 α , favorecendo a gliconeogênese. Opostamente, em resposta ao sinal da insulina, FoxO1 é fosforilada e excluída do núcleo, resultando na dissociação do HNF4 α . Em

resposta a esta dissociação HNF4 α , pode então, ativar o gene promotor da glicoquinase (GK) (26). Rhee e colaboradores demonstraram que a presença de HNF-4 α é absolutamente requerida pelo PGC-1 α para indução da expressão dos genes da PEPCK e G6pase (27). Desse modo, proteínas de efeito inibitório sobre a via de sinalização Akt/FoxO1 no fígado podem provocar aumento significativo na produção de nova glicose e a hiperglicemia.

PAPEL DA MKP-3 NA RESISTÊNCIA HEPÁTICA À INSULINA E HIPERGLICEMIA

A proteína MKP-3 exerce papel relevante na gênese da hiperglicemia através de sua ação negativa sobre a FoxO1 e aumento na gliconeogênese hepática (11). A FoxO1 é capaz de aumentar a transcrição da proteína PGC1 α , a qual robustamente ativa a expressão de genes gliconeogênicos (PEPCK e G6Pase) através de uma interação direta com a FoxO1 e HNF4 α (27, 28). A interrupção da interação entre PGC1 α e FoxO1 pela insulina suprime a gliconeogênese mediada por PGC1 α (28). Em contrapartida, a MKP-3 tem efeito antagônico à insulina em suprimir a transcrição de PEPCK. Wu e colaboradores verificaram que animais obesos induzidos por dieta rica em gordura tiveram aumento significativo nos níveis proteicos de MKP-3 e de glicose sanguínea, sugerindo uma relação entre a expressão de MKP-3 e desregulação no metabolismo glicídico (11).

No estado de jejum, a superexpressão de MKP-3 em animais magros aumentou consideravelmente os níveis de glicose e insulina sanguínea e induziu aumento da expressão de G6Pase (11). Na mesma direção, a superexpressão de MKP-3 em cultura de células hepáticas também induziu aumento na expressão de genes gliconeogênicos e elevação da produção hepática de glicose (11). Tais resultados são indicativos de que a elevação da MKP-3 pode contribuir para a gênese da resistência à insulina e hiperglicemia.

Corroborando com esses achados, foi observado em modelos animais de obesidade tanto induzidos por dieta rica em gordura ou geneticamente modificados (*ob/ob*), que o nocaute da proteína MKP-3 resulta em diminuição significativa nos níveis

de glicose no sangue tanto na condição de jejum quanto pós-prandial (11). Ademais, os níveis de insulina e de expressão da PEPCK também foram menores nos animais nocautes para MKP-3 (11).

Portanto, a gliconeogênese promovida pela MKP-3 na condição de obesidade e resistência à insulina é mediada no mínimo em parte pela sua atividade fosfatase conduzindo a desfosforilação em Ser 256 da FoxO1. A diminuição da fosforilação de FoxO1 e da sua interação com PGC1 α pela MKP-3 acaba inibindo a ação da insulina em fosforilar e provocar a extrusão da FoxO1 do núcleo (Figura 1). Como consequência, observa-se no estado de obesidade e resistência à insulina um aumento das enzimas chaves da gliconeogênese e da produção hepática de glicose. Drasticamente, a manutenção deste estado de resistência à insulina pode favorecer o desenvolvimento de DM tipo 2 em longo prazo.

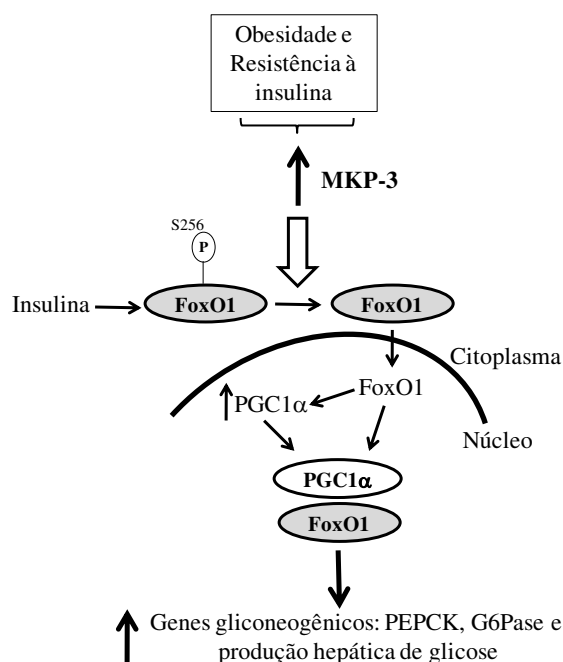


Figura 1. Modelo ilustrativo da ação negativa da MKP-3 em induzir gliconeogênese. O aumento na expressão da MKP-3 na condição de obesidade e resistência à insulina diminui a fosforilação da FoxO1 em serina 256, que subsequentemente promove a translocação da FoxO1 do espaço citoplasmático para o núcleo. FoxO1 ativa no núcleo aumenta a transcrição de PGC1 α e também a interação com PGC1 α para iniciar o programa de gliconeogênese hepática.

EXERCÍCIO FÍSICO E RESISTÊNCIA À INSULINA

A atividade física é considerada uma importante opção de tratamento não farmacológico da obesidade, resistência à insulina e distúrbios metabólicos associados, como hipertensão, dislipidemias, hiperglicemia, e outros, com melhoras que podem ocorrer independente da redução de peso ou composição corporal (15, 16, 29)

O mecanismo molecular pelo qual o exercício aumenta a captação de glicose e reduz a hiperglicemia mediada pela insulina pode ser parcialmente explicado pelo aumento da expressão e atividade de proteínas chaves na regulação do metabolismo da glicose no músculo esquelético e fígado (15, 16, 29). Além disso, o exercício físico parece atenuar a atividade de proteínas inflamatórias com efeito negativo na via de sinalização da insulina (15, 16, 29, 30). A melhora da sensibilidade à insulina promovida pelo exercício físico pode ser alcançada tanto por exercícios aeróbios quanto por aqueles de predominância anaeróbia e resultados favoráveis tem sido encontrado tanto após uma única sessão como também após um programa de treinamento, demonstrando que existe tanto um efeito agudo quanto crônico da atividade física sobre a sensibilidade à insulina (15, 16, 29-31). No entanto, não existe um consenso ainda se os efeitos do treinamento físico sobre a sensibilidade à insulina são decorrentes da última sessão e desaparecem rapidamente, levantando a hipótese de que este efeito é meramente agudo (32).

Tais considerações sugerem a necessidade de mais estudos direcionados em investigar os efeitos pós-exercício físico dentro de programas de treinamento. Além disso, a grande maioria dos estudos investigou os efeitos do exercício físico em tecido muscular esquelético e pouco se sabe sobre as ações moleculares do treinamento físico sobre a resistência à insulina hepática. E como visto previamente, o fígado exerce papel chave no metabolismo da glicose, sendo a insulina o hormônio chave no processo de gliconeogênese.

De acordo com a literatura científica, parece que a relação entre a via de sinalização da insulina e o controle das principais enzimas gliconeogênicas tem seu elo na Akt e no fator de transcrição FoxO1 (11, 15, 33). Poucos estudos avaliaram o efeito do exercício físico sobre esta importante via de controle da produção hepática de

glicose. Recentemente, descrevemos que agudamente, o exercício físico é capaz de reduzir significativamente a interação FoxO1/PGC-1 α no fígado de ratos obesos, em paralelo, observamos aumento da fosforilação da FoxO1 estimulada por insulina (34), indicando que o exercício modula a atividade da FoxO1 neste tecido, contudo, o mecanismo molecular para este fenômeno, permanece desconhecido. Nesse contexto, é possível que o exercício físico tenha papel relevante sobre a expressão da MKP-3, marcadamente alterada na condição de inflamação e obesidade induzida por dieta rica em gordura, com possível repercussão no controle da produção hepática de glicose. Tais resultados, se confirmados proverão o entendimento de novos mecanismos moleculares acerca dos benefícios da prática de atividade física regular para indivíduos obesos e diabéticos tipo 2.

2- OBJETIVOS

OBJETIVOS

GERAL

Estudar os efeitos do treinamento físico sobre a expressão da proteína MKP-3, bem como sua associação com o fator de transcrição FoxO1 em tecido hepático de camundongos obesos e diabéticos.

ESPECÍFICOS

O trabalho teve como objetivos específicos avaliar os efeitos do treinamento físico em animais obesos sobre os seguintes parâmetros:

- a) Massa corporal, ingestão alimentar, glicemia, insulinemia, sensibilidade à insulina e tolerância ao piruvato.
- b) Expressão e fosforilação da proteína FoxO1 no fígado.
- c) Expressão da proteína MKP-3 no fígado.
- d) Expressão das proteínas PGC1 α e HNF4 α no fígado.
- e) A associação das proteínas FoxO1/MKP-3 no fígado.
- f) A expressão das proteínas PEPCK e G6Pase no fígado.
- g) A expressão e fosforilação da proteína ERK no fígado

Physical exercise decreases MAPK phosphatase-3 expression and suppresses hepatic gluconeogenesis in obese mice

Luciana Santos Souza Pauli¹, Eloize Cristina Chiarreotto Ropelle¹, Claudio Teodoro de Souza², Dennys Esper Cintra¹, Adelino Sanchez Ramos da Silva⁴, Bárbara de Almeida Rodrigues¹, Leandro Pereira de Moura⁵, Rodolfo Marinho⁵, Vanessa de Oliveira¹, Carlos Kiyoshi Katashima³, José Rodrigo Pauli¹, Eduardo Rochete Ropelle¹

1. School of Applied Science, University of Campinas (UNICAMP), Limeira, São Paulo, Brazil.
2. Laboratory of Exercise Biochemistry and Physiology, Health Science Unit, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brazil
3. Faculty of Medical Science (FCM), Campinas, São Paulo, Brazil.
4. University of São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil.
5. São Paulo University State (UNESP), Rio Claro, SP, Brazil.

Short Title: Exercise reduces MKP-3 and hepatic gluconeogenesis

Key words: exercise, obesity, phosphatase, gluconeogenesis, insulin signaling

Please address correspondence to:

Eduardo Rochete Ropelle.

School of Applied Science.

University of Campinas (UNICAMP), Limeira, São Paulo, Brazil.

Phone: + 55 19 37016706 –

Email: eduardoropelle@gmail.com

ABSTRACT

Insulin plays an important role in the control of hepatic glucose production. Insulin resistant states are commonly associated with excessive hepatic glucose production, which contributes to both fasting hyperglycemia and exaggerated postprandial hyperglycemia. In this regard, increased activity of phosphatases may contribute to the dysregulation of gluconeogenesis. MKP-3 (mitogen-activated protein phosphatase-3) is a key protein involved in the control of gluconeogenesis. MKP-3-mediated dephosphorylation activates FoxO1 (a member of forkhead family of transcription factors) and subsequently promotes its nuclear translocation and binding to the promoters of gluconeogenic genes such as phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) and glucose-6-phosphatase (G6Pase). In this study, we investigated the effects of exercise on the expression of MKP-3 and its interaction with FoxO1 in the livers of obese animals. We found that physical exercise decreased the expression of MKP-3 and FoxO1/MKP-3 association in the liver. Further, exercised obese mice had lower levels of FoxO1 in the nucleus and decreased levels of gluconeogenic enzymes (PEPCK and G6Pase). We also observed reduced levels of PGC-1 α and HNF4 α in the livers of exercised mice when compared to non-exercised obese mice. These molecular results were accompanied by physiological changes, including increased insulin sensitivity in the liver, reduced hepatic glucose production and reduced hyperglycemia, which were not caused by reductions in total body mass. In addition, there were no additive effects of an antisense oligonucleotide targeting MKP-3 and physical exercise performed concomitantly. Finally, the suppressive effects of exercise on MKP-3 protein levels appear to be related, at least in part, to reduced phosphorylation of ERK in the livers of obese mice.

INTRODUCTION

The liver is a key organ in the maintenance of systemic glucose homeostasis in mammals. The liver can produce glucose by breaking down glycogen (glycogenolysis) and by de novo synthesis of glucose from noncarbohydrate precursors such as pyruvate, glycerol, lactate and alanine (gluconeogenesis) (*Pilkis & Granner 1992*). The rate of gluconeogenesis is controlled principally by the activities of certain unidirectional enzymes, such as phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), fructose-1,6-bisphosphatase (F1,6BP) and glucose-6-phosphatase (G6Pase) (*Liao et al, 1998; Schmoll et al, 2000*). The genes encoding these proteins are powerfully controlled at the transcriptional level by key hormones, particularly insulin, glucagon, epinephrine and glucocorticoids. In the fed state, the hormone insulin is considered to be the most important factor regulating the suppression of gluconeogenesis and hepatic glucose production (*Sutherland et al, 1995; Schmoll et al, 2000; Vidal-Puig & O'Rahilly 2001*).

The molecular action of insulin is initiated upon ligand binding to the insulin receptor, which autophosphorylates and activates phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), mediating the activation of Akt (*Sutherland et al, 1995; Liao et al, 1998; Schmoll et al, 2000*). Upon activation, Akt phosphorylates a member of the forkhead transcription factor family (FoxO1), which is expressed abundantly in the liver and acts as a major target for insulin signaling (*Sutherland et al, 1995; Liao et al, 1998; Schmoll et al, 2000; Vidal-Puig & O'Rahilly 2001*). FoxO1 acts as a transcription factor in various cell types. In the liver, FoxO1 binds to the promoters of the PEPCK and G6Pase genes and increases the transcription of these enzymes (*Puigserver et al, 2003a*).

FoxO1 is known to increase the transcription of PPAR γ coactivator-1 α (PGC-1 α), which encodes an important amplifier for hepatic gluconeogenesis (*Puigserver et al, 2003a*). Indeed, PGC-1 can powerfully stimulate the expression of key genes in the gluconeogenic pathway in the liver. This strongly suggests that regulation of the transcriptional coactivator PGC-1 is of central importance in the control of gluconeogenesis by insulin and other hormones. PGC-1 α robustly activates gluconeogenic gene expression through direct interactions with FoxO1 and hepatocyte nuclear factor 4 α (HNF4 α) (*Puigserver et al, 2003a; Rhee et al, 2003*). Disruption of the interaction between PGC-1 α and FoxO1 by insulin represses PGC-1 α -mediated gluconeogenesis

(Daitoku *et al*, 2003). Previous studies also indicate that HNF4 α and FoxO1, which are transcription factors that regulate gluconeogenic gene expression (Puigserver & Spiegelman 2003b; Rhee *et al*, 2003), are both critical targets of PGC-1 α coactivation.

This finely tuned metabolic process can be regulated by phosphatases. In particular, MKP-3 (mitogen-activated protein phosphatase-3) appears to be key for the proper control of gluconeogenesis. The expression of MKP-3 is markedly elevated in the livers of obese mice, and knocking down MKP-3 expression in the livers of either lean or obese mice decreases fasting blood glucose levels (Wu *et al*, 2010). MKP-3's ability to promote hepatic glucose output is mediated at least partially through its ability to physically associate with and dephosphorylate FoxO1. MKP-3-mediated dephosphorylation activates FoxO1 and subsequently promotes its nuclear translocation and binding to the promoters of gluconeogenic genes, such as PEPCK and G6Pase (Wu *et al*, 2010). These results demonstrate that MKP-3 is an important regulator of hepatic gluconeogenesis and may contribute to the inappropriate activation of gluconeogenesis that occurs in type 2 diabetes.

MKP-3 is a cytoplasmic phosphatase that is highly specific for dephosphorylation of ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinases) and plays a critical role in attenuating ERK1/2-mediated mitogenesis (Camps *et al*, 1998; Fjeld *et al*, 2000; Feng *et al*, 2012). MKP-3-deficient mice display enhanced basal ERK1/2 phosphorylation and increased myocyte proliferation (Maillet *et al*, 2008). Interestingly, the MEK/ERK pathway itself also plays a role in down regulating MKP-3 expression, forming a negative feedback loop between the kinases and the phosphatase (Marchetti *et al*, 2005; Jurek *et al*, 2009).

Regular exercise is known to improve insulin's actions and has significant effects on insulin signaling pathways and hepatic glucose production (De Souza *et al*, 2010; da Luz *et al*, 2011; Marinho *et al*, 2012). However, the effects of exercise on the expression of MKP-3 and its regulation of glucose metabolism remain unknown. Thus, the aim of this study was to investigate the effects of physical exercise on the expression of MKP-3 protein as well as its association with the transcription factor FoxO1 in the livers of obese mice. In addition, we investigated the effect of exercise on the phosphorylation of ERK in the livers of obese mice.

MATERIALS AND METHODS

Experimental animals

The experimental procedures involving mice were performed in accordance the principles and procedures described by the National Institutes of Health Guidelines for the Care and Use of Experimental Animals and were approved by the University of Campinas Ethical Committee (ID 2011/2599-1). Male Swiss mice (15–20 g) from the University of Campinas Breeding Center were used. The mice were always housed in individual cages and subjected to a standard light–dark cycle (6:00 a.m.–6:00 p.m./6:00 p.m.–6:00 a.m.), and the room temperature was maintained at stable levels ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$). After random selection, animals were fed a standard rodent chow (3.948 kcal.kg⁻¹) or a high-fat diet (HFD) (5.358 kcal.kg⁻¹) *ad libitum* for 16 weeks. The composition of the high-fat diet has been previously described (Pauli *et al*, 2008).

First, after the induction of obesity, the effectiveness of an antisense oligonucleotide targeting MKP-3 was assessed (Figure 1B); the animals were then divided into six experimental groups: mice fed standard rodent chow (Lean), high fat diet-induced obesity mice (DIO), DIO mice treated with the MKP-3 antisense oligonucleotide (DIO-ASO), DIO mice treated with the MKP-3 sense oligonucleotide (DIO-sense), DIO mice subjected to physical exercise (DIO-EXE) and DIO mice subjected to physical exercise and treated with the MKP-3 antisense oligonucleotide concomitantly (DIO-EXE-ASO). Data obtained from DIO-sense mice (treated with a sense oligonucleotide control) were excluded from the results because they did not show appreciable differences from DIO mice.

The antisense oligonucleotide treatment

The sense and antisense (ASO) phosphorthioate oligonucleotides specific for MKP-3 (sense, 5'-TCA GGA GCT GGA TGG C-3' and antisense, 5'-ATG ATG TTC GTG GTG TAA AGT T-3') were selected from three unrelated pairs of oligonucleotides on the basis of their ability to block MKP-3 protein expression, as evaluated by immunoblotting total protein extracts of liver using specific anti-MKP-3 antibodies (as shown in Figure 3B). The antisense

oligonucleotide sequences were submitted to BLAST analyses (www.ncbi.nlm.nih.gov) and were found to match only the mouse MKP-3 coding sequence. DIO and/or EXE were housed in individual cages and treated with the sense oligonucleotide (MKP-3-Sense) or the MKP-3 antisense oligonucleotide (MKP-3-ASO). The sense and antisense MKP-3 oligonucleotides were diluted in TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA), and treatment was achieved by twice daily (08:00 h/18:00 h) i.p. injections, with 2.0 μ L/dose (1.0 nM/ μ L), for 5 d (see Figure 1). The sense and antisense phosphorothioate oligonucleotides specific for MKP-3 were produced by Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA). In some experiments, to evaluate the efficiency of the oligonucleotides, different doses were employed, as described in the results section (dose-response experiment – figure 3B). In the experiment involving the DIO-EXE-ASO mice, the treatment with antisense oligonucleotide MKP-3 was performed simultaneously with the last five sessions of exercise (see figure 1).

*** Figure 1 ***

Physical exercise protocol

Mice were adapted to swimming for 10 min each day for 3 d to reduce water-induced stress. The exercise sessions were performed during the light cycle and consisted of 60-min swimming sessions, 5 days/week for 8 weeks (8-16 weeks of the experiment), in an apparatus adapted for mice (60 cm-depth x 45 cm-diameter cylindrical tank) containing warm water (31–32°C). The volume of exercise was gradually increased until the mice swam for 60 min wearing caudal dumbbells weighing 5% of their body weight, which was achieved after the eighth day of exercise (see figure 2). This exercise protocol was used previously in other studies in our laboratory (*Oliveira et al, 2011; Marinho et al, 2012*). The experimental analyses were performed 36 hours after the last exercise session.

*** Figure 2 ***

Determination of cumulative energy intake

The food intake of the animals (Lean, DIO, DIO-EXE, DIO-ASO and DIO-EXE-ASO) was evaluated every week. Thereafter, standard chow or HFD was given, and food intake was determined by measuring the difference between the weight of chow given and the weight of the chow at the end of a 24-h period. The cumulative energy intake over the 8 weeks of the experimental period was determined and expressed in kcal.

Insulin tolerance test (ITT) and pyruvate tolerance test (PTT)

Thirty-six hours after the last session exercise, the mice were submitted to an insulin tolerance test (ITT; 1.5 U/kg body weight of insulin). Before testing, all animals were fasted for 6 hours. Briefly, 1.5 IU/kg of human recombinant insulin (Humulin R) from Eli Lilly (Indianapolis, IN) was injected intraperitoneally (i.p.), and blood samples were collected at 0, 5, 10, 15, 20, 25, and 30 min from the tail for blood glucose determination using a glucose meter (Advantage, Boehringer Mannheim, Germany). The rate constant for blood glucose disappearance (kITT) was calculated using the formula $0.693/\text{biological half-life (t}_{1/2})$. The blood glucose $t_{1/2}$ was calculated from the slope of the last square analysis of the plasma glucose concentration during the linear phase of decline (Bonora *et al.* 1989).

The pyruvate tolerance test (PTT) was performed to estimate gluconeogenesis as follows. Mice were starved for 16 h and then injected i.p. with pyruvate (2 g/kg) dissolved in saline. Blood glucose levels were determined in the tail blood every 30 min for 2 h using a glucose meter (Advantage, Boehringer Mannheim, Germany).

Fasting glucose and serum insulin quantification

The blood glucose level was determined by a colorimetric method using a glucose meter (Advantage, Boehringer Mannheim, Germany). The zero time values in the insulin tolerance test were used as the fasting glucose values. Blood was collected from the cava vein. Plasma was separated by centrifugation (1,100 g) for 15 min at 4°C and stored at -80°C until assay. A

radioimmunoassay (RIA) was employed to measure serum insulin, as previously described (*Scott et al. 1981*).

Protein analysis by immunoprecipitation and immunoblotting

Prior to molecular analysis experiments, the animals were fasted for 6 hours. For liver collection, the abdominal cavity was opened, the portal vein was exposed, and 0.2 mL of normal saline with or without insulin (10^{-6} mol/L) was injected. After the insulin injection, hepatic tissue fragments were extracted and homogenized immediately in extraction buffer (1% Triton-X 100, 100 mM Tris, pH 7.4, containing 100 mM sodium pyrophosphate, 100 mM sodium fluoride, 10 mM EDTA, 10 mM sodium vanadate, 2 mM PMSF and 0.1 mg of aprotinin/mL) at 4°C with a Polytron (MR 2100, Kinematica, Switzerland). The extracts were centrifuged at 11,000 rpm at 4°C (5804R, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) for 40 min to remove insoluble material, and the supernatants were used for protein quantification, according to the Bradford method (*Bradford, 1976*). Equal amounts of protein were used for immunoprecipitation.

The immunocomplex was precipitated with protein A-Sepharose 6 MB (Pharmacia; Uppsala, Sweden) and then washed three times with 50 mM Tris (pH 7.4) containing 2 mM sodium vanadate and 0.1% Triton X-100. After this procedure, proteins were denatured by boiling in Laemmli sample buffer containing 100 mM DTT, run on SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted with specific antibodies.

Antibodies used for immunoblotting and immunoprecipitation were anti-PEPCK (P-16) (sc-28477, goat polyclonal), anti-G6pase (G-20) (sc-33839, goat polyclonal), anti-PGC-1 α (H-300) (sc-13067, rabbit polyclonal), anti-HNF-4 α (C-19) (sc-6556, goat polyclonal), anti-MKP-3 (F-12) (sc-377070, mouse monoclonal), anti-phospho-ERK1/2 (sc-16982, goat polyclonal), anti- β -actin (N-21) (sc-130656, rabbit polyclonal) (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA), anti-phospho-Foxo1 (Ser256) (#9461, rabbit polyclonal) and anti-Foxo1 (#2880, rabbit monoclonal) (Cell Signaling Technology, MA, USA). Chemiluminescence detection was performed with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Visualization of protein bands was performed by exposure of membranes to

RX-films. The original membrane was stripped and reblotted with β -actin as a loading control. Band intensities were quantified by optical densitometry (Scion Image software, Scion Corp, Frederick, MD).

Nuclear extraction

To characterize the expression and subcellular localization of FoxO1, a subcellular fractionation protocol was employed, as described previously (*Prada et al, 2006*). Liver fragments from mice of all groups (except DIO-sense) were minced and homogenized in 2 volumes of STE buffer (0.32 M sucrose, 20 mM Tris-HCL (pH 7.4), 2 mM EDTA, 1 mM DTT, 100 mM sodium orthovanadate, 1 mM PMSF and 0.1 mg aprotinin mL⁻¹) at 4°C with a Polytron homogenizer. The homogenates were centrifuged (1000 g, 25 min, 4°C) and suspended in Triton buffer (1% Triton X-100, 20 mM Tris-HCL (pH 7.4), 150 mM NaCl, 200 mM EDTA, 10 mM sodium orthovanadate, 1 mM PMSF, 100 mM NaF, 100 mM sodium pyrophosphate and 0.1 mg aprotinin mL⁻¹), kept on ice for 30 min, and centrifuged (15,000 g, 30 min, 4°C) to obtain the nuclear fraction. The samples (1 mg) were used for immunoprecipitation with FoxO1 anti-body and Protein A-Sepharose 6MB (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). After the addition of Laemmli buffer with 100 mM DTT, samples were heated in a boiling water bath for 5 min, and aliquots (100 μ g of protein) were subjected to SDS-PAGE and Western blotting with anti-IRS-2; alternatively, anti-histone antibodies were used to demonstrate the efficiency of the method.

Immunohistochemistry

Livers obtained from six mice were examined to determine the expression and tissue distribution of the MKP-3 protein. Hydrated 4- μ m sections of paraformaldehyde-fixed, paraffin-embedded tissue were transferred and coated with poly-L-lysine and fixed in methanol for 10 min. The sections were washed twice in 0.01 M phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4 and incubated in PBS with 1% bovine serum albumin (BSA, w/v) for 30 min to block nonspecific background. Upon BSA removal, the sections were treated with primary antibody anti MKP-3 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) at a 1:100 dilution in PBS/BSA overnight at

4°C. After washing in PBS, slides were covered with a 1:200 dilution of FITC-conjugated secondary donkey anti-rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) in PBS for 120 min. The sections were subsequently washed in PBS and incubated for 10 min with DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, Calif., USA), prepared according to the manufacturer's instructions. Analysis and documentation of results were performed using a Leica FW 4500 B microscope.

Statistical analysis

All numeric results are expressed as the means $\pm$ SEM of the indicated number of experiments. The results of blots are presented as direct comparisons of bands (according to the area and intensity) in autoradiographs and were quantified by optical densitometry. Statistical analysis was performed using the ANOVA test with the Bonferroni posttest. Significance was established at the $p < 0.05$ level.

RESULTS

Changes in the protein levels of MKP-3 in response to varying doses of an antisense oligonucleotide

MKP-3 levels in the livers of obese mice (DIO) were significantly increased (Figure 3A) when compared with lean mice. Treatment of DIO mice for 5 days with an antisense oligonucleotide to MKP-3 produced a dose-dependent inhibition of MKP-3 expression in liver (Figure 3B). Based on the dose-response experiment, we selected a twice daily dose of 2.0 nM for use in the remainder of the experiments. This dose induced a reduction of $91 \pm 4\%$ in MKP-3 expression after five days.

*** Figure 3 ***

Effects of physical exercise on physiological parameters

In our analysis of physiological parameters, we observed that the DIO group showed higher cumulative energy intake in eight weeks, total body mass, epididymal fat, fasting glucose and fasting insulin levels as compared to the lean group (Figure 4A-E, respectively). The exercised mice showed a slight reduction in total body weight and epididymal fat mass, but there was no significant difference when they were compared with the DIO mice (Figure 4B and C, respectively). However, when compared with DIO mice, exercised mice (DIO-EXE) had lower blood glucose levels (Figure 4D) and fasting insulin (Figure 4E). Food intake was observed to increase in exercised animals at the beginning of the physical exercise protocol (first three weeks); after this period, food intake was normalized (data not shown). However, in the analysis of cumulative food intake in eight weeks, the DIO-EXE group was found to consume similar amounts of energy compared to the DIO group (Figure 4A).

We next examined glucose reduction during an ITT. The DIO mice presented smaller glucose reductions compared to the lean mice, as expected (Fig. 4F). However, swimming exercise partially restored the insulin sensitivity; their insulin sensitivity values were higher than those of the DIO mice and lower than those of lean mice. The group treated with the antisense oligonucleotide to MKP-3 (DIO-ASO) had physiological parameters similar to those found in the exercised group (Figure 4A-F).

Additionally, we evaluated the combined effect of exercise with MKP-3 antisense oligonucleotide treatment on these physiological parameters. There were no additive effects of physical exercise and concomitant treatment with the MKP-3 antisense oligonucleotide (DIO-EXE-ASO) in mice (Figure 4A-F).

*** Figure 4 ***

Exercise reduces MKP-3 protein levels and disrupts the association between MKP-3 and FoxO1

Thirty-six hours after the last session of physical exercise, the MKP-3 protein levels and the association between the MKP-3 and FoxO1 proteins were assessed. MKP-3 protein levels in the livers of exercised mice (DIO-EXE) were significantly decreased when compared with those in the DIO mice. Treatment of DIO mice with an antisense oligonucleotide to MKP-3 produced a decrease in MKP-3 protein levels similar to that seen in lean animals (Figure 5A).

Increases in the association of FoxO1 and MKP-3 were found in DIO mice compared with the lean group (Figure 5B). Interestingly, exercise decreased the association between the FoxO1 and MKP-3 proteins. Treatment with the antisense oligonucleotide targeting MKP-3 (DIO-ASO) significantly reduced the association of FoxO1 with MKP-3 compared with that observed in the DIO mice, with values similar to those in the lean group (Figure 5B, upper panel). The FoxO1 protein levels did not differ between groups (Figure 5B, lower panel).

In addition, the mice were injected (i.v.) with insulin, and liver tissue samples were taken to estimate FoxO1 phosphorylation and nuclear FoxO1 content (Figure 5C-D, respectively). Phosphorylation of FoxO1 induced by insulin was reduced in the livers of obese mice (DIO) compared to the lean group (Lean). Swimming exercise significantly increased pFoxO1 in the liver compared to that in DIO mice. Treatment with antisense oligonucleotide targeting MKP-3 increased insulin-induced phosphorylation of Foxo1 to levels similar to those seen in the lean mice (Figure 5C, upper panel). The protein levels of Foxo1 showed no difference between the groups (Figure 5C, lower panel).

The results for FoxO1 protein levels in the nucleus of the liver cells are presented in Figure 5D. DIO mice had a higher amount of insulin-induced FoxO1 nuclear translocation than lean mice. Exercise partially reversed this effect. In response to treatment with the antisense oligonucleotide to MKP-3 (DIO-ASO), there was a significant reduction in the nuclear content of insulin-induced FoxO1 in hepatocytes compared to that in the DIO and DIO-EXE groups. There was no additive effect in the group of animals treated with ASO and exercised concomitantly (Figure 5A-D).

*** Figure 5 ***

Exercise reduces the levels of PGC-1 α , HNF-4 α and gluconeogenic enzymes

In this study, we also evaluated the effect of exercise on the levels of proteins involved in the transcription of gluconeogenic genes. Obese animals had increased PGC-1 α protein levels in their livers compared to lean animals. Exercise reduced the hepatic expression of PGC-1 α compared with that observed in DIO animals. The decrease found in the content of PGC-1 α in the liver of the DIO-EXE group was only partial; the levels were higher than those in the lean group. A similar effect was observed in the DIO-ASO group (Figure 6A).

The obese mice had a significant increase in HNF-4 α protein levels when compared to the control group. Exercise reduced the content of HNF-4 α compared to that observed in sedentary obese animals. The HNF-4 α levels seen in exercised animals were higher than those in the lean group. The animals in the DIO-ASO group showed no change in the expression of HNF-4 α , and the values were similar to those obtained in obese mice (DIO) (Figure 6B).

We analyzed the expression of gluconeogenic enzymes in the hepatic tissue and observed that in obese mice (DIO), the expression of PEPCK and G6Pase was significantly increased when compared with the lean mice (Figure 6C and D, respectively). PEPCK and G6pase levels in the livers of DIO-EXE mice were reduced compared to those observed in DIO mice. The levels of G6Pase and PEPCK in the livers of the group treated with the antisense oligonucleotide to MKP-3 were similar to those observed in the DIO-EXE group (Figure 6C and D, respectively). There was no additive effect in the group of animals treated with ASO and exercised concomitantly (Figure 6C-D).

Finally, to evaluate liver glucose production, mice received an intraperitoneal injection of sodium pyruvate, and their blood glucose levels were measured ((Figure 6E). As shown in Figures 6E and 6F, the glycemic curve and the area under the curve (AUC) were greater in the DIO mice than in the other groups. Additionally, the pyruvate tolerance test showed that DIO mice had a pronounced increase in blood glucose until 90 minutes after injection and that after

this point, there was a slight decline in blood glucose (Figure 6E). However, the glucose curves for DIO-EXE, DIO-ASO and DIO-EXE-ASO mice were similar, showing an increase in glucose levels until 60 minutes after injection and then a decline in values until the end of the test.

*** Figure 6 ***

Effects of exercise on phosphorylation of ERK1/2

In this study, we determined the effect of exercise on the phosphorylation of ERK1/2 in the livers of obese mice. The DIO mice had increased phosphorylation of ERK1/2 compared to the lean group. There was a significant reduction in the phosphorylation of ERK1/2 in the EXE group 36 hours after the last exercise session compared to that observed in DIO mice (Figure 7A-B). These results were accompanied by reduced levels of MKP-3 in the livers of exercised mice (Figure 7B).

Next, we performed immunohistochemical analyses to evaluate the localization of MKP-3 in obese mice (Figure. 7C-E). Immunohistochemistry with an MKP-3-specific antibody revealed that obesity increased the MKP-3 content and that exercise was able to decrease the MKP-3 protein levels (Figure 7E).

*** Figure 7 ***

DISCUSSION

Insulin resistance plays a central role in metabolic control because defects in intracellular insulin signaling in the liver impair adequate suppression of gluconeogenesis, leading to increased glucose in both the fed and fasting states. Inactivation of FoxO1 is the major mechanism by which insulin represses gluconeogenesis. However, MKP-3-mediated dephosphorylation of FoxO1 at Ser256 promotes its nuclear translocation and subsequent recruitment to the promoters of key gluconeogenic genes (*Wu et al, 2010; Jiao et al, 2012*). Here, we have shown that expression of MKP-3 is markedly increased in the livers of diet-induced obese mice. However, our data demonstrated that exercise was sufficient to reduce the protein levels of MKP-3 in the liver. In parallel, we observed that exercised mice showed reductions in MKP-3's interaction with FoxO1, improving the action of insulin in liver and suppressing gluconeogenesis. We also determined that exercise reduces hepatic MKP-3 protein levels, at least in part through ERK1/2. These data are important because inhibition of hepatic gluconeogenesis is a potential target therapy to combat diabetic hyperglycemia, and most currently used anti-diabetes therapies have little to no effect on MKP-3 activity. Thus, our study provides substantial evidence that exercise can help restore insulin signaling in the liver and, therefore, aid in counteracting the disturbance of glucose homeostasis induced by obesity, including changes in hepatic MKP-3 protein levels.

MKP-3 is a dual-specificity phosphatase that plays an important role in glucose metabolism (*Jiao et al 2012*). The expression of this protein is elevated in both genetically (ob/ob) and diet-induced obese mice (*Wu et al, 2010*). Previous studies indicate that MKP-3 most likely increases transcription of gluconeogenic gene expression through activation of FoxO1 (*Xu et al, 2005; Wu et al, 2010; Jiao et al, 2012*). Interestingly, reduction of MKP-3 expression in experimental obesity models alleviated hyperglycemia (*Wu et al, 2010*). Therefore, elevation of hepatic MKP-3 expression in the insulin-resistant state may contribute to the inappropriate activation of gluconeogenesis in type 2 diabetes. In vitro experiments and immunoblot analyses have demonstrated that MKP-3 dephosphorylates FoxO1, preventing its phosphorylation and translocation from the nucleus to the cytoplasm after stimulation with insulin (*Wu et al, 2010*). Moreover, overexpression of MKP-3 resulted in insulin resistance and increased hepatic glucose production (*Wu et al, 2010*). Conversely, in the same study, the authors demonstrated that lean

mice with reduced hepatic MKP-3 expression had significantly decreased gluconeogenic capacity in response to a challenge with a gluconeogenic precursor (pyruvate).

Reduction of MKP-3 expression in the livers of obese mice (MKP-3 knockdown in DIO mice) decreased blood glucose levels in both fed and fasted states without affecting body weight (Wu *et al*, 2010). Plasma insulin levels were lower in DIO mice with reduced hepatic MKP-3 expression. Additionally, DIO mice with reduced hepatic MKP-3 expression had an impaired response to a pyruvate challenge (Wu *et al*, 2010). Corroborating these genetic strategies, our data demonstrated that swimming exercise was sufficient to reduce MKP-3 protein levels and the FoxO1/MKP-3 interaction in the hepatic tissue of obese rodents. It is important to note that exercise reduced MKP-3 protein levels and partially restored the insulin action without changing the body weight or adiposity. The favorable effects of exercise on insulin signaling pathways have also been demonstrated in previous studies (Ropelle *et al*, 2009; De Souza *et al*, 2010; da Luz *et al*, 2011; Oliveira *et al*, 2011; Marinho *et al*, 2012; de Moura *et al*, 2013); however, the molecular mechanisms responsible for the improvement in insulin sensitivity in response to exercise are not yet fully known. Here, we demonstrated for the first time that exercise can restore insulin signaling in liver by reducing hepatic activity of MKP-3.

To explore the molecular mechanism underlying the suppression of gluconeogenesis by physical exercise, we also examined the protein levels of PGC-1 α , a key gluconeogenic transcription coactivator in the liver. Under normal, *ad libitum*-fed conditions, the expression of PGC-1 α is relatively low in the liver compared with other tissues that rely on aerobic metabolism for ATP production (Puigserver & Spiegelman 2003b). Conversely, the expression of PGC-1 α and hepatic glucose output are both elevated in several models of diabetes and insulin signaling deficiency (De Souza *et al*, 2010). Systemic glucose tolerance and insulin sensitivity have been characterized in PGC-1 α -deficient mice; indeed, liver-specific overexpression and knockdown strategies indicate that PGC-1 α , when activated, drives hepatic glucose production (Yoon *et al*, 2001; Lin *et al*, 2003). Additionally, FoxO1 acts as a transcription factor in various cell types; in the liver, specifically, it is responsible for increased transcription of PGC-1 α , which is an important amplifier of hepatic gluconeogenesis (Puigserver & Spiegelman 2003b).

In an elegant study, Wu and colleagues showed that PGC-1 α mRNA levels were markedly increased by MKP-3 overexpression, and this induction was prevented when cells were transduced with a PGC-1 α shRNA adenovirus (Wu *et al*, 2010). Moreover, the increases in PEPCK and G6pase mRNA levels induced by MKP-3 overexpression were completely abolished when PGC-1 α was knocked down. In addition, PGC-1 α knockdown completely abolished the MKP-3-induced increase in glucose output in rat primary hepatocytes. These results indicate that MKP-3-induced gluconeogenesis requires PGC-1 α . Previously, we demonstrated that exercise improves insulin signaling and reduces PGC-1 α protein levels in the livers of obese mice (Ropelle *et al*, 2009; Marinho *et al*, 2012). In the present study, we demonstrated that PGC1 α protein levels decrease in livers of obese mice subjected to an physical exercise protocol or to treatment with an antisense oligonucleotide targeting MKP-3.

Decreases in the levels of PGC-1 α in the liver can also reduce the expression of HNF4 α and transcription of PEPCK and G6Pase. A study showed that the HNF-4 α has an important role in regulating gluconeogenesis and glycolysis in response to fasting and feeding (Hirota *et al*, 2008). It is currently recognized that FoxO1 plays a key role in switching between glycolysis and gluconeogenesis, and HNF-4 α is an indispensable component of this switching mechanism. Here, we demonstrated that protein levels of HNF-4 α in the liver were increased significantly in DIO mice compared to lean mice. It was observed that the exercised mice but not obese rodents treated with an antisense oligonucleotide to MKP-3 demonstrated a significant reduction in the levels of HNF-4 α compared to DIO mice. In this regard, it is known that HNF-4 α is required for proper control of the expression of many genes, especially expressed in the liver (e.g., FoxO1, C/EBP, PPAR alpha, LRX, COUP), and is associated with a number of critical metabolic pathways (e.g., glycolysis, gluconeogenesis, ureagenesis, fatty acid metabolism, bile acid synthesis, apolipoproteins and hepatocyte differentiation) (Gonzales *et al*, 2008). Exercise induces changes in these metabolic processes that may partially explain the reduction in the levels of HNF4 α found in the exercised animals. HNF4 α also regulates the constitutive expression of target genes encoding enzymes, transporters and even other nuclear receptors, and accounts for, in large part, the liver-specific expression of these genes (Gonzales *et al*, 2008). Additionally, it should be noted that many other HNF4 α target genes are not co-activated by PGC-1 α (Rhee *et al*, 2003; Hirota *et al*, 2008). The mechanism underlying this

specificity is not known, but it may be due to the presence of other specific sequences near the HNF4 α binding site.

In addition to HNF4 α , PGC-1 α also regulates a number of other transcription factors such as FoxO1, GR (glucocorticoid receptor), PPAR α and PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptors) in liver and other tissues and is thus a critical component of other important metabolic consequences of the fasting response including fatty acid β -oxidation and ketogenesis. However, unlike gluconeogenesis, these processes do not depend on HNF-4 α (Rhee *et al*, 2003). Rhee and colleagues demonstrated in an interesting study that the presence of HNF-4 α is absolutely required by PGC-1 α to induce PEPCK and G6Pase gene expression (Rhee *et al*, 2003). The results obtained in our study show that obese animals had significant increases in the protein level of PGC-1 α and HNF4 α and that this was accompanied by increases in PEPCK and G6Pase levels in the liver. These results are consistent with other studies that examined mice with severe insulin resistance (Lima *et al*, 2009; Wu *et al*, 2010). In the same vein, Heled and colleagues showed that exercise enhances hepatic insulin signaling and inhibits the activity of PEPCK in animals prone to diabetes (*Psammomys obesus*, also known as desert rats) (Heled *et al*, 2004). According to these data, the present study showed that there was a decrease in gluconeogenesis in exercised mice compared with DIO mice during the pyruvate tolerance test (PTT). In light of these findings, it seems evident that exercise plays an important role in inhibiting gluconeogenesis in obese rodents and has effects on FoxO1, PGC-1 α and HNF4 α in the liver.

Furthermore, our findings suggest that the reduction in the expression of MKP-3 may be related to the effect of exercise in suppressing the activity of ERK. Both ERK-1 and ERK-2 are part of the MAPK subfamily. Activation of the MAPK signaling pathway is a known mechanism that may induce insulin resistance through increases in IRS-1 serine³⁰⁷ phosphorylation. A previous study by our research group showed that obese mice have increased phosphorylation of ERK1/2, which may contribute to the induction of insulin resistance in peripheral tissues (Oliveira *et al*, 2001). MKP-3 specifically inactivates ERK, and in turn, ERK causes the activation of MKP-3. It has been observed that the interaction between ERK and MKP-3 occurs physically, allowing a reciprocal cross-regulation of the activity of these proteins (Fjeld *et al*, 2000). In our study, we observed that the levels of ERK phosphorylation were higher in obese

mice compared to those in lean mice. Interestingly, exercise significantly reduced the phosphorylation of ERK, and this was accompanied by reduced expression of MKP-3 (as shown by immunoblot and immunohistochemical analyses) and reduced association between FoxO1 and MKP-3. Conversely, other studies in the literature have observed that MAPK activity increases during exhaustive acute exercise (Ryder et al, 2000; Chambers et al, 2009), but the exercise protocol and type of tissue evaluated may explain these differences; furthermore, the exercise-induced increase in MAPK phosphorylation rapidly decreases upon the cessation of exercise and is completely restored to resting levels at 60 min after exercise (*Widegren et al, 1998*). Oliveira and colleagues also found a significant decrease in the ERK protein levels in the liver of obese Wistar rats with a swimming exercise protocol equivalent to that used in the present study (*Oliveira et al, 2011*). The decline in ERK phosphorylation was observed 24 and 36 hours after the last exercise training session.

In conclusion, the results of this study demonstrated that physical exercise markedly decreased both MKP-3 protein levels and the association between FoxO1 and MKP-3 in the livers of obese mice. In addition, exercised obese mice had higher levels of phosphorylated FoxO1 and lower levels of PGC-1 α and HNF-4 α proteins, with consequent reductions in the expression of gluconeogenic enzymes (PEPCK and G6Pase). These findings were accompanied by physiological changes, including increased sensitivity to insulin and reduced hepatic glucose production and hyperglycemia, in obese mice. Additive effects were not observed in the group that received treatment with the antisense oligonucleotide to MKP-3 and was subjected to physical exercise. Finally, the suppressive effects of exercise on MKP-3 protein appear to be related, at least in part, to decreased phosphorylation of ERK in the livers of obese mice.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge the assistance of Professor Lício Augusto Velloso and Rodrigo Ferreira de Moura with the immunohistochemistry and oligonucleotide antisense experiment and financial support from FAPESP (process n° 2010/12091-2, 2011/14727-4 and 2011/13779-0).

REFERENCES

- Bonora E, Moghetti P, Zancanaro C, Cigolini M, Querenza M, Cacciatori V, Corgnati A & Muggeo M (1989). Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. *J Clin Endocrinol Metab* 68: 374-378.
- Bradford, MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Camps M, Chabert C, Muda M, Boschert U, Gillieron C & Arkinstall S (1998). Induction of the mitogen-activated protein kinase phosphatase MKP3 by nerve growth factor in differentiating PC12. *FEBS Lett* 425: 271-276.
- Chambers MA, Moylan JS, Smith JD, Goodyear LJ & Reid MB (2009). Stretch-stimulated glucose uptake in skeletal muscle is mediated by reactive oxygen species and p38 MAP-kinase. *J Physiol* 587: 3363-3373.
- da Luz G, Frederico MJ, da Silva S, Vitto MF, Cesconetto PA, de Pinho RA, Pauli JR, Silva AS, Cintra DE, Ropelle ER & De Souza CT (2011). Endurance exercise training ameliorates insulin resistance and reticulum stress in adipose and hepatic tissue in obese rats. *Eur J Appl Physiol* 111: 2015-2023.
- Daitoku H, Yamagata K, Matsuzaki H, Hatta M & Fukamizu A (2003). Regulation of PGC-1 promoter activity by protein kinase B and the forkhead transcription factor FKHR. *Diabetes* 52: 642-649.
- de Moura LP, Souza Pauli LS, Cintra DE, de Souza CT, da Silva AS, Marinho R, de Melo MA, Ropelle ER & Pauli JR (2013). Acute exercise decreases PTP-1B protein level and improves insulin signaling in the liver of old rats. *Immun Ageing* 10: 8 (in press).
- De Souza CT, Frederico MJ, da Luz G, Cintra DE, Ropelle ER, Pauli JR & Velloso LA (2010). Acute exercise reduces hepatic glucose production through inhibition of the Foxo1/HNF-4 α pathway in insulin resistant mice. *J Physiol* 588: 2239-2253.
- Feng B, Jiao P, Yang Z & Xu H (2012). MEK/ERK pathway mediates insulin-promoted degradation of MKP-3 protein in liver cells. *Mol Cell Endocrinol* 361: 116-123.

Fjeld CC, Rice AE, Kim Y, Gee KR & Denu JM (2000). Mechanistic basis for catalytic activation of mitogen-activated protein kinase phosphatase 3 by extracellular signal-regulated kinase. *J Biol Chem* 275: 6749-6757.

Gonzales FJ (2008). Regulation of Hepatocyte Nuclear Factor 4 α -mediated Transcription. *Drug Metab. Pharmacokinet* 23: 2-7.

Heled Y, Shapiro Y, Shani Y, Moran DS, Langzam L, Barash V, Sampson SR & Meyerovitch J (2004). Physical exercise enhances hepatic insulin signaling and inhibits phosphoenolpyruvate carboxykinase activity in diabetes-prone Psammomys obesus. *Metabolism* 53: 836-841.

Hirota K, Sakamaki J, Ishida J, Shimamoto Y, Nishihara S, Kodama N, Ohta K, Yamamoto M, Tanimoto K & Fukamizu A (2008). A combination of HNF-4 and Foxo1 is required for reciprocal transcriptional regulation of glucokinase and glucose-6-phosphatase genes in response to fasting and feeding. *J Biol Chem* 283: 32432-32441.

Jiao P, Feng B & Xu H (2012). Mapping MKP-3/FOXO1 interaction and evaluating the effect on gluconeogenesis. *PLoS One* 7: e41168.

Jurek A, Amagasaki K, Gembarska A, Heldin CH & Lennartsson J (2009). Negative and positive regulation of MAPK phosphatase 3 controls platelet-derived growth factor-induced Erk activation. *J Biol Chem* 284: 4626-4634.

Liao J, Barthel A, Nakatani K & Roth RA (1998). Activation of protein kinase B/Akt is sufficient to repress the glucocorticoid and cAMP induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *J Biol Chem* 273, 27320–27324.

Lima AF, Ropelle ER, Pauli JR, Cintra DE, Frederico MJ, Pinho RA, Velloso LA & De Souza CT (2009). Acute exercise reduces insulin resistance-induced TRB3 expression and amelioration of the hepatic production of glucose in the liver of diabetic mice. *J Cell Physiol* 221: 92-97.

Lin J, Tarr PT, Yang R, Rhee J, Puigserver P, Newgard CB & Spiegelman BM (2003). PGC-1 β in the regulation of hepatic glucose and energy metabolism. *J Biol Chem* 278: 30843-30848.

Maillet M, Purcell NH, Sargent MA, York AJ, Bueno OF & Molkentin JD (2008). DUSP6 (MKP3) null mice show enhanced ERK1/2 phosphorylation at baseline and increased myocyte proliferation in the heart affecting disease susceptibility. *J Biol Chem* 283: 31246-31255.

Marchetti S, Gimond C, Chambard JC, Touboul T, Roux D, Pouyssegur J & Pagès G (2005). Extracellular signal-regulated kinases phosphorylate mitogen-activated protein kinase

phosphatase 3/DUSP6 at serines 159 and 197, two sites critical for its proteasomal degradation. *Mol Cell Biol* 25: 854-864.

Marinho R, Ropelle ER, Cintra DE, De Souza CT, Da Silva AS, Bertoli FC, Colantonio E, D'Almeida V & Pauli JR (2012). Endurance exercise training increases APPL1 expression and improves insulin signaling in the hepatic tissue of diet-induced obese mice, independently of weight loss. *J Cell Physiol* 2917-2926, 2012.

Oliveira AG, Carvalho BM, Tobar N, Ropelle ER, Pauli JR, Bagarolli RA, Guadagnini D, Carvalheira JB & Saad MJ (2011). Physical exercise reduces circulating lipopolysaccharide and TLR4 activation and improves insulin signaling in tissues of DIO rats. *Diabetes* 60: 784-796.

Pauli JR, Ropelle ER, Cintra DE, Carvalho-Filho MA, Moraes JC, De Souza CT, Velloso LA, Carvalheira JB & Saad MJ (2008). Acute physical exercise reverses S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1 and protein kinase B/Akt in diet-induced obese Wistar rats. *J Physiol* 586: 659-671.

Pilkis SJ & Granner DK (1992). Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu Rev Physiol* 54, 885–909.

Prada PO, Pauli JR, Ropelle ER, Zecchin HG, Carvalheira JB, Velloso LA & Saad MJ (2006). Selective modulation of the CAP/Cbl pathway in the adipose tissue of high fat diet treated rats. *FEBS Lett* 580: 4889-4894.

Puigserver P & Spiegelman BM (2003a). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev*. 24: 78-90.

Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Walkey CJ, Yoon JC, Oriente F, Kitamura Y, Altomonte J, Dong H, Accili D & Spiegelman BM (2003b). Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction. *Nature* 423: 550-555.

FIGURES AND LEGENDS

Figure 1. Schematic of treatment with the antisense oligonucleotide targeting MKP-3.

Figure 2. Schematic of the physical exercise program.

Figure 3. MKP-3 protein levels in the livers of obese mice treated with various doses of the antisense oligonucleotide targeting MKP-3. Representative blots show (A) Hepatic MKP-3 protein levels in lean and diet-obesity mice (DIO, n=5). (B) MKP-3 inhibition assay was assessed in a dose-response experiment with sense and antisense oligonucleotides to MKP-3 (n=5). Data were expressed as the means $\pm$ S.E.M. of five mice. * $p < 0.05$ vs. the lean group (chow) and [#] $p < 0.05$ vs. the obese group (DIO).

Figure 4. Physiological parameters of the lean mice (Lean), obese mice (DIO), exercised obese mice (DIO-EXE), obese mice treated with the antisense oligonucleotide targeting MKP-3 (DIO-ASO) and obese mice exercised and treated with the antisense oligonucleotide targeting MKP-3 concomitantly (DIO-EXE-ASO). (A) Cumulative caloric intake (n=8); (B) Body mass (n=8); (C) Epididymal fat (n=8); (D) Fasting glucose (n=8); (E) Fasting insulin (n=8); (F) Insulin tolerance test (ITT) (n=8). Bars represent the means $\pm$ S.E.M. of eight mice. * $p < 0.05$ vs. the lean group (chow) and [#] $p < 0.05$ vs. the obese group (DIO).

Figure 5. Protein levels of FoxO1 and FoxO1/MKP-3 association in the livers of lean mice (Lean), obese mice (DIO), obese exercised mice (DIO-EXE), obese mice treated with the antisense oligonucleotide to MKP-3 (DIO-ASO) and obese mice exercised and treated with the antisense oligonucleotide to MKP-3 concomitantly (DIO-EXE-ASO). (A) Liver samples were immunoblotted (IB) with an anti-MKP-3 antibody and an anti- β -actin antibody (n=5, upper and

lower panels, respectively); (B) immunoprecipitation (IP) and immunoblot (IB) assays were performed to evaluate the FoxO1/MKP-3 association and FoxO1 protein levels in hepatic samples from various groups of mice (n=5, upper and lower panels, respectively); (C) Liver samples were immunoblotted (IB) with anti-phospho-FoxO1 and anti-FoxO1 antibodies (n=5, upper and lower panels, respectively); (D) Nuclear extraction assay was performed to evaluate FoxO1 protein levels in hepatic samples from various groups of animals (n=5). Data were expressed as the means $\pm$ S.E.M. of five mice. * $p < 0.05$ vs. the lean group (chow) and [#] $p < 0.05$ vs. the obese group (DIO).

Figure 6. Physical exercise reduces the levels of PGC-1 α , HNF-4 α and gluconeogenic enzymes in the liver of obese mice. Proteins levels of PGC-1 α , HNF-4 α , PEPCCK and G6Pase in hepatic tissues from lean mice (Lean), obese mice (DIO), obese exercised mice (DIO-EXE), obese mice treated with antisense to MKP-3 (DIO-ASO) and exercised obese mice treated with antisense to MKP-3 (DIO-EXE-ASO) were evaluate by immunoblot (IB). (A) Samples of livers were immunoblotted (IB) with antibodies to PGC-1 α and β -actin (n=5, Fig. 4A, upper and lower panels, respectively). (B) Liver samples were immunoblotted (IB) with antibodies to HNF-4 α and β -actin (n=5, Fig. 4B, upper and lower panels, respectively). (C) Liver samples were immunoblotted (IB) with antibodies to PEPCCK and β -actin (n=5, Fig. 4C, upper and lower panels, respectively). (D) Liver samples were immunoblotted (IB) with antibodies to G6Pase and β -actin (n=5, Fig. 4D, upper and lower panels, respectively). (E) Blood glucose levels during the pyruvate tolerance test and (F) area under curve (AUC) (PTT, n=8). Data were expressed as the means $\pm$ S.E.M. of five or eight mice. * $p < 0.05$ vs. the lean group (chow) and [#] $p < 0.05$ vs. the obese group (DIO).

Figure 7. Exercise reduces hepatic ERK phosphorylation and MKP-3 protein levels in obese mice. (A) Liver samples were immunoblotted (IB) with antibodies to pERK and β -actin (n=5, Fig. 5A, upper and lower panels, respectively). (B) Liver samples were immunoblotted (IB) with antibodies anti-to MKP-3 and β -actin (n=5, Fig. 5B, upper and lower panels, respectively). (C-E)

Confocal microscopy was performed to evaluate the localization of MKP-3 (green) in the livers of lean mice (C), obese mice (D) and exercised mice (E), with 200x magnification (scale bar, 20 μ m). Yellow arrows indicate MKP-3-positive cells. Data were expressed as the means $\pm$ S.E.M. of five mice. * $p < 0.05$ vs. the lean group (chow) and # $p < 0.05$ vs. the obese group (DIO).

Figure 1.

Figure 1.

Treatment with ASO

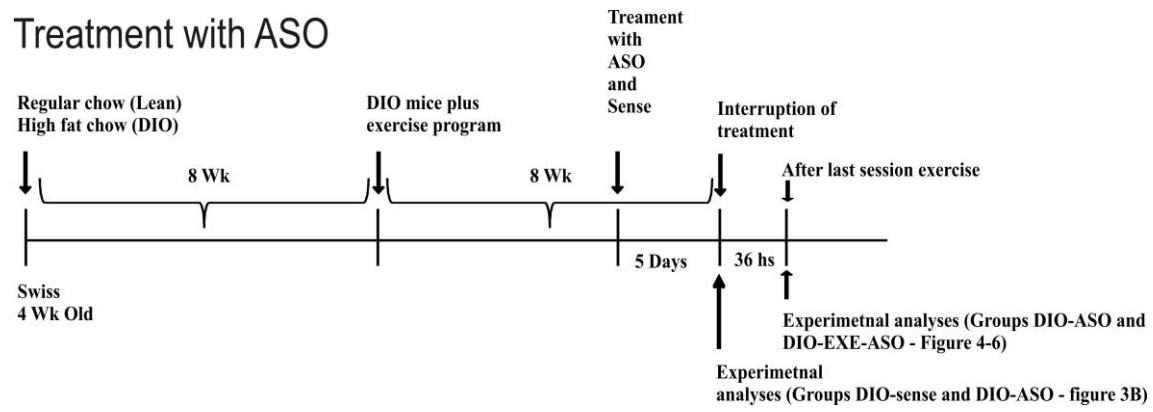


Figure 2

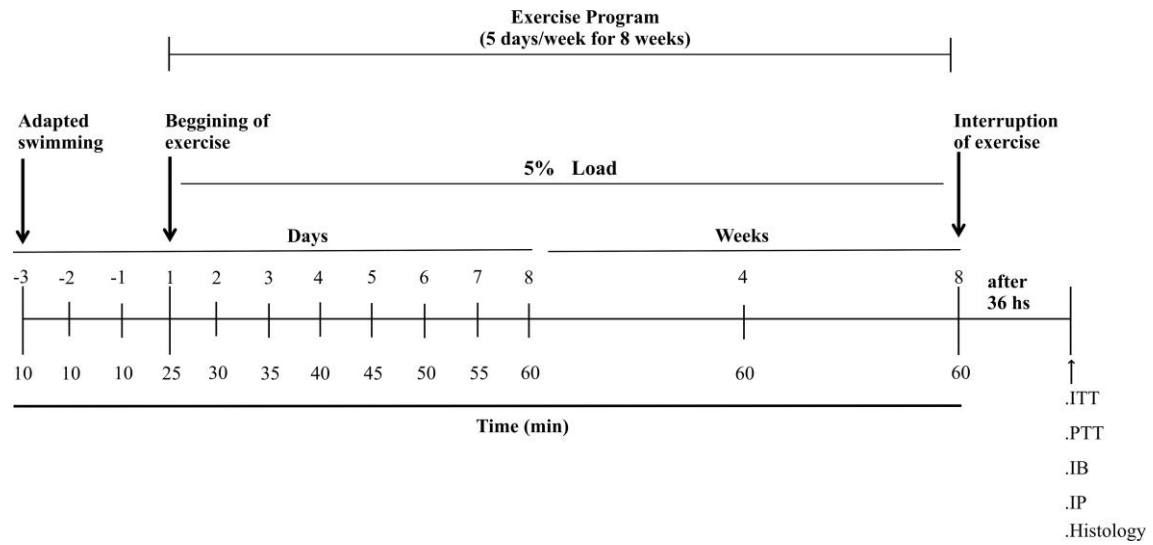


Figure 3.

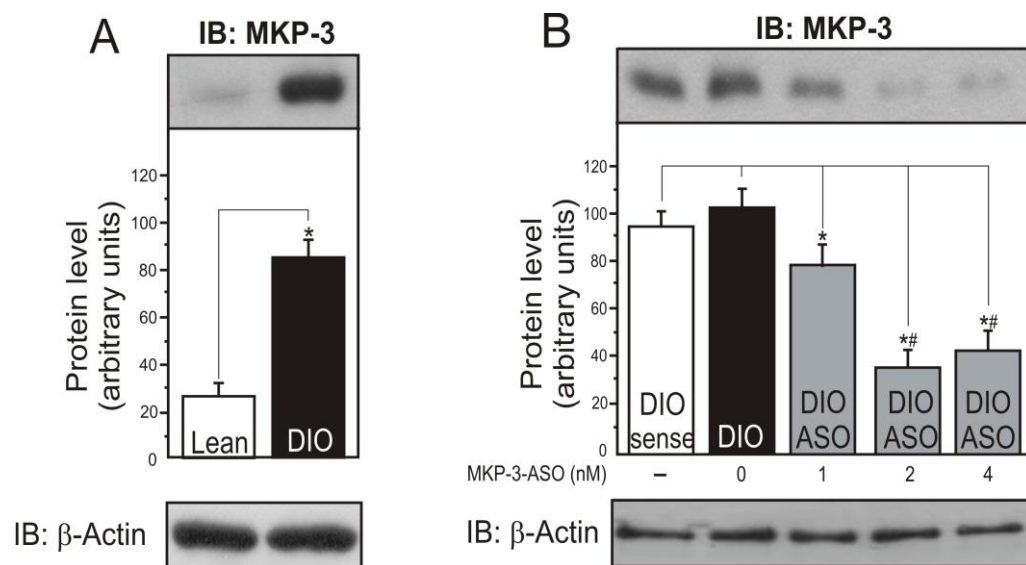


Figure 4.

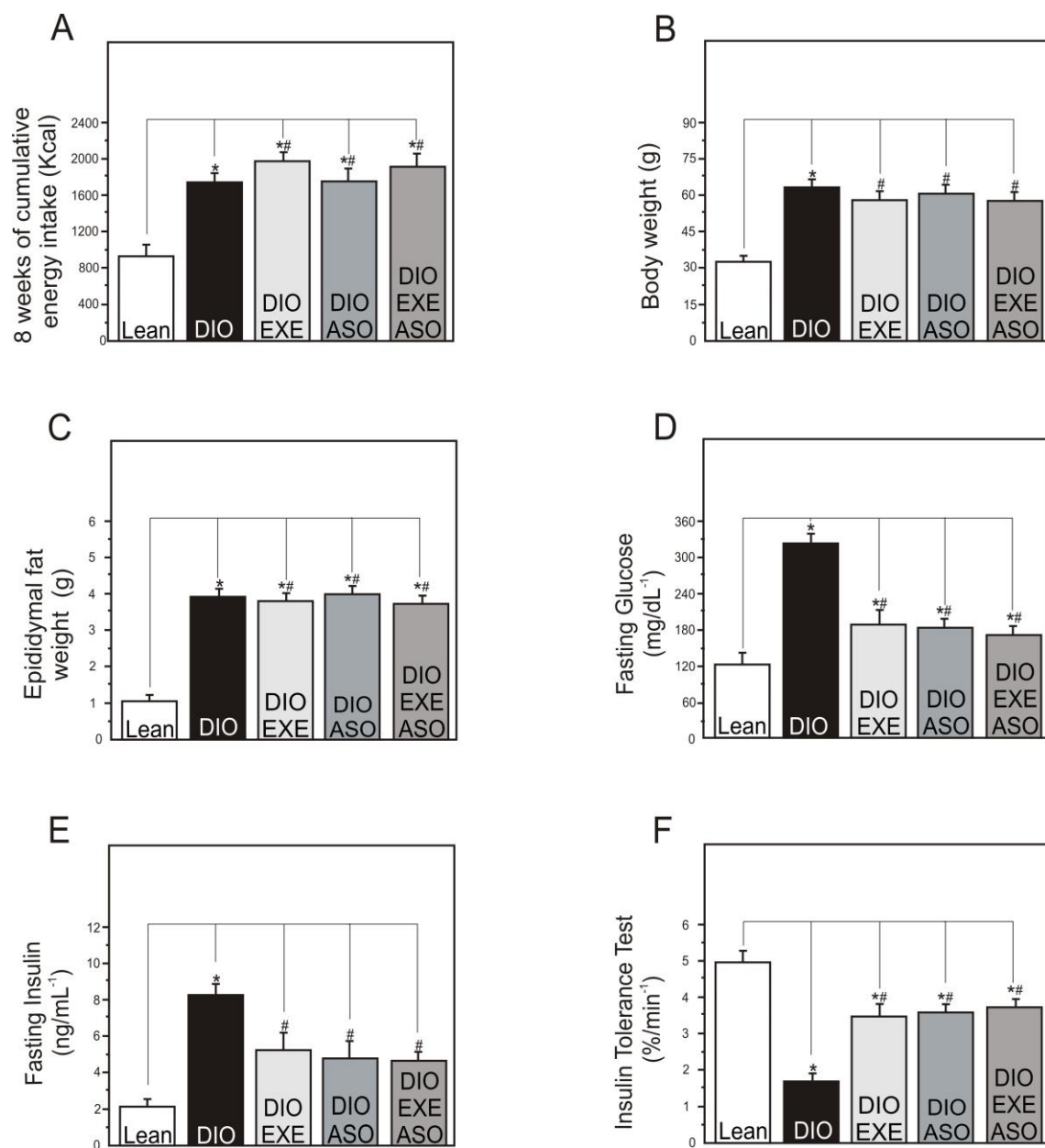


Figure 5.

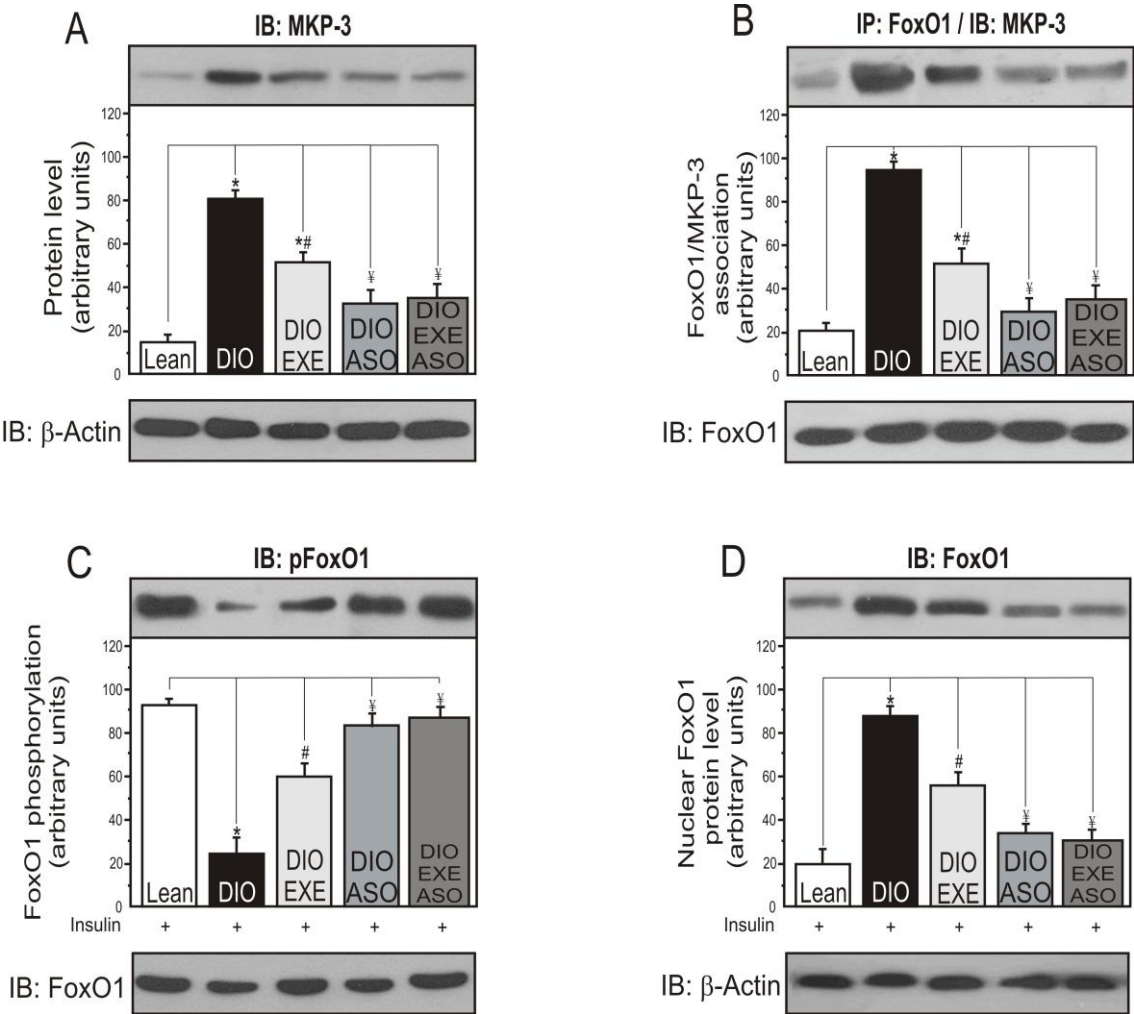


Figure 6.

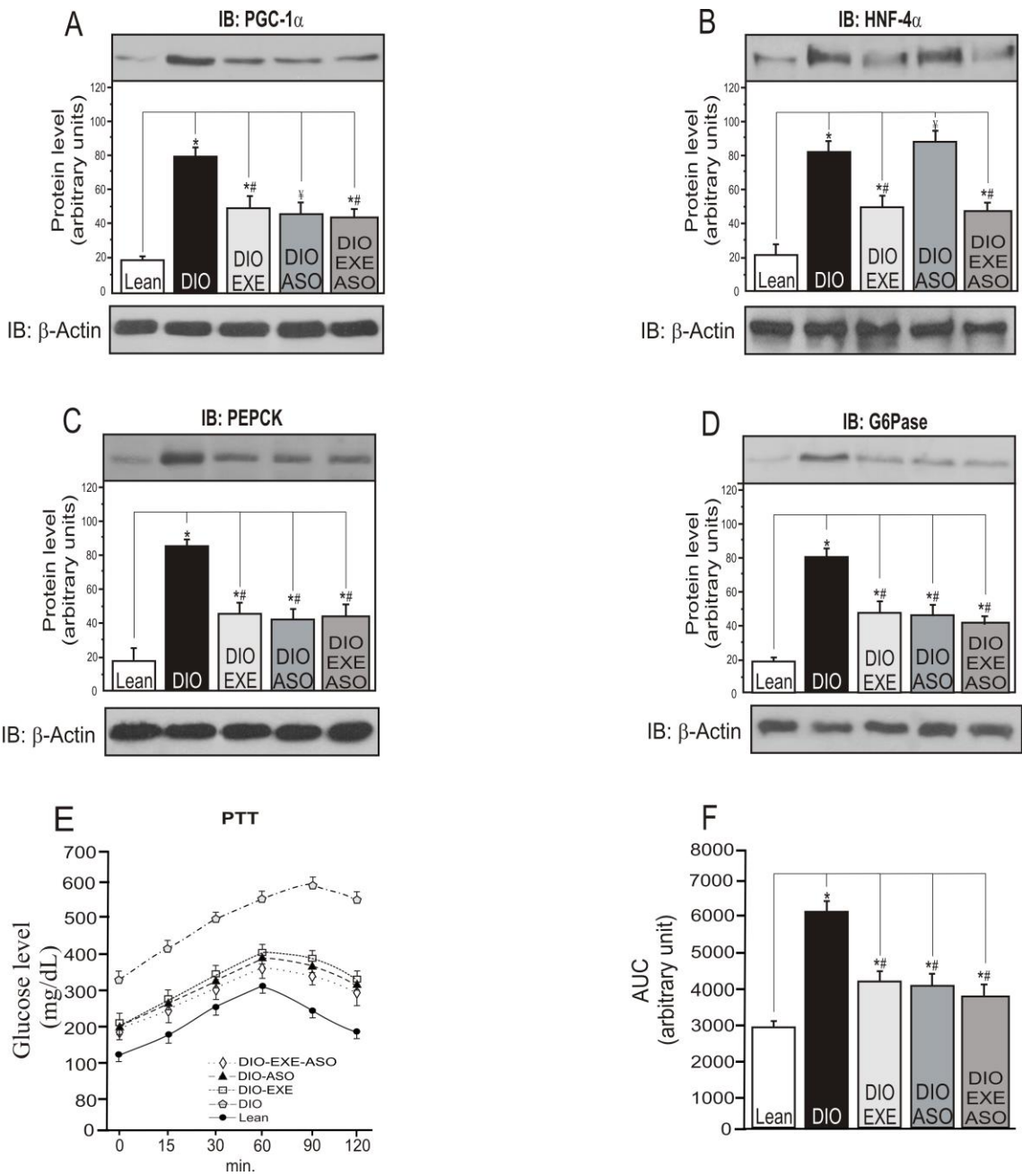
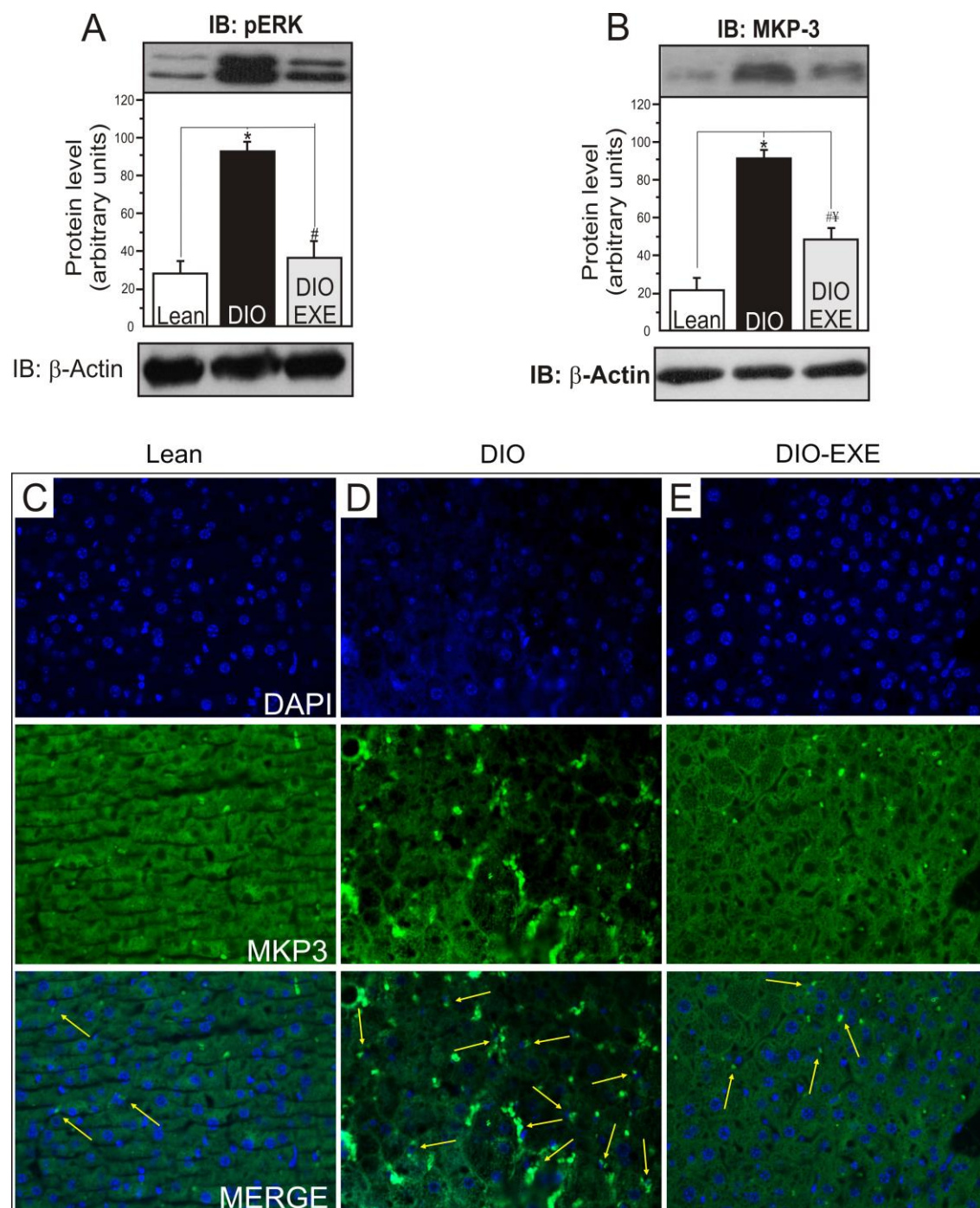


Figure 7.



4- DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Em pacientes com diabetes tipo 2 a taxa de gliconeogênese hepática é consideravelmente aumentada comparada com a de indivíduos saudáveis, contribuindo significativamente com a elevação da glicemia de jejum (35). A resistência à insulina tem papel central neste descontrole metabólico, uma vez que defeitos no sinal intracelular da insulina no fígado impede a adequada supressão sobre a via da gliconeogênese, conduzindo a elevação da glicose tanto após as refeições (estado pós-prandial) quanto no estado de jejum. Nesse processo as proteínas FoxO1, PGC1 α e HNF4 α participam efetivamente da regulação da gliconeogênese, sendo alvo de diversos estudos (36).

O prejuízo na ação da insulina está associado à produção de biomoléculas, provenientes do tecido adiposo hipertrofiado (obesidade), responsáveis pelo efeito negativo sobre as proteínas da via de sinalização da insulina (16, 29). Dentre os mecanismos moleculares envolvidos destaca-se a participação da proteína MKP-3, que é capaz de desfosforilar a FoxO1 permitindo sua permanência no núcleo do hepatócito e a transcrição de genes gliconeogênicos, induzindo hiperglicemia (11). Nesse contexto, desde que se reconhece que o exercício físico é capaz de favorecer a homeostase da glicose através de inúmeros mecanismos, incluindo a redução da produção hepática de glicose (14-16), o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do treinamento físico sobre a expressão de MKP-3 e das proteínas envolvidas na transcrição de enzimas gliconeogênicas (PEPCK e G6pase) como a FoxO1, PGC1 α e HNF-4 α . Além disso, foram feitos experimentos adicionais com oligonucleotídeo antisense MKP-3 para avaliar a relevância da proteína MKP-3 sobre o mecanismo de gliconeogênese.

Camundongos nocautes do receptor de insulina no fígado, denominado de camundongos LIRKO (*liver-specific insulin receptor knockout*) efetivamente mostraram que a ausência do receptor causa severa resistência à insulina, intolerância à glicose e incapacidade da insulina em suprimir a produção hepática de glicose (37, 38). Corroborando com essa ideia, estudos realizados nas últimas décadas tem confirmado

que a presença da insulina é fundamental para a expressão gênica de enzimas envolvidas com a gliconeogênese, como a PEPCK e G6Pase (15, 30, 34). Prejuízo na propagação do sinal da insulina em células hepáticas no estado de obesidade é capaz de aumentar a produção hepática de glicose e subsequentemente causar alteração de início na glicemia pós-prandial e tardiamente na glicemia de jejum (11, 14-16). Tal tentativa de analogia e interpretação pode ser reforçada por estudos que mostraram que baixos níveis de Akt e FoxO1 fosforiladas foram encontrados no fígado de camundongos obesos e hiperglicêmicos (11, 39).

De acordo com esses resultados foi observado em nosso estudo que a oferta de uma dieta hiperlipídica reduziu a fosforilação de FoxO1, contribuindo para a hiperglicemia de jejum dos animais. Ao contrário, o treinamento físico aumentou a fosforilação de FoxO1, reduzindo os níveis de glicose de jejum e melhorando a sensibilidade à insulina avaliada pelo teste de tolerância à insulina (TTI), independentemente da redução da massa corporal total. Tais resultados positivos sobre a via da sinalização da insulina mediada por exercício físico no tecido hepático foi observado em estudos prévios em nosso laboratório e de outros pesquisadores (14-17); entretanto, os mecanismos responsáveis pelo aumento da sensibilidade à insulina mediada pelo exercício ainda não são totalmente conhecidos.

Recentemente, um grupo de pesquisadores demonstrou que a proteína MKP-3 regula negativamente a atividade da FoxO1 (11). A MKP-3 inibe a interação entre a Akt e a FoxO1 nos hepatócitos de roedores, o que é acompanhado por aumento na ativação de enzimas gliconeogênicas PEPCK e G6Pase (11). Tanto experimentos com células in vitro como análises por imunoblot demonstraram que a MKP-3 é capaz de desfosforilar a FoxO1 impedindo sua fosforilação e extrusão do núcleo para o citoplasma após estímulo com insulina (11). Além disso, a superexpressão de MKP-3 resultou em resistência à insulina e produção hepática de glicose aumentada (11). Em nosso estudo, observou-se que animais obesos induzidos por dieta hiperlipídica tiveram aumento na expressão proteica de MKP-3 no fígado se comparado ao grupo controle. O tratamento com oligonucleotídeo antisense MKP-3 reduziu a expressão de MKP-3 e isto foi acompanhado por melhora na homeostase da glicose. Já o exercício físico foi capaz

de reduzir parcialmente a expressão de MKP-3 no fígado e promover melhoras na homeostase da glicose semelhantes aos animais tratados com o antisense MKP-3, sugerindo que os efeitos do exercício físico podem envolver outras proteínas responsáveis pela gliconeogênese, incluindo PGC1 α e HNF-4 α .

Em condição normal e de estado alimentado a expressão de PGC1 α é relativamente baixa no fígado comparado com outros tecidos que dependem do metabolismo aeróbio para produção de ATP (8). De maneira oposta, na condição de obesidade há o aumento na expressão de PGC1 α e na produção hepática de glicose (15). Estudos que fizeram a inibição ou a ativação de PGC1 α efetivamente demonstraram que esta proteína exerce importante papel sobre o processo de gliconeogênese (40, 41). Em nosso estudo, a expressão de FoxO1 e de PGC1 α foi reduzida nos animais tratados com oligonucleotídeo antisense MKP-3. Sabidamente FoxO1 atua como fator de transcrição em diversos tipos celulares e especificamente no fígado é responsável pelo aumento da transcrição da proteína PGC1 α , que como previamente apresentado se constitui num importante amplificador para gliconeogênese hepática (8). Uma vez obtido através do tratamento com oligonucleotídeo antisense MKP-3 uma redução significativa da expressão da proteína MKP-3 e, por conseguinte de FoxO1 no núcleo do hepatócito, parece coerente a redução mais acentuada da expressão de PGC1 α nos animais OB-ASO se comparado ao grupo de animais exercitados (EXE).

A proteína HNF-4 α também tem papel importante no controle da gliconeogênese. Estudo prévio mostrou que o efeito supressivo da insulina na gliconeogênese depende das proteínas HNF-4 α e FoxO1 no fígado (26). De fato, em modelos de resistência à insulina o conteúdo proteico de ambos HNF-4 α e FoxO1 estão aumentados, inclusive em resposta ao estímulo com insulina (26). Tem sido sugerido que o HNF-4 α interfere no metabolismo da glicose no fígado pelo controle transcricional tanto da enzima glicoquinase (GK) quanto da G6Pase (26), responsáveis por catalisarem o primeiro e o último passo limitante da glicólise e gliconeogênese.

A interação simultaneamente entre FoxO1 e HNF-4 α leva a uma ativação dos genes gliconeogênicos e inibição dos genes glicolíticos. Portanto, FoxO1 reprime a

transcrição potencial por HNF-4 α do gene da GK e o sinergismo entre as duas proteínas aumentam a transcrição do gene da G6Pase (26). No presente trabalho, a expressão proteica do HNF-4 α no fígado aumentou significativamente nos animais obesos em relação aos animais controles. Observou-se que o grupo exercitado teve uma redução significativa do HNF-4 α em relação ao grupo obeso sedentário e obeso tratado com antisense MKP-3.

Ademais é reconhecido que FoxO1 exerce papel chave na transição entre a glicólise e a gliconeogênese, sendo a proteína HNF-4 α um componente indispensável deste processo. Na ausência de insulina, FoxO1 se localiza no núcleo e simultaneamente FoxO1 e HNF-4 α sinergicamente ativam o gene promotor da G6pase, presumidamente via PGC1 α para favorecer a gliconeogênese. Ao contrário, na presença de insulina FoxO1 é fosforilada e excluída do núcleo resultando em dissociação do HNF-4 α . Nessa situação, HNF-4 α pode ativar o gene promotor da GK e favorecer a via glicolítica (26).

Segundo estudos anteriores PGC1 α pode aumentar a transcrição dos genes da PEPCK e G6Pase mediado pelo HNF-4 α (8). Como visto em nosso estudo o treinamento físico foi capaz de reduzir parcialmente a expressão de FoxO1, PGC1 α e HNF-4 α no fígado dos animais obesos. Observou-se ainda que exercício físico e tratamento com oligonucleotídeo antisense MKP-3 concomitantemente não teve efeitos aditivos sobre a expressão das enzimas PEPCK e G6pase, bem como, na produção hepática de glicose avaliada através do teste de tolerância ao piruvato. Tal explicação pode estar associada ao fato do antisense para MKP-3 utilizado não modular significativamente a expressão de HNF-4 α e o efeito do treinamento físico sobre esta proteína ter sido apenas parcial. Rhee e colaboradores demonstraram que a PGC1 α é capaz de promover a indução de diversos genes relacionados a beta-oxidação e cetogênese no fígado, mas para estes processos acontecerem, diferentemente da gliconeogênese, não há dependência do HNF-4 α (27).

Ainda em relação a esta questão, é conhecido que o HNF-4 α é requerido para o controle da expressão de muitos genes, especialmente no fígado associado com

um número de rotas metabólicas essenciais ao organismo. HNF4 α tem efeito sobre genes alvos que codificam enzimas, transportadores e receptores nucleares, sobretudo, com ações sobre a expressão de genes no fígado. Além do mais, HNF4 α pode ser regulado por diversos ligantes endógenos e exógenos. Sendo que, muitos destes processos são influenciados pelo exercício físico, explicando no mínimo em parte, a redução da expressão proteica do HNF4 α no fígado observado nos animais obesos exercitados (26, 27).

Na análise das enzimas gliconeogênicas, observou-se que os animais obesos sedentários tiveram aumento significativo dos níveis proteicos de PEPCK e G6Pase no fígado. Estes resultados estão de acordo com outros estudos que analisaram camundongos com severa resistência à insulina (10, 42). Apesar de não ter sido avaliada a produção hepática de glicose diretamente no presente estudo, em investigações anteriores, nosso grupo e também outros pesquisadores mostraram que a redução da expressão de PGC-1 α usando diferentes abordagens diminui a produção hepática de glicose (mensurada por meio de procedimento de clamp hiperinsulinêmico-euglicêmico), considerado padrão ouro neste tipo de análise (8, 15, 40, 43). A redução da expressão de genes gliconeogênicos observados nos animais obesos exercitados no presente estudo está de acordo com os resultados encontrados por Heled e colaboradores, os quais mostraram que o exercício físico melhora a sinalização da insulina no fígado e inibe a atividade da PEPCK em animais propensos ao diabetes *Psammomys obesus* (também conhecidos como ratos do deserto) (17).

De acordo com estes dados, o presente estudo mostrou que ocorreu um decréscimo na gliconeogênese induzida por piruvato nos camundongos obesos exercitados quando comparados com os obesos sedentários no teste de tolerância ao piruvato (TTP). E que os resultados obtidos no TTP não diferiram entre os grupos de animais obesos exercitados, obesos tratados com antisense MKP-3 e obesos exercitados e tratados com antisense MKP-3 concomitantemente.

A luz desses achados parece evidente que o exercício físico tem papel importante em inibir a gliconeogênese em animais obesos e diabéticos. É preciso reforçar que este estudo é pioneiro em demonstrar que o exercício físico é capaz de

diminuir a expressão da proteína MKP-3 e consequentemente reduzir a produção hepática de glicose de camundongos obesos induzidos por dieta hiperlipídica. Além do mais, nossos achados sugerem que a redução na expressão da MKP-3 pode estar relacionada ao efeito do exercício em suprimir a atividade da ERK.

A MAPK ou MAP quinase (proteína quinase ativada por mitógeno) é uma subfamília de proteínas-quinase específicas de serina/treonina que respondem a estímulos extracelulares (mitógenos) e regulam várias atividades celulares, como expressão gênica, mitose, diferenciação, sobrevivência celular e apoptose (morte celular) (44). A ativação da via de sinalização da MAPK é um mecanismo conhecido que pode induzir resistência à insulina através da fosforilação em serina 307 do substrato do receptor de insulina. Estudos prévios realizados por nosso grupo de pesquisa mostrou que animais obesos têm aumento na fosforilação das proteínas ERK1/2 e isso pode contribuir com a indução de resistência à insulina em tecidos periféricos (29). Tanto ERK-1 quanto ERK-2 fazem parte da subfamília das MAPK. A MKP-3 tem função específica de inativar ERK e, por sua vez, ERK causa a ativação de MKP-3. Foi observado em experimentos prévios que a interação entre ERK e MKP-3 ocorre fisicamente, permitindo uma regulação cruzada e recíproca da atividade destas proteínas.

Em nosso estudo, observou-se que os níveis de fosforilação da ERK foram maiores nos animais obesos se comparado aos animais controles. Em contrapartida, o exercício físico reduziu significativamente a fosforilação da ERK e isso foi acompanhado por redução da expressão da MKP-3 e associação FoxO1/MKP-3 no fígado dos camundongos obesos. Diferentemente, estudos prévios na literatura tem observado aumento na atividade da MAPK durante exercício agudo exaustivo (45, 46), sendo que o protocolo de exercício pode ter contribuído para tais diferenças. Além disso, estudo prévio mostrou que o aumento da fosforilação da MAPK induzida pelo exercício diminuiu rapidamente ao seu término e completamente retornou aos níveis de repouso após 60 minutos da sessão de esforço (47). Oliveira e colaboradores verificaram redução significativa na expressão de ERK no fígado de ratos Wistar obesos com um protocolo de exercício de natação equivalente ao utilizado no presente estudo (29). O

declínio na fosforilação de ERK foi observado 24 e 36 horas após a última sessão de treinamento físico que teve duração de oito semanas.

Entretanto, as proteínas ERKs parecem não serem as únicas reguladoras da MKP-3. A proteína quinase CK2 (formalmente conhecida como caseína quinase 2), tem sido indicada como uma quinase de papel crucial no crescimento e proliferação celular. Em adição, diversos achados suportam o papel da CK2 na sobrevivência celular (44). Estudo prévio demonstrou direta interação de CK2 com MKP3 (44), sendo que a subunidade α da CK2 parece influenciar não somente a fosforilação, mas também, a atividade enzimática da MKP-3. A interação entre CK2 e MKP-3 ocorre fisicamente no citosol da célula induzindo o aumento da fosforilação da MKP-3 (44). Esta interação de CK2 é potencializada na presença de ERK-2 que aumenta a atividade fosfatase da MKP-3 (44). Em nosso estudo, não avaliamos a expressão da proteína CK2 que pode sofrer modulação tanto da dieta hiperlipídica quanto do exercício físico e com isso influenciar na atividade fosfatase da MKP-3.

Tais resultados mostram que o treinamento físico tem efeito inibitório sobre ERK que sabidamente tem efeito em estimular a atividade da MKP-3 e com isso prejudicar a fosforilação de FoxO1 no fígado, resultando em gliconeogênese acentuada e hiperglicemia.

5- CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

Em conclusão, os resultados deste estudo demonstraram que o treinamento físico induziu marcadamente uma diminuição da expressão da proteica MKP-3 e da associação entre FoxO1 e MKP-3 em fígado de camundongos obesos induzidos por dieta hiperlipídica. Em Adição, observa-se nos animais exercitados redução nos níveis proteicos de PGC-1 α e HNF-4 α , que foi acompanhado por níveis diminuídos das enzimas gliconeogênicas PEPCK e G6Pase no fígado. Estes resultados a nível molecular foram acompanhados por alterações fisiológicas incluindo aumento da sensibilidade à insulina, menor produção hepática de glicose e redução da hiperglicemia nos camundongos obesos, independentemente da redução da massa corporal total. Não foram encontrados feitos aditivos nos parâmetros fisiológicos e moleculares investigados nos animais obesos através do tratamento com oligonucleotídeo antisense MKP-3 e treinamento físico concomitante. Por fim, os efeitos supressivos do treinamento físico sobre a proteína MKP-3 parecem estar relacionados, no mínimo em parte, a diminuição na fosforilação das ERKs no fígado de camundongos obesos.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS

1. Hossain P, Kavar B, El Nahas M. Obesity and diabetes in the developing world--a growing challenge. *N Engl J Med*. 356: 213-215, 2007.
2. Pilkis SJ, Granner DK. Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu Rev Physiol*. 54:885–909, 1992.
3. Vidal-Puig A, O'Rahilly S. Metabolism. Controlling the glucose factory. *Nature*. 413: 125–126, 2001.
4. Sutherland C, O'Brien RM, Granner DK. Phosphatidylinositol 3-kinase, but not p70/p85 ribosomal S6 protein kinase, is required for the regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) gene expression by insulin. Dissociation of signaling pathways for insulin and phorbol ester regulation of PEPCK gene expression. *J Biol Chem*. 270: 15501–15506, 1995.
5. Liao J, Barthel A, Nakatani K, Roth RA. Activation of protein kinase B/Akt is sufficient to repress the glucocorticoid and cAMP induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *J Biol Chem*. 273: 27320–27324, 1998.
6. Schmoll D, Walker KS, Alessi DR, Grempler R, Burchell A, Guo S, Walther R, Unterman TG. Regulation of glucose-6-phosphatase gene expression by protein kinase B α and the forkhead transcription factor FKHR. Evidence for insulin response unit-dependent and -independent effects of insulin on promoter activity. *J Biol Chem*. 275: 36324–36333, 2000.
7. Wolfrum C, Asilmaz E, Luca E, Friedman JM, Stoffel M. Foxa2 regulates lipid metabolism and ketogenesis in the liver during fasting and in diabetes. *Nature*. 432: 1027–1032, 2004.
8. Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Walkey CJ, Yoon JC, Oriente F, Kitamura Y, Altomonte J, Dong H, Accili D, Spiegelman BM. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1 α interaction. *Nature*. 423: 550–555, 2003.
9. Daitoku H, Yamagata K, Matsuzaki H, Hatta M, Fukamizu A. Regulation of PGC-1 promoter activity by protein kinase B and the forkhead transcription factor FKHR. *Diabetes*. 52: 642–649, 2003.

10. Xu H, Yang Q, Shen M, Huang X, Dembski M, Gimeno R, Tartaglia LA, Kapeller R, Wu Z. Dual specificity MAPK phosphatase 3 activates PEPCK gene transcription and increases gluconeogenesis in rat hepatoma cells. *J Biol Chem.* 280: 36013–36018, 2005.
11. Wu Z, Jiao P, Huang X, Feng B, Feng Y, Yang S, Hwang P, Du J, Nie Y, Xiao G, Xu H. MAPK phosphatase-3 promotes hepatic gluconeogenesis through dephosphorylation of forkhead box O1 in mice. *J Clin Invest.* 120: 3901-3911, 2010.
12. Camps M, Chabert C, Muda M, Boschert U, Gillieron C, Arkinstall S. Induction of the mitogen-activated protein kinase phosphatase MKP3 by nerve growth factor in differentiating PC12. (*FEBS Lett.* 425: 271-6, 1998.
13. Jurek A, Amagasaki K, Gembarska A, Heldin CH, Lennartsson J. Negative and positive regulation of MAPK phosphatase 3 controls platelet-derived growth factor-induced Erk activation. *The Journal of Biological Chemistry (J Biol Chem).* 284: 4626-34, 2009.
14. da Luz G, Frederico MJ, da Silva S, Vitto MF, Cesconetto PA, de Pinho RA, Pauli JR, Silva AS, Cintra DE, Ropelle ER, De Souza CT. Endurance exercise training ameliorates insulin resistance and reticulum stress in adipose and hepatic tissue in obese rats. *Eur J Appl Physiol.* 111: 2015-23, 2011.
15. De Souza CT, Frederico MJ, da Luz G, Cintra DE, Ropelle ER, Pauli JR, Velloso LA. Acute exercise reduces hepatic glucose production through inhibition of the Foxo1/HNF-4alpha pathway in insulin resistant mice. *J Physiol.* 588: 2239-53, 2010.
16. Marinho R, Ropelle ER, Cintra DE, De Souza CT, Da Silva AS, Bertoli FC, Colantonio E, D'Almeida V, Pauli JR. Endurance exercise training increases APPL1 expression and improves insulin signaling in the hepatic tissue of diet-induced obese mice, independently of weight loss. *J Cell Physiol.* 2917-26, 2012.
17. Heled Y, Shapiro Y, Shani Y, Moran DS, Langzam L, Barash V, Sampson SR, Meyerovitch J. Physical exercise enhances hepatic insulin signaling and inhibits phosphoenolpyruvate carboxykinase activity in diabetes-prone Psammomys obesus. *Metabolism.* 53: 836-41, 2004.
18. Heron-Milhavet L, Khouya N, Fernandez A, Lamb NJ. Akt1 and Akt2: differentiating the aktion. *Histol Histopathol.* 26: 651-662, 2011.
19. Gonzalez E, McGraw TE. The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer. *Cell Cycle.* 8: 2502-2508, 2009.

20. Dummmler B, Tschopp O, Hynx D, Yang ZZ, Dirnhofer S, Hemmings BA. Life with a single isoform of Akt: mice lacking Akt2 and Akt3 are viable but display impaired glucose homeostasis and growth deficiencies. *Mol Cell Biol.* 26: 8042-8051, 2006.
21. Bae SS, Cho H, Mu J, Birnbaum MJ. Isoform-specific regulation of insulin-dependent glucose uptake by Akt/protein kinase B. *J Biol Chem.* 278: 49530-49536, 2003.
22. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell.* 96: 857-868, 1999.
23. Barthel A, Schmoll D, Krüger KD, Bahrenberg G, Walther R, Roth RA, Joost HG. Differential regulation of endogenous glucose-6-phosphatase and phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression by the forkhead transcription factor FKHR in H4IIE-hepatoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 285: 897-902, 2001.
24. Hall RK, Yamasaki T, Kucera T, Waltner-Law M, O'Brien R, Granner DK. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase and insulin-like growth factor-binding protein-1 gene expression by insulin. The role of winged helix/forkhead proteins. *J Biol Chem.* 275: 30169-30175, 2000.
25. Nakae J, Kitamura T, Silver DL, Accili D. The forkhead transcription factor Foxo1 (Fkhr) confers insulin sensitivity onto glucose-6-phosphatase expression. *J Clin Invest.* 108: 1359-1367, 2001.
26. Hirota K, Sakamaki J, Ishida J, Shimamoto Y, Nishihara S, Kodama N, Ohta K, Yamamoto M, Tanimoto K, Fukamizu A. A combination of HNF-4 and Foxo1 is required for reciprocal transcriptional regulation of glucokinase and glucose-6-phosphatase genes in response to fasting and feeding. *J Biol Chem.* 283: 32432-32441, 2008.
27. Rhee J, Inoue Y, Yoon JC, Puigserver P, Fan M, Gonzalez FJ, Spiegelman BM. Regulation of hepatic fasting response by PPARgamma coactivator-1alpha (PGC-1): requirement for hepatocyte nuclear factor 4alpha in gluconeogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100: 4012-7, 2003.
28. Rognstad R. Glucose-6-phosphatase flux and the hepatic glucose balance model. *Am J Physiol.* 271: E1125-E1127, 1996.

29. Oliveira AG, Carvalho BM, Tobar N, Ropelle ER, Pauli JR, Bagarolli RA, Guadagnini D, Carvalheira JB, Saad MJ. Physical exercise reduces circulating lipopolysaccharide and TLR4 activation and improves insulin signaling in tissues of DIO rats. *Diabetes*. 60: 784-96, 2011.
30. Pauli JR, Ropelle ER, Cintra DE, Carvalho-Filho MA, Moraes JC, De Souza CT, Velloso LA, Carvalheira JB, and Saad MJ. Acute physical exercise reverses S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1 and protein kinase B/Akt in diet-induced obese Wistar rats. *J Physiol*. 586: 659-671, 2008.
31. Luciano E, Carneiro EM, Carvalho CR, Carvalheira JB, Peres SB, Reis MA, Saad MJ, Boschero AC, Velloso LA. Endurance training improves responsiveness to insulin and modulates insulin signal transduction through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-1 pathway. *Eur J Endocrinol*. 147: 149-57, 2002.
32. Holloszy JO. Exercise-induced increase in muscle insulin sensitivity. *J Appl Physiol*. 99: 338-43, 2005.
33. Ryder JW, Fahlman R, Wallberg-Henriksson H, Alessi DR, Krook A, Zierath JR. Effect of contraction on mitogen-activated protein kinase signal transduction in skeletal muscle. Involvement Of the mitogen- and stress-activated protein kinase 1. *J Biol Chem*. 275: 1457-1462, 2000.
34. Ropelle ER, Pauli JR, Cintra DE, Frederico MJ, de Pinho RA, Velloso LA, De Souza CT. Acute exercise modulates the Foxo1/PGC-1alpha pathway in the liver of diet-induced obesity rats. *J Physiol*. 587: 2069-2076, 2009.
35. Saltiel AR. New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. *Cell*. 104: 517-529, 2001.
36. Barthel A, Schmolli D. Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 285: E685-692, 2003.
37. Michael MD, Kulkarni RN, Postic C, Previs SF, Shulman GI, Magnuson MA, Kahn CR. Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. *Mol Cell*. 6: 87-97, 2000.
38. Fisher SJ, Kahn CR. Insulin signaling is required for insulin's direct and indirect action on hepatic glucose production. *J Clin Invest*. 111: 463-468, 2003.

39. Cheng KK, Iglesias MA, Lam KS, Wang Y, Sweeney G, Zhu W, Vanhoutte PM, Kraegen EW, Xu A. APPL1 potentiates insulin-mediated inhibition of hepatic glucose production and alleviates diabetes via Akt activation in mice. *Cell Metab.* 9: 417-427, 2009.
40. Yoon JC, Puigserver P, Chen G, Donovan J, Wu Z, Rhee J, Adelmant G, Stafford J, Kahn CR, Granner DK, Newgard CB, Spiegelman BM. Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature.* 413: 131-138, 2001.
41. Lin J, Tarr PT, Yang R, Rhee J, Puigserver P, Newgard CB, Spiegelman BM. PGC-1 β in the regulation of hepatic glucose and energy metabolism. *J Biol Chem.* 278: 30843-30848, 2003.
42. Lima AF, Ropelle ER, Pauli JR, Cintra DE, Frederico MJ, Pinho RA, Velloso LA, De Souza CT. Acute exercise reduces insulin resistance-induced TRB3 expression and amelioration of the hepatic production of glucose in the liver of diabetic mice. *J Cell Physiol.* 221: 92-97, 2009.
43. Herzig S, Long F, Jhala US, Hedrick S, Quinn R, Bauer A, Rudolph D, Schutz G, Yoon C, Puigserver P, Spiegelman B, Montminy M. CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature.* 413: 179-83, 2001.
44. Castelli M, Camps M, Gillieron C, Leroy D, Arkinstall S, Rommel C, Nichols A. MAP kinase phosphatase 3 (MKP3) interacts with and is phosphorylated by protein kinase CK2 α . *J Biol Chem.* 279: 44731-44739, 2004.
45. Ryder JW, Fahlman R, Wallberg-Henriksson H, Alessi DR, Krook A, Zierath JR. Effect of contraction on mitogen-activated protein kinase signal transduction in skeletal muscle. Involvement Of the mitogen- and stress-activated protein kinase 1. *J Biol Chem.* 275: 1457-1462, 2000.
46. Chambers MA, Moylan JS, Smith JD, Goodyear LJ, Reid MB. Stretch-stimulated glucose uptake in skeletal muscle is mediated by reactive oxygen species and p38 MAP-kinase. *J Physiol.* 587: 3363-3373, 2009.
47. Widegren U, Jiang XJ, Krook A, Chibalin AV, Björnholm M, Tally M, Roth RA, Henriksson J, Wallberg-henriksson H, Zierath JR. Divergent effects of exercise on metabolic and mitogenic signaling pathways in human skeletal muscle. *FASEB J.* 12: 1379-89, 1998

7- ANEXOS



Prot. 98/2012



CEUA/Unicamp

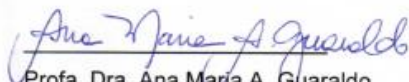
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

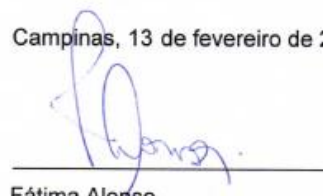
CERTIFICADO,

Certificamos que o projeto "Efeitos do exercício físico sobre a associação MKP-3/FoxO1 em tecido hepático de camundongos obesos e diabéticos" (protocolo nº 2599-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Eduardo Rochete Ropelle / Luciana Santos Souza Pauli, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 13 de fevereiro de 2012.

Campinas, 13 de fevereiro de 2012.


Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva