



Bruna Bombassaro

*“Regulação Diferencial da Deubiquitinase A20
em Tecido Adiposo de Obesos – Potencial
Envolvimento na Regulação da PGC1 α ”*

Campinas

2013



Universidade Estadual de Campinas

Faculdade de Ciências Médicas

Bruna Bombassaro

***“Regulação Diferencial da Deubiquitinase A20 em
Tecido Adiposo de Obesos – Potencial
Envolvimento na Regulação da PGC1 α ”***

Orientador: Prof. Dr. Licio Augusto Velloso

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Em Fisiopatologia Médica
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção de
Título de Mestra em Ciências.

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A VERSÃO FINAL DA
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DEFENDIDA PELA ALUNA
BRUNA BOMBASSARO E ORIENTADA
PELO PROF LICIO AUGUSTO VELLOSO**

ASSINATURA DO ORIENTADOR

Campinas

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

B639r Bombassaro, Bruna, 1989-
Regulação diferencial da deubiquitinase A20 em
tecido adiposo de obesos : potencial envolvimento na
regulação da PGC1 α / Bruna Bombassaro. -- Campinas,
SP : [s.n.], 2013.

Orientador : Licio Augusto Velloso.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Obesidade. 2. Ubiquitinas. 3. Inflamação. 4.
Tecido adiposo. 5. Proteína A20. I. Velloso, Licio
Augusto, 1963-. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: A20 deubiquitinase controls PGC-1 α expression in the adipose tissue.

Palavras-chave em Inglês:

Obesity

Ubiquitins

Inflammation

Adipose tissue

A20 protein

Área de concentração: Fisiopatologia Médica

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Licio Augusto Velloso [Orientador]

Silvana Auxiliadora Bordin da Silva

Marcio Alberto Torsoni

Data da defesa: 22-04-2013

Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

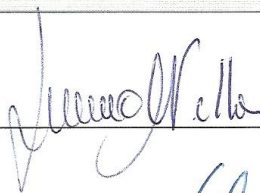
BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

BRUNA BOMBASSARO

Orientador (a) PROF(A). DR(A). LICIO AUGUSTO VELLOSO

MEMBROS:

1. PROF(A). DR(A). LICIO AUGUSTO VELLOSO



2. PROF(A). DR(A). SILVANA AUXILIADORA BORDIN DA SILVA



3. PROF(A). DR(A). MARCIO ALBERTO TORSONI



Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 22 de abril de 2013

À Letícia Souza, com quem tive a sorte de dividir o trabalho, a amizade, momentos bons e ruins; cujo companheirismo me fez crescer como pessoa; cuja distância não nos separa, apenas fortalece.

“A amizade desenvolve a felicidade e reduz o sofrimento, duplicando a nossa alegria e dividindo a nossa dor.”

Joseph Addison

Dedico

AGRADECIMENTOS

A todos aqueles que fazem parte da minha vida, eu agradeço muito a...

Meus pais, Regina e Lucas, pelos ensinamentos de valores e caráter, pelo apoio e por estarem ao meu lado em minhas decisões; por escutarem sobre meu trabalho sem entender nada, mas achando super interessante;

Meu namorado, Christiano, pelo amor em todos esses anos, paciência e companhia que foram mais que fundamentais; pelo carinho e compreensão em todos os momentos e por tornar minha vida mais feliz;

Minha irmã, Paola, meu cunhado, Fábio e minha avó, Joanna, pelo carinho que me fortalece e pela curiosidade que me fazem ir mais longe;

Minha sobrinha, Lívia, que ainda tão pequena, já ilumina minha vida;

Professor Lício Velloso, que gentilmente aceitou dividir comigo seus conhecimentos e de forma excepcional me fez crescer como profissional, me permitindo caminhar com minhas próprias pernas.

Letícia Souza, cujos conhecimentos e amizade me fizeram ser quem eu sou hoje. A paciência de me ensinar e as risadas dentro e fora do laboratório tornaram esses os melhores anos da minha vida;

Andressa Coope e Daniela Razolli, pelos horários dos experimentos, por toda paciência nas explicações e pela amizade;

Carla Nuñez e Rafael Pedro pelas madrugadas nas cirurgias e coletas no hospital;

Erika Anne, que com muito carinho, me acolheu no laboratório e me ensinou tudo; obrigada pela amizade, o apoio e as risadas;

Gerson Ferraz, pela amizade e pela família, Fernanda, Luísa e Carol, que roubei e tornei parte da minha;

Amigos Letícia Souza, Andressa Coope, Daniela Razzolli, Christiano Oliveira, Erika Anne, Nathalia Dragano, Carina Solon, Lucas Nascimento, Mariana Portovedo, Rafaela Benatti, Arine Mello, Livia Bittencourt, Thiago Matos, Juliana Faria, Lucas Hering, Andrezza Kinote, Carolina Solon, Albina Garcia, Gabriela Souza, Ariadne Gomes, Gerson Ferraz, Marciane Milanski, Hamilton Ferreira

pelas discussões que me ensinaram, pelas gargalhadas, cantorias, cervejas, por tornarem meus dias muito mais alegres;

Labsinzel, pelos amigos, professores e espaço cedido por 3 anos de muito aprendizado;

Professores Marciane Milanski, Marcio Alberto Torsoni, Adriana Torsoni e Eliana Araújo pelos ensinamentos e pelo carinho;

Márcio Cruz, pela paciência e cuidado excepcional com os animais;

Meus voluntários. Àqueles que mesmo em um momento de ansiedade e nervosismo aceitaram contribuir para a minha pesquisa; àqueles que mesmo sem precisar, aceitaram uma cicatriz pela ciência e pela amizade;

Mara Guaragna, que nesse percurso, se tornou amiga também;

Médicos e residentes do Ambulatório de Gastrocirurgia e Cirurgia Plástica do Hospital das Clínicas da UNICAMP por me permitirem participar das cirurgias, coletando valiosos tecidos;

UNICAMP, pela formação como Bióloga e como Mestre; pelos amigos, conhecimentos e oportunidades sem os quais não teria chegado até aqui; à FCM pela oportunidade de desenvolver meu mestrado;

Animais de experimentação, que sem saber, acrescentam diariamente valores inestimáveis à ciência;

Agência FAPESP, pelo apoio financeiro sem o qual essa dissertação não seria possível.

RESUMO

BOMBASSARO, B. **Regulação Diferencial da Deubiquitinase A20 em Tecido Adiposo de Obesos – Potencial Envolvimento na Regulação da PGC1 α** . 2013. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2013.

A proteína PGC1 α é um co-ativador de transcrição gênica que desempenha papel importante na regulação de uma série de fenômenos metabólicos que compreendem desde o controle da termogênese e mitocôndriogênese até a regulação da secreção de insulina e a produção hepática de glicose. Como vários dos fenômenos biológicos controlados direta ou indiretamente pela PGC1 α tem importância vital, a regulação dos níveis de PGC1 α nos tecidos deve ser finamente ajustada. Nos últimos anos, inúmeros estudos exploraram os mecanismos envolvidos com o controle da expressão gênica e tradução da PGC1 α . Entretanto, apenas alguns poucos estudos avaliaram a degradação da mesma. Um dos mais importantes mecanismos envolvidos com a regulação funcional e da meia-vida de proteínas é a ubiquitinação, que pode direcionar proteínas alvo ao proteossoma para degradação ou a outras modificações pós-traducionais. O objetivo do presente estudo foi avaliar a participação de uma proteína com atividade deubiquitinase e ubiquitina ligase, a A20, na manutenção da homeostase do tecido adiposo de animais submetidos à dieta rica em gordura e voluntários humanos magros e obesos antes e após cirurgia de redução de peso. Foram utilizados o tecido adiposo branco visceral e subcutâneo e o tecido adiposo marrom de camundongos Swiss machos submetidos a 16 semanas de dieta hiperlipídica e o tecido adiposo subcutâneo de voluntários magros e obesos antes e após a cirurgia bariátrica. Esses tecidos foram avaliados quanto ao conteúdo proteico e expressão gênica da proteína A20, e sua associação com a PGC1 α por imunoprecipitação e imunofluorescência, bem como a ubiquitinação desta última. Os resultados obtidos a partir do tecido adiposo de humanos mostram uma diminuição na expressão da proteína A20 nos pacientes antes e após a cirurgia bariátrica com relação aos voluntários magros. A PGC1 α aparece mais ubiquitinada nos pacientes obesos em relação e a associação entre A20 e PGC1 α parece aumentar com o ganho de peso na mesma proporção que o conteúdo proteico de PGC1 α parece diminuir. No tecido adiposo subcutâneo de camundongos obesos, observamos uma diminuição de PGC1 α bem como redução da marcação por cadeias de poliubiquitina desta proteína, associado a um

aumento de A20 e aumento da associação de A20 com PGC1 α . Camundongos obesos foram também tratados com um oligonucleotídeo antisense (ASO) para A20, resultando na redução de sua expressão gênica. Os animais tratados apresentaram uma piora na tolerância à glicose no teste de GTT o que ocorreu concomitantemente a redução de PGC1 α . Nossos resultados indicam que, no tecido adiposo, a A20 se associa a PGC1 α e a redução da sua expressão resulta em redução da expressão da PGC1 α o que é acompanhando de uma piora no controle homeostático da glicose.

Palavras-chave: obesidade, ubiquitina, inflamação, tecido adiposo, A20

ABSTRACT

BOMBASSARO, B. **A20 deubiquitinase controls PGC-1 α expression in the adipose tissue**. 2013. Dissertação (Mestrado) – Faculty of Medical Sciences, university of Campinas, São Paulo, 2013.

Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α (PGC-1 α) plays an important role in whole body metabolism and, particularly in glucose homeostasis. Its expression is tightly regulated and, small variations in tissue levels can have a major impact in a number of physiological and pathological conditions. Recent studies have shown that the ubiquitin/proteasome system plays a role in the control of PGC-1 α degradation. Here we evaluated the interaction of PGC-1 α with the protein A20, which plays a dual-role in the control of the ubiquitin/proteasome system acting as a deubiquitinase and as an E3 ligase. We employed immunoprecipitation, quantitative real-time PCR and immunofluorescence staining to evaluate PGC-1 α , A20, PPAR γ and ubiquitin in the adipose tissue of humans and mice. Our results show that, in distinct sites of the adipose tissue A20 binds to PGC-1 α . At least in the subcutaneous fat of humans and mice the levels of PGC-1 α decrease during obesity, while its physical association with A20 increases. The inhibition of A20 leads to a reduction of PGC-1 α and PPAR γ expression, suggesting that A20 acts as a protective factor against PGC-1 α disposal. Thus, we provide evidence that mechanisms regulating PGC-1 α ubiquitination are potentially involved in the control of the function of this transcriptional co-activator.

Key words: obesity, ubiquitin, inflammation, adipose tissue, A20

Lista de Abreviaturas

AgRP	Agouti-Related Protein (Proteína Relacionada a Agouti)
BAT	Brown Adipose Tissue (Tecido Adiposo Marrom)
cAMP	cyclic AMP (AMP cíclico)
CART	Cocaine and Amphetamine-Regulated Transcript (Transcrito regulado por Anfetamina e Cocaína)
CCK	Colecistoquinina
CREB	cAMP Response Element-Binding protein (Proteína de Ligação em resposta ao cAMP)
DM2	Diabetes Mellitus 2
GLP1	Glucagon-like peptide-1 (Peptídeo semelhante a glucagon 1)
GLUT4	Glucose Transporter type 4 (Transportador de Glicose Tipo 4)
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1 (Molécula de Adesão Intercelular 1)
IGF1	Insulin-like Growth Factor 1 (Fator de Crescimento semelhante a Insulina 1)
IKK	I κ B Kinase (Kinase do I κ B)
IL1β	Interleucina 1 β
IL6	Interleucina 6
IMC	Índice de Massa Corpórea
IRS1	Insulin Receptor Substrate 1 (Substrato do Receptor de Insulina 1)
JNK	c-Jun N-terminal Kinase (Kinase do c-Jun N-terminal)
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinases (Kinase da Proteína ativada por Mitógeno)
MCP1	Monocyte Chemoattractant Protein-1 (Proteína Quimioatraente de Monócitos 1)
NPY	Neuropeptide Y (Neuropeptídeo Y)
NFκB	Nuclear Factor-KappaB (Fator Nuclear-kappaB)
PPARγ	Receptor γ ativado por Proliferador de Peroxissomo
POMC	Proopiomelanocortin (Proopiomelanocortina)
PKC	Protein Kinase C (Proteína Kinase C)

PGC1α	Coativador 1 α do Receptor γ ativado por Proliferador de Peroxissomo
RIP1	Receptor-Interacting Protein 1 (Proteína 1 de Interação com o Receptor)
SOCS3	Suppression of Cytokine Signaling 3 (Supressão da Sinalização de Citocina 3)
Th1	Linfócitos T helper 1
Th2	Linfócitos T helper 2
TNFα	Tumor Necrose Factor α (Fator de Necrose Tumoral α)
TRAF6	TNF Receptor Associated Factor 6 (Fator 6 Associado ao Receptor de TNF)
Treg	Linfócitos T Regulatórios
WHO	World Health Organization (Organização Mundial da Saúde)
TZDs	Thiazolidinediones (Tiazolidinedionas)
UCP1	Uncoupling Protein1 (Proteína Desaclopadora 1)
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Protein 1 (Proteína 1 de Adesão de Célula Vascular)

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	16
OBJETIVOS	30
Objetivo Geral	30
Objetivos Específicos	30
MATERIAL E MÉTODOS	31
ARTIGO REFERENTE À DISSERTAÇÃO	36
Material e Methods	40
Results	43
Discussion	45
References	49
Figures	56
REFERÊNCIAS	60
APÊNDICE	66

INTRODUÇÃO

Ao longo da história, mudanças sociais e econômicas sempre constituíram-se em fatores que desempenharam papel importante modificando drasticamente os hábitos de vida da população. Na primeira metade do século XX, a mecanização, a urbanização e a mudança dos hábitos alimentares contribuíram consideravelmente para que ocorresse um aumento do número de pessoas com sobrepeso e obesas na população (Swinburn, Sacks et al. 2011). Aliado também a novas formas de trabalho, essas mudanças levaram ao aumento da adiposidade e transformaram a obesidade no fator de risco mais importante para uma série de doenças comumente associadas a ela (Wing 2008, Kearney 2010).

Esse novo padrão de peso corporal vem atingindo proporções alarmantes em todo o mundo. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (2012), mais da metade (65%) da população mundial vive em países nos quais o sobrepeso e a obesidade matam mais do que a desnutrição (WHO 2012). Em países desenvolvidos, como os Estados Unidos, os números da obesidade não são recentes. A grande epidemia norte-americana de obesidade iniciou-se há 40 anos, dobrando o número de obesos entre 1980 e 2010 (Flegal, Carroll et al. 2012). Uma pesquisa feita pelo Ministério da Saúde em 2011 (Saúde 2012) mostra que, no Brasil, a obesidade cresceu mais acentuadamente nos últimos seis anos. De lá para cá, a população com excesso de peso ($IMC > 25 \text{ kg/m}^2$) passou de 42,7% para 48,5% e os obesos ($IMC > 30 \text{ kg/m}^2$), que representavam 11,4% da população, hoje representam 15,8%. Os homens com sobrepeso representavam 42,2%, o que hoje já subiu para 52,6%. Já entre as mulheres, a prevalência de sobrepeso subiu de 38,5% para 44,7%. Na China, somente entre 1991 e 2006, o número de obesos na população triplicou e o de indivíduos com sobrepeso duplicou (Lu and Goldman 2010), enquanto que na África do Sul, não é mais a desnutrição que assusta, mas sim, a obesidade, que chega a

atingir um terço da população feminina e 10% entre os homens (Puoane, Steyn et al. 2002). Esses dados evidenciam que a obesidade atingiu status de epidemia, acometendo países sem distinção de renda ou desenvolvimento.

Esse crescimento carrega consigo o aumento de doenças associadas ao ganho de peso, principalmente o diabetes mellitus do tipo 2 (DM2), hipertensão, doenças cardiovasculares e até alguns tipos de câncer parecem estar relacionados (Danaei, Ding et al. 2009). Essas comorbidades elevam consideravelmente o gasto com recursos médicos. A título de exemplo, em 2007, os Estados Unidos gastaram U\$113 bilhões de dólares com despesas médicas relacionados ao DM2 e suas seqüelas (Huang, Basu et al. 2009) e uma previsão de U\$147 bilhões com doenças associadas a obesidade (Finkelstein, Trogdon et al. 2009).

Para entendermos como a obesidade e uma dieta rica em lipídeos estão relacionadas ao seu impacto em distúrbios metabólicos, é necessário esclarecer primeiramente como funciona o controle da fome e do gasto energético, e qual o papel dos sensores de nutrientes nesse contexto. Dessa forma não podemos deixar de lado o papel do hipotálamo, grande centro regulador do metabolismo.

A atividade neural que controla o equilíbrio entre a ingestão alimentar e o gasto calórico é exercida, em parte, por grupos especializados de neurônios encontrados no hipotálamo (Morton, Cummings et al. 2006). Tais células respondem a estímulos oriundos da periferia que informam a respeito do estado nutricional e das reservas energéticas do corpo. Hormônios, como a leptina e a insulina, tem papel fundamental no controle da adiposidade enquanto hormônios produzidos por células do trato digestório como GLP1, CCK, grelina e somatostatina, participam do controle imediato da saciedade (Niswender, Baskin et al. 2004, Munzberg and Myers 2005). O papel do hipotálamo no controle dos

estoques de energia e no metabolismo fica evidente quando lesões nesse órgão levam tanto a hiperfagia e obesidade, se a região lesada é o hipotálamo ventromedial; quanto à hipofagia, perda de peso e até mesmo morte por inanição, quando lesada a região lateral (Hetherington and Ranson 1940, Anand and Brobeck 1951). Os principais grupos de neurônios responsáveis por essa homeostase energética central são NPY e AgRP, responsáveis por sinais orexigênicos, estimulados quando as concentrações plasmáticas de insulina e leptina são baixas, ou seja, no jejum, e os neurônios anorexigênicos POMC e CART, com maior atividade após as refeições e realizando ações antagônicas aos neurônios orexigênicos (Niswender, Baskin et al. 2004). São esses neurônios os responsáveis por detectar sinais periféricos e gerar as primeiras respostas para adequar o metabolismo energético (Velloso, Araujo et al. 2008).

Após uma breve descrição sobre o controle metabólico pelo hipotálamo, torna-se necessário compreender a relação entre ganho de peso e a interrupção do sinal da insulina, levando à sua resistência sistêmica. Esse evento decorre de sinais inflamatórios desencadeados pelo consumo de dietas hiperlipídicas atuando sobre um *background* genético permissivo (Hotamisligil 2006).

Os ácidos graxos saturados são os principais responsáveis por esse desbalanço metabólico e o desenvolvimento do quadro inflamatório observado em paralelo ao aumento da adiposidade. Sua ação não se deve somente ao acúmulo de gordura como também à ativação de vias que levam à produção de citocinas inflamatórias, como a via do NFκB, PKC e MAPK e citocinas como TNFα, IL-1β, IL-6 (Ajuwon and Spurlock 2005). Estas, por sua vez, levam a alterações nas vias metabólicas dos hormônios leptina e insulina desencadeando a inibição funcional das cascatas de sinalização destes hormônios com subsequente perda das funções anorexigênicas e termogênicas, quando

atuando no hipotálamo, ou distúrbios do metabolismo de carboidratos, quando atuando sistemicamente. A ação destas citocinas sobre a resistência à leptina e insulina fica clara quando se observa que tanto uma dieta hiperlipídica quanto o tratamento com TNF α por si só levam a ativação das serina-quinases IKK e JNK, que fosforilam o substrato do receptor de insulina, IRS1, em resíduos de serina, levando à sua inibição (De Souza, Araujo et al. 2005). Essas citocinas levam também ao aumento da expressão de proteínas SOCS3, que atuam tanto sobre o receptor de leptina, se ligando ao seu sítio ativo e impedindo sua ação (Pirola, Johnston et al. 2004) quanto por meio de sua atividade de ubiquitina-ligase, levando o IRS1 à degradação pelo proteassoma (Bhoj and Chen 2009).

Além do hipotálamo, o tecido adiposo desempenha função crucial no controle geral da massa corporal e das funções metabólicas. A idéia de ser apenas um órgão de reserva há muito já foi substituída pelo conhecimento de que ele apresenta papel central na homeostase da glicose e de lipídeos, além de sua atividade como órgão secretor de fatores endócrinos, parácrinos e autócrinos, que podem ter ação anti-inflamatória ou pró-inflamatória (Fonseca-Alaniz, Takada et al. 2006). A complexidade deste tecido compreende adipócitos, pré-adipócitos, macrófagos, células endoteliais, fibroblastos e leucócitos. Há quase 20 anos, pesquisadores identificaram uma superexpressão de TNF α no tecido adiposo de camundongos e humanos obesos (Hotamisligil, Shargill et al. 1993), evidenciando sua participação no desenvolvimento da inflamação. Logo depois, o papel do tecido adiposo como órgão endócrino e sua participação na obesidade ficaram ainda mais claros a partir da descoberta da leptina, em 1994, cujo efeito como sensor periférico controlando o metabolismo e a adiposidade trouxe maior atenção científica a relevância do tecido adiposo. Na inflamação que ocorre durante o ganho de peso, esse tecido desempenha papel importante como sítio de produção de inúmeras adipocinas como adiponectina, resistina, visfatina, apelin, e

vaspina, hepcidina, MCP1 e citocinas como TNF α , IL1 β e IL6, com ações anti- e pró-inflamatórias e produzidas por depósitos distintos de gordura (Juge-Aubry, Henrichot et al. 2005). A adiponectina, por exemplo, é um produto dos adipócitos cuja função é de homeostasia energética, aumentando a ação da insulina sobre o fígado e a oxidação de lipídios, possuindo ação anti-inflamatória através da redução da expressão de IL6 e do TNF α . Sua redução ocasionada, por exemplo, pela ingestão ou administração de ácidos graxos saturados, leva à resistência à insulina podendo levar ao desenvolvimento do diabetes tipo 2 (Xu, Barnes et al. 2003).

Em indivíduos magros, o tecido adiposo mostra pouca infiltração de macrófagos, altas concentrações de adiponectina e baixas de resistina, adipocinas anti- e pró-inflamatórias, respectivamente, apresentando assim maior responsividade à insulina. Em comparação, indivíduos obesos apresentam adipócitos maiores, maior número de células apoptóticas e maior infiltração de células do sistema imune. Acredita-se que o aumento de células necróticas recrute maior número de macrófagos e linfócitos exacerbando o quadro inflamatório local, favorecendo a perda da sensibilidade à insulina. Esses pacientes apresentam também aumento de leptina e resistina, adipocinas com ação pró-inflamatória, levando ao aumento de TNF α e IL6 (Wozniak, Gee et al. 2009).

O grau de inflamação do tecido adiposo se correlaciona positivamente com o desenvolvimento de diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares e esteatose hepática. Alguns indivíduos, no entanto, apresentam uma “obesidade metabolicamente benigna”, ou seja, apesar do excesso de peso eles não desenvolvem essas comorbidades. Acredita-se que esse evento possa ser explicado por diferenças no metabolismo do tecido e à infiltração de macrófagos, já que esses indivíduos não apresentam inflamação no tecido adiposo (Le, Mahurkar et al. 2011).

Num primeiro momento, somente células do sistema imune inato, como os macrófagos, foram identificadas no tecido adiposo durante a obesidade. Entretanto, estudos mais recentes demonstraram a presença e a participação importante de células da imunidade adaptativa, como linfócitos T e B, no processo inflamatório do tecido adiposo na obesidade (Nishimura, Manabe et al. 2009).

A comparação entre animais alimentados com dieta hiperlipídica e normolipídica revela características interessantes acerca das populações de linfócitos T encontradas no tecido adiposo. Dentre os linfócitos, o TCD8⁺ apresentou um aumento mais pronunciado durante o desenvolvimento da obesidade enquanto as células TCD4⁺ e T regulatórias (Treg) apresentaram redução. Em animais magros essas células são mais abundantes e exercem o efeito protetor através da inibição de macrófagos pró- inflamatórios, controlando assim o desenvolvimento da resistência à insulina. Essas informações se relacionam com estudos os quais demonstram que as células TCD8⁺ e Th1 parecem contribuir com o desenvolvimento da resistência à insulina enquanto T regulatórias e Th2 parecem conter o avanço desse desequilíbrio homeostático. O aumento das células TCD8⁺ no tecido adiposo parece ainda preceder o aumento de macrófagos durante a obesidade, reafirmando evidências previamente citadas de que os linfócitos T participam do recrutamento, ativação e ainda a diferenciação dos macrófagos no tecido adiposo. O balanço entre as subpopulações de linfócitos parece ser também um fator importante para a disfunção do tecido. As células Treg, por exemplo, tem um papel fundamental na auto-tolerância e na supressão de células T autorreativas, apresentando redução que acompanha o aumento de peso (Nishimura, Manabe et al. 2009). Assim, os desequilíbrios ocasionados pela obesidade no balanço de subpopulações de linfócitos T podem influenciar o recrutamento e ativação de macrófagos nesse tecido, podendo levar a um ambiente patogênico e inflamatório.

A característica do infiltrado inflamatório e a própria estrutura do tecido adiposo variam de acordo com o seu sítio anatômico. O tecido adiposo branco compreende dois sítios principais, o subcutâneo e o visceral, os quais desempenham funções distintas no controle do metabolismo. O depósito de gordura encontrado intraperitonealmente, ou visceral, está positivamente correlacionado a níveis maiores de glicose sanguínea, resistência à insulina, dislipidemia, hipertensão e esteatose hepática, tanto em homens como em mulheres (Marin, Andersson et al. 1992), e sua retirada (omentectomia) resulta na redução das taxas de glicose e insulina em humanos (Thorne, Lonnqvist et al. 2002), além de promover uma melhora no perfil lipídico em modelos animais, prolongando inclusive seu tempo de vida (Liszka, Dellon et al. 1998). Já o tecido adiposo subcutâneo, localizado periféricamente, como os presentes em pernas e glúteos, parece exercer função oposta, estando associado à melhora na sensibilidade à insulina (Snijder, Dekker et al. 2003) e sua remoção não acarreta melhoras nos parâmetros metabólicos (Klein, Fontana et al. 2004).

O perfil individual de cada um destes tecidos parece ser um reflexo de um metabolismo bastante distinto entre eles. Além de apresentarem células progenitoras diferentes, o tecido adiposo subcutâneo, por exemplo, apresenta menos receptores $\alpha 2$ adrenérgicos, o que leva a diminuição da lipólise em resposta à catecolaminas. Já o tecido adiposo visceral apresenta uma lipólise aumentada, evidenciada pelo aumento de ácidos graxos não esterificados que, através da íntima relação anatômica, alcançam a veia porta hepáticos, favorecendo a resistência à insulina (Guo, Hensrud et al. 1999, Lafontan 2008).

Outra diferença diz respeito às adipocinas liberadas em cada sítio anatômico do tecido adiposo branco. O tecido adiposo subcutâneo secreta em maior quantidade a

adipocina anti-inflamatória e sensibilizadora da ação da insulina, a adiponectina (Bluher, Williams et al. 2007), enquanto a reserva visceral apresenta abundância da adipocina resistina, positivamente relacionada ao diabetes tipo 2 (Steppan and Lazar 2002). Além da resistina, o tecido adiposo visceral apresenta outras evidências de uma influência mais expressiva sobre o quadro inflamatório por conter níveis elevados de células imunes, como linfócitos T e macrófagos e de citocinas pró-inflamatórias, como IL6, se comparados aos encontrados no subcutâneo (O'Rourke, Metcalf et al. 2009). O PPAR γ , fator de transcrição que regula positivamente a sinalização da insulina, também apresenta expressão diferencial, encontrado em maior quantidade no subcutâneo, garantindo que esse tecido responda melhor ao tratamento às TZDs, melhorando o quadro metabólico da resistência à insulina (Sewter, Blows et al. 2002).

Outro tipo de tecido adiposo cuja importância metabólica tem emergido nos últimos anos é o tecido adiposo marrom. Diferente dos depósitos de gordura branca, esse tecido recebe essa denominação devido à grande quantidade de mitocôndrias, o que lhe confere a coloração amarronzada. Além disso, seu acúmulo de lipídeos é organizado de forma multilocular, ao contrário da reserva unilocular dos demais. Ele apresenta ainda maior vascularização, inervação simpática e a expressão característica da proteína UCP1 (*Uncoupling Protein 1*) (Tran and Kahn 2010). Essas características tornam esse órgão importante na promoção da termogênese, ou seja, na dissipação de energia na forma de calor, e no controle do balanço energético. Prova de sua importância é demonstrada pela observação de que sua hipertrofia em camundongos promove gasto energético, reduz a adiposidade e protege esses animais da obesidade induzida por dieta (Ghorbani, Claus et al. 1997). Esse tecido é encontrado em roedores e em humanos, em menor proporção, principalmente na região interescapular ou ainda entre o tecido adiposo branco ou intramuscular (Almind, Manieri et al. 2007). Ainda, a quantidade desses depósitos pode

variar de acordo com idade, fatores genéticos, resposta ao ambiente, nutrição e drogas, como por exemplo a exposição ao frio ou o uso de agonistas de receptores β adrenérgicos (Cinti 2005, Cinti 2009).

Recentemente, as atenções se voltaram às propriedades do tecido adiposo marrom, principalmente com estudos que demonstram a capacidade de estimular essas características benéficas ao metabolismo em tecido adiposo branco. Conhecida como “browning”, essa capacidade representa uma promissora alternativa no tratamento da obesidade e da síndrome metabólica. Um dos fatores responsáveis pela diferenciação clássica do BAT é o PRDM16. Sua superexpressão em modelos animais aumenta a expressão de marcadores pró-termogênicos no tecido adiposo branco subcutâneo (Ohno, Shinoda et al. 2012), evidenciando mais uma vez o papel deste depósito de gordura branca no controle fino do metabolismo, uma vez que esse fator é naturalmente mais expresso neste tecido do que nos demais sítios de tecido adiposo branco (Seale, Conroe et al. 2011).

A observação da importância dos depósitos de gordura quer sejam brancos ou marrons, no metabolismo energético, tem se tornado cada vez mais clara. Como discutido previamente, pequenas alterações fenotípicas ou no caráter secretório do tecido adiposo representa prejuízos metabólicos importantes, não apenas neste órgão como em todos aqueles que recebem influência de seus fatores endócrinos. Dietas ricas em ácidos graxos são capazes de alterar a fisiologia do tecido adiposo e do organismo como um todo, que deve responder de forma a se adequar aos estímulos ambientes e nutricionais a que está sendo exposto. Essa adaptação, adequação aos sinais externos, deve ser feita de forma rápida e precisa, regulando respostas direcionadas e no tempo adequado.

Nesse sentido, o controle da transcrição gênica representa uma solução rápida e precisa para responder aos estímulos e regular assim o retorno à homeostase energética. A maquinaria celular deve, portanto atuar no momento e na localização cromossomal adequados, recrutar a RNA polimerase e fatores relacionados, para dar início à síntese de RNA. O controle da transcrição gênica é exercido principalmente através dos coativadores transcricionais. Essas proteínas ou complexos protéicos são capazes de aumentar a taxa de transcrição ao modificar a cromatina, recrutar a RNA polimerase, interagir com fatores transcricionais e retirar repressores (Puigserver and Spiegelman 2003). A regulação de coativadores permite, através de um único alvo, integrar diferentes respostas a sinais específicos através de múltiplos fatores transcricionais.

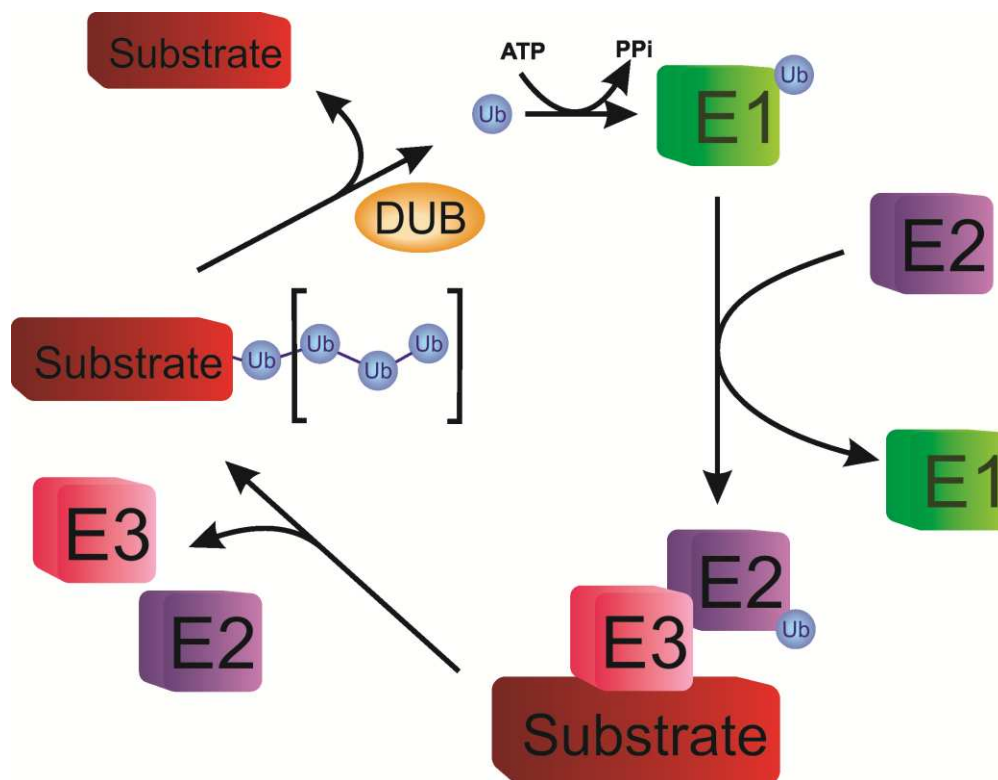
No que se refere ao metabolismo energético talvez um dos coativadores mais importantes seja o PGC1 α . Identificado em 1998 no BAT por desempenhar um papel importante como interruptor molecular do programa termogênico deste tecido, ele atua promovendo a oxidação de ácidos graxos, a mitocôndriogênese e a produção de calor por estimular a expressão de UCP1 (Puigserver, Wu et al. 1998). Por se ligar a diversos fatores de transcrição, o PGC1 α é capaz de ativar diversos programas biológicos em diferentes tecidos. No fígado, ele é ativado em períodos de jejum, estimulando a gliconeogênese, a β – oxidação de ácidos graxos e a secreção de corpos cetônicos (Yoon, Puigserver et al. 2001). No músculo esquelético, o aumento de PGC1 α é observado após exercício físico (Baar, Wende et al. 2002) e sua expressão estimula a expressão de GLUT4 e o metabolismo oxidativo (Michael, Wu et al. 2001). Apesar de seu papel bastante conhecido em diversos tecidos, principalmente no tecido adiposo marrom, seu papel no tecido adiposo branco ainda não está totalmente estabelecido. Sabe-se que um de seus fatores de transcrição alvo, o PPAR γ é necessário e suficiente para diferenciar pré-adipócitos em adipócitos brancos (Rosen, Sarraf et al. 1999). A diminuição

de PGC1 α está positivamente correlacionada à redução de IRS1, GLUT 4 e UCP1 no tecido adiposo branco (Hammarstedt, Jansson et al. 2003); indivíduos obesos apresentam conteúdo 3 vezes menor de PGC1 α no tecido adiposo subcutâneo (Sempé, Crowley et al. 2004) e animais nos quais esse coativador está ausente no tecido adiposo, apresentam maior sensibilidade à dietas hiperlipídicas, desenvolvendo precocemente resistência à insulina e aumento de ácidos graxos circulantes (Kleiner, Mepani et al. 2012).

Expresso em tecidos com altas demandas energéticas, o estímulo ou a degradação de PGC1 α deve ser rápido a fim de regular de forma fina a transcrição gênica. Esse coativador é estimulado principalmente por aumento de cAMP, através da proteína CREB (Herzig, Long et al. 2001). Sua estabilização e ativação são atingidas por sua fosforilação através da p38 MAPK (Puigserver, Rhee et al. 2001), mas sua degradação, no entanto, é pouco conhecida. Sano e colaboradores, em 2007, demonstraram que o PGC1 α é ubiquitinado e levado a degradação pelo sistema ubiquitina-proteassoma. Posteriormente outros grupos confirmaram a marcação por ubiquitina de PGC1 α para degradação (Tausch-Azar, Leone et al. 2010) bem como identificaram a enzima E3 ligase responsável por essa marcação para degradação (Wei, Pan et al. 2012).

O Sistema Ubiquitina Proteassoma (UPS) apresentam funções regulatórias muito importantes atuando sobre proteínas envolvidas em diversos processos celulares, controlando estabilidade, atividade e localização de proteínas alvo (Bhoj and Chen 2009). As modificações de proteínas da via de ubiquitinação têm impacto em inúmeras funções celulares. A progressão do ciclo celular, a biogênese de organelas e a apoptose são exemplos de processos regulados por ubiquitinação. Além disso, esse processo pode alterar a meia-vida de proteínas, sua atividade enzimática, localização celular ou mesmo as interações entre proteínas (Hershko and Ciechanover 1998, Pickart 2001). Esse

sistema é composto de 3 classes de enzimas, as E1, E2 e E3. As E1 são enzimas responsáveis pela ativação das ubiquitinas, através da adenilação da porção C-terminal dessas proteínas. A E1 também se associa à próxima enzima da cascata, a E2, que corresponde à enzima conjugadora. A E1 promove então a ligação da ubiquitina com a cisteína catalítica da E2 e esta permite a associação da ubiquitina com a E3. A E3 é uma enzima-ligase que apresenta dois domínios, um de interação proteína-proteína que recruta o substrato e o outro domínio é responsável pela ligação com a E2; diferentes E3s levam a distintas modificações da proteína alvo. As ubiquitinas se ligam, por meio de ligações covalentes, a resíduos de lisina das proteínas, levando as mesmas a degradação se ligadas ao resíduo Lys48 ou a outros mecanismos de regulação se ligadas à Lys63 (Chen 2005), Pickart 2001).



O UPS está ainda envolvido na regulação de várias vias sinalizatórias por meio de sua ação proteolítica, controlando a degradação de proteínas. Um importante exemplo é a participação de ubiquitinas na ativação do fator de transcrição NFκB a partir de estímulos inflamatórios, como TNF e IL-1 e Toll-like receptors (TLRs) (Bhoj and Chen 2009). Além disso, a exposição prolongada à insulina e ao estresse pode promover a degradação do IRS1 e IRS2 via ubiquitinação dos mesmos, prejudicando a sinalização deste hormônio (Sun, Goldberg et al. 1999, Zhande, Mitchell et al. 2002). A degradação desses substratos também pode ocorrer após grande estímulo por IGF1, através de SOCS1 e SOCS3, (Rui, Yuan et al. 2002) assim como o estímulo em adipócitos por TNF-α leva à ubiquitinação e degradação da AKT1, também interferindo na via de sinalização da insulina (Medina, Afsari et al. 2005).

A atividade das enzimas pode também reverter a marcação das proteínas alvo, através de enzimas deubiquitinases (DUBs). Na resposta imune, uma das deubiquitinases mais importantes é a A20 envolvida na retirada de cadeias de poliubiquitina de intermediários da via de ativação do NFκB. A via desse importante fator de transcrição envolve receptores celulares relacionados ao estresse (TNF, TLR, IL-1R) que ativam proteínas receptoras, como MyD88, RIP1 e TRAF6 através da adição de cadeias de poliubiquitina a esses substratos, que então ativam o complexo IKK. Esse complexo, por sua vez é responsável pela fosforilação e ubiquitinação do IκB, que está em íntima associação às subunidades que compõem o NFκB. Essa regulação do IκB leva à sua degradação pelo proteassoma com conseqüente liberação do fator de transcrição NFκB para o núcleo, onde irá exercer suas funções na ativação da transcrição de genes envolvidos com a resposta inflamatória, como moléculas de adesão VCAM-1 e ICAM-1 (Wolfrum, Teupser et al. 2007, Vereecke, Beyaert et al. 2009). A A20 atua negativamente sobre a via do NFκB de duas formas, uma através de sua função de deubiquitinase sobre

a quebra da cadeia de poliubiquitina Lys63 em RIP1 e TRAF6 e outra através de sua atividade de E3 ligase, ubiquitinando RIP1 em Lys 48 levando assim essa proteína à degradação (Wertz, O'Rourke et al. 2004).

Inicialmente identificada como uma proteína induzida pela ativação da via do TNF, a A20 (TNFAIP3) controla negativamente essa resposta, impedindo um quadro inflamatório exacerbado, sendo expressa em resposta ao aumento de NFκB (Dixit, Green et al. 1990). Sua importância no processo inflamatório fica clara quando mutações no gene que codifica a A20 correlaciona-se com inúmeras doenças autoimunes associadas à inflamação como a doença de Crohn, a artrite reumatóide, o lúpus eritematoso sistêmico e o diabetes tipo 1 (Vereecke, Beyaert et al. 2009, Ma and Malynn 2012). Animais que apresentavam inflamações generalizadas decorrentes do lúpus eritematoso sistêmico e que foram transfectados com o gene da A20, tiveram seu quadro inflamatório diminuído (Musone, Taylor et al. 2008). A superexpressão por adenovírus de A20 em ilhotas de roedores e humanos que apresentavam diabetes tipo 1 diminuiu a apoptose mediada por citocinas e também a produção de espécies reativas de oxigênio (Grey, Arvelo et al. 1999).

Além do seu papel no controle inflamatório, sua função de deubiquitinase foi recentemente associada a outros processos metabólicos. A ativação da Beclin-1, proteína iniciadora do processo autofágico, é feita através da sua ubiquitinação pela proteína TRAF6 após ativação da via do TLR4. Dessa forma, a A20 participa controlando negativamente a autofagia por deubiquitar Beclin1 (Shi and Kehrl 2010).

A importância da modificação pós-traducional de proteínas pela ubiquitinação e da reversibilidade desse processo através das deubiquitinases traz à luz da investigação básica a possibilidade de intervenções pontuais e transitórias em vias de sinalização

celular. O tecido adiposo, como órgão endócrino e de reserva energética, emerge como importante fonte de sinais inflamatórios e como órgão afetado pelo ganho de peso, apresentando alterações histológicas e de expressão gênica. Nesse sentido, a manutenção de concentrações adequadas de PGC1 α no tecido parece ser uma ferramenta importante para a homeostase do metabolismo energético, já que sua diminuição acarreta prejuízos importantes. Assim, sua degradação por ubiquitinação pode representar uma promissora ferramenta de intervenção a fim de impedir sua diminuição em indivíduos obesos. A A20, através de sua atividade de deubiquitinase, pode regular diversos processos celulares, como aqueles relacionados ao sistema imune e à autofagia.

Com esses conhecimentos em mãos, aventamos para a hipótese de que a proteína A20, através de sua atividade de deubiquitinase, atua controlando outros processos metabólicos importantes como o *turnover* de PGC1 α no tecido adiposo de obesos.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Caracterizar os níveis teciduais das proteínas A20 E PGC1 α bem como a interação entre as mesmas e investigar sua função deubiquitinase em tecido adiposo branco de diferentes modelos experimentais de obesidade.

Objetivos Específicos

- Avaliar a expressão gênica e protéica das proteínas A20 e PGC1 α em tecido adiposo branco de camundongos submetidos à dieta hiperlipídica e adiposo subcutâneo de voluntários magros e obesos antes e após cirurgia de redução de peso;
- Avaliar a modulação protéica de A20 e PGC1 α em voluntários magros, obesos antes e após a cirurgia para redução de peso;

- Avaliar a interação entre A20 e PGC1 α e a ubiquitinação de PGC1 α em camundongos submetidos à dieta hiperlipídica e humanos;
- Analisar as consequências fenotípicas decorrentes da modulação de A20, *in vivo*, em modelos animais tratados com oligonucleotídeo antisense.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais Experimentais.

Camundongos Swiss machos foram alimentados com dieta padrão ou dieta hiperlipídica por 16 semanas a partir da 5ª semana de vida. Todos os procedimentos foram avaliados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas (CEUA – UNICAMP).

Tecido Adiposo Humano.

O tecido adiposo subcutâneo da região abdominal foi coletado de voluntários obesos submetidos à cirurgia bariátrica e pacientes ex-obesos em cirurgia plástica corretiva no Hospital das Clínicas da UNICAMP. O mesmo tecido foi coletado de voluntários magros no LIMED (Laboratório de Investigação em Metabolismo e Diabetes – Gastrocentro; UNICAMP). Os voluntários foram excluídos de acordo com os seguintes critérios: doença inflamatória ou infecciosa aguda ou crônica, doença neurológica, doença psiquiátrica, tabagismo, consumo de álcool maior ou igual a 30g por dia para homens e 15g por dia para mulheres, uso de drogas ilícitas, uso de AINE ou corticóides, neoplasias, gestação, níveis de enzimas hepáticas > 3 vezes o limite superior da normalidade, insuficiência renal crônica. Os pacientes foram informados sobre o projeto e assinaram um termo de consentimento, podendo desistir da participação a qualquer momento sem

que isso acarretasse quaisquer prejuízos ao tratamento. O projeto e o Termo de Consentimento (em anexo) foram avaliados e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da UNICAMP.

Tratamento com Oligo Antisense (ASO).

Foi realizado tratamento utilizando oligo antisense para a proteína A20 (TNFAIP3). A sequência do ASO alvo foi 5' ACCCCAGTATTTGATCTTGT 3'; a do ASO scramble foi 5' TACTACGCGCATTCTTATTG 3' (Invitrogen, São Paulo, Brasil). O oligo antisense liofilizado foi ressuspenso em tampão Tris-Acetato-EDTA (40mM Tris, 20mM ácido acético, 1mM EDTA) na concentração de 1nmol/μL e diluído em salina para aplicação intraperitoneal de 200μL como volume final, uma vez ao dia, por 7 dias, na dose de 2nmol.

Teste de Tolerância a Glicose Intraperitoneal (ipGTT).

A glicose foi dosada em sangue utilizando um glicosímetro Abbott (Opptimum, Abbott Diabetes Care, Inc., Alameda, CA, USA). Após jejum de 12 horas, os animais foram alimentados por 1 hora e novamente deixados em jejum por 4 horas. Após a coleta da primeira amostra de sangue (tempo 0), os animais receberam intraperitonealmente uma solução de 25% de glicose (1,0g/kg de peso corporal) e novas coletas foram feitas nos tempos 15, 30, 60, 120 e 150 minutos após a injeção. A área sob a curva de glicose foi calculada pelo método do trapézio (Matthews, Altman et al. 1990).

Imunoblotting.

Os tecidos, tanto branco e marrom de camundongos como o subcutâneo de humanos, foram homogeneizados por 15 segundos (Polytron-Aggregate, Kinematica, Littau/Luzern, Switzerland) na máxima velocidade juntamente a um tampão anti-protease

(10 mmol/L imidazole, pH 8.0, 4 mmol/L EDTA, 1 mmol/L, aprotinina, 2.5 mg/L leupeptina, 30 mg/L inibidor de tripsina, 200 µmol/L DTT and 200 µmol/L fenilmetilsulfonil fluoreto). Após homogeneização, uma alíquota do extrato foi coletada para determinação do conteúdo total de proteína (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Amostras contendo 100µg de proteína foram incubadas por 5 minutos a 95°C com tampão Laemmli concentrado 4x (1 mmol fosfato de sódio /L, pH 7.8, 0.1% azul de bromofenol, 50% glicerol, 10% SDS, 2% mercaptoetanol) ou imunoprecipitadas (500µg de proteína) com anticorpo anti-A20 ou anti-PGC1α (4:1, vol/vol) e aplicadas em gel de poliacrilamida 10% e separadas por eletroforese por aproximadamente 4 horas. Na imunoprecipitação foram utilizadas quantidades de anticorpos suficientes para imunodepletar completamente as amostras. A transferência em membranas de nitrocelulose (Bio-Rad) foi feito utilizando Trans Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad) por 1 hora a 15V (constante) em tampão contendo metanol e SDS. Após a transferência, as membranas foram bloqueadas com solução contendo leite 5% em tampão Tween-Tris (TTBS) (10 mmol Tris/L, 150 mmol NaCl/L, and 0.5% Tween 20) por 12 horas a 4°C. A20, PGC1α e ubiquitina foram detectadas nas membranas após 12 horas de incubação a 4°C com anticorpo primário (A20, sc166692; PGC1α, sc13067; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA e ubiquitina, ab7254 AbCam, Cambridge, MA, USA; diluído 1:500 em TTBS contendo 3% de leite em pó). As membranas foram posteriormente incubadas com anticorpo secundário (diluído 1:5000 em TTBS contendo 3% de leite em pó) por 2 horas a temperatura ambiente. Após incubação, foi utilizado uma solução quimioluminescente (SuperSignal West Pico; Pierce) e detectado por autorradiografia; a intensidade das bandas foram quantificadas por densitometria optica (UN-Scan-it Gel 6.1, Orem, Utah, USA).

Extração de RNA e qRT Real Time - PCR.

As amostras foram processadas em reagente TRIzol (Invitrogen, São Paulo, Brasil) com o uso de um homogeneizador (15s) (Polytron-Agregate, Kinematica, Littau/Luzern, Switzerland). O conteúdo total de RNA foi isolado de acordo com as instruções do fabricante e posteriormente quantificado e analisado quanto à sua integridade por espectrofotometria (NanoDrop 8000, Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). A síntese de cDNA foi realizada a partir de 3µg de RNA total, seguindo as instruções do fabricante (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Life Technologies, Van Allen Way Carlsbad, CA, USA). Utilizou-se Real Time – PCR juntamente ao sistema TaqMan para a detecção da expressão gênica de A20 (TNFAIP3), PGC1α e PPARγ em tecido adiposo marrom, visceral e subcutâneo de camundongos (Mm00437121_m1; Mm447183m1; Mm01184322_m1, respectivamente - Life Technologies, Van Allen Way Carlsbad, CA, USA) e o gene GAPDH utilizado como controle endógeno (#4352339E). Para o tecido adiposo subcutâneo de humanos, detectamos a expressão gênica de A20 (TNFAIP3) e PGC1α (Hs00234713_m1; Hs00173304_m1, respectivamente) e utilizamos o PPIA como controle endógeno (Hs99999904_m1). O limiar dos ciclos foi obtido através do sistema 7500 SDS Software (Applied Biosystems – Life Technologies).

Imunofluorescência

As amostras de tecido adiposo marrom e branco foram fixadas em paraformaldeído (4% de concentração final em tampão fosfato salina [PBS; 50mmol/L of $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 5mmol/L of KCl; 1.5mmol/L of $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; e 80.1 mmol/L de NaCl; pH 7.4]) e processado para inclusão em bloco de parafina. As amostras foram então submetidas à desidratação (álcool a 70%, 80%, 90%, 95%, e álcool absoluto) e posteriormente diafanizadas por imersão em xilol e mergulhadas em parafina. Em

seguida, as lâminas contendo secções de parafina de 5µm foram hidratadas (álcool absoluto, 95%, 90%, 80%, e 70%) e marcadas com anticorpos para Ubiquitina, A20 e PGC1α (sc8017; sc166692, sc13067 respectivamente - Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) e posteriormente com anticorpos secundários conjugados com FITC ou rodamina (sc2777; sc2092, respectivamente - Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). As imagens foram capturadas utilizando-se um Microscópio a Laser Confocal (LSM510, Zeiss, Nova York, NY) e as análises foram feitas utilizando-se Leica Application Suite V 3.6 (Switzerland).

Análises Estatísticas.

Os resultados são apresentados como médias $\pm$ SE (erro padrão). A homogeneidade das variâncias foi analisada por teste de Levene para verificar se as amostras se apresentavam de forma paramétrica. Utilizou-se teste t de Student ou One-way ANOVA complementado com teste de Tukey para determinar as diferenças entre os grupos. O nível de significância aceito foi $p < 0.05$. Os dados foram analisados utilizando Estatística para Windows, 7.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA).

A20 deubiquitinase controls PGC-1 α expression in the adipose tissue

Bruna Bombassaro, Leticia M. Ignacio-Souza, Carla E. Nunez, Daniela S. Razolli, Rafael M. Pedro, Andressa Coope, Licio A. Velloso

Laboratory of Cell Signaling, University of Campinas, Brazil

Correspondence should be addressed to:

Licio A. Velloso – Laboratory of Cell Signaling, Faculdade de Ciencias Medicas da Universidade Estadual de Campinas, 13084 970, Campinas SP – Brazil. E-mail – lavelloso.unicamp@gmail.com

Abstract

Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α (PGC-1 α) plays an important role in whole body metabolism and, particularly in glucose homeostasis. Its expression is tightly regulated and, small variations in tissue levels can have a major impact in a number of physiological and pathological conditions. Recent studies have shown that the ubiquitin/proteasome system plays a role in the control of PGC-1 α degradation. Here we evaluated the interaction of PGC-1 α with the protein A20, which plays a dual-role in the control of the ubiquitin/proteasome system acting as a deubiquitinase and as an E3 ligase. We employed immunoprecipitation, quantitative real-time PCR and immunofluorescence staining to evaluate PGC-1 α , A20, PPAR γ and ubiquitin in the adipose tissue of humans and mice. Our results show that, in distinct sites of the adipose tissue A20 binds to PGC-1 α . At least in the subcutaneous fat of humans and mice the levels of PGC-1 α decrease during obesity, while its physical association with A20 increases. The inhibition of A20 leads to a reduction of PGC-1 α and PPAR γ expression, suggesting that A20 acts as a protective factor against PGC-1 α disposal. Thus, we provide evidence that mechanisms regulating PGC-1 α ubiquitination are potentially involved in the control of the function of this transcriptional co-activator.

Introduction

Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α (PGC-1 α) is a co-activator of transcription involved in the control of a number of metabolic functions in a diversity of tissues in mammals (1). It was first identified in brown adipose tissue (BAT) due to its important role in the modulation of PPAR γ – dependent UCP1 expression (2). Because of its pleiotropic functions, the regulation of PGC-1 α expression by extracellular signals is complex and varies in distinct tissues. Thus, for example, in BAT and pancreatic islets it is induced by cold (2, 3), in skeletal muscle it is induced by exercise (4), and in the liver it is induced by fasting (5). Also, at the intracellular level, PGC-1 α gene expression can be controlled by many different mechanisms, such as cAMP and Ca⁺² signaling through CREB (6, 7), NO-induced cGMP pathway (8), MEF, and even through an auto-regulatory loop in white adipose tissue (WAT) leading to PPAR γ activation (9).

The availability of PGC-1 α in a given cell impacts on the immediate regulation of target gene transcription, which means that both production, i.e., transcription and translation, and degradation of PGC-1 α must be tightly controlled (1). If on one hand the control of PGC-1 α production has been widely studied, on the other hand, little is known about the processes and mechanisms that lead to its degradation. Under physiological conditions the half-life of PGC-1 α is as short as 2-3 hours (10). However, this can be modulated by different intracellular signals such as p38 MAPK and p160 myb (10, 11). Also, recent studies have shown that PGC-1 α is degraded through the ubiquitin-proteasome system (12).

The ubiquitination of target proteins plays an important and wide-ranging role in the homeostasis of cells. Typically it targets damaged proteins to proteasomal degradation (13) and potentially detrimental protein aggregates that cannot be degraded by the proteasome, to

autophagy (14). There are a number of steps and mechanisms involved in the activation and control of the ubiquitination machinery (13). One of such regulatory events is carried out by a family of proteins with deubiquitinase activity(13). Interestingly, deubiquitination of target proteins plays an important role in the control of inflammatory signaling pathways, particularly by the action of A20 deubiquitinase through the regulation of NF κ B activity (15).

In obesity, the hypertrophic WAT is targeted by a low-grade inflammatory process on which the activation of signaling through NF κ B plays an important role (16). An important outcome of this inflammatory process is the induction of insulin resistance and disruption of metabolic pathways (16). Defective signaling through PPAR γ plays an important role in adipose tissue insulin resistance and, the use of thiazolidinediones can greatly improve this phenotype (17). It has been shown that PGC-1 α expression is greatly reduced in WAT of obese subjects. Therefore, we hypothesized that changes in ubiquitination, potentially involving the activity of A20, could explain at least part of the changes in WAT PGC-1 α expression. To test this hypothesis we evaluated PGC-1 α and A20 expression and PGC-1 α ubiquitination in the WAT of obese humans before and after body mass reduction resulting from bariatric surgery. In addition, we evaluated the same proteins and the effect of an oligonucleotide antisense(ASO) inhibition of A20 in the adipose tissue of an animal model of obesity. As a whole, our results show that PGC-1 α expression is reduced in obesity and its association with A20 is a protective factor against this reduction. When the expression of A20 is reduced by ASO the levels of PGC-1 α decrease and the animals become glucose intolerant.

Materials and methods

Experimental Animals. Six-week old male Swiss mice were fed on standard rodent chow or on a high-fat diet for 16 weeks. The macronutrient composition of diets is presented in Table 1. All experimental procedures were performed in accordance with the guidelines of the Brazilian College for Animal Experimentation and were approved by the University of Campinas Ethics Committee.

Human Adipose Tissue. Subcutaneous adipose tissue from the abdominal wall was collected from twelve obese subjects during a Roux-in-Y gastric bypass surgery and from sixteen formerly obese patients that have been submitted to Roux-in-Y gastric bypass approximately one year before and returned for plastic reconstitution of the abdominal wall at the Clinics Hospital of the University of Campinas. The adipose tissue from nine lean volunteers was collected at the Laboratory of Investigation in Metabolism and Diabetes, University of Campinas. The exclusion criteria were, as follows: inflammatory or infectious disease acute or chronic, neurological disease, psychiatric illness, smoking, alcohol consumption greater than or equal to 30g per day for men and 15g per day for women, use of illicit drug, use of NSAIDs or corticosteroids, cancer, pregnancy, liver enzyme levels > 3 times the upper limit of normal, chronic renal failure. Patients were informed about the project and signed a consent form. Volunteers could, at any time, withdraw from the project. The study was evaluated and approved by the University of Campinas Ethics Committee for Medical Research.

Antisense oligonucleotide (ASO) treatment. An antisense oligonucleotide (ASO) targeting TNFAIP3 (gene coding for the A20 protein) and a scrambled ASO were designed and used to treat the experimental animals. The sequence of the TNFAIP3 ASO was 5'ACCCAGTATTTGATCTTGT 3' and the scramble ASO was 5'TACTACGCGCATTCTTATTG 3' (Invitrogen, São Paulo, Brazil). The

lyophilized ASOs were suspended in Tris-acetate-EDTA Buffer (40mM Tris, 20mM acetic acid, 1mM EDTA) at 1nmol/ μ L and diluted in saline for intraperitoneal injection, once a day. The animals were treated for seven days.

Intraperitoneal glucose tolerance test (ipGTT). Glucose was determined in blood using a glucometer from Abbott (Opptimum, Abbott Diabetes Care, Inc., Alameda, CA, USA). After an overnight fasting, the animals were fed during one hour and then fasted for four hours. After the collection of the first blood sample (time 0), 20% glucose (2.0 g/kg body weight) was administered via intraperitoneal injection. Blood samples from tails were collected at different times for the determination of glucose concentration.

Immunoblotting. The adipose tissue specimens were homogenized in a tissue homogenizer (Polytron-Aggregate, Kinematica, Littau/Luzern, Switzerland) at maximum speed in an anti-protease cocktail (10 mmol/L imidazole, pH 8.0, 4 mmol/L EDTA, 1 mmol/L, aprotinin, 2.5 mg/L leupeptin, 30 mg/L trypsin inhibitor, 200 μ mol/L DTT and 200 μ mol/L phenylmethylsulfonyl fluoride). After sonication, an aliquot of the extracts was collected and the total protein content was determined by the dye-binding protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Samples containing 100 μ g of protein were incubated for 5 minutes at 95°C with 4x concentrated Laemmli sample buffer (1 mmol sodium phosphate/L, pH 7.8, 0.1% bromophenol blue, 50% glycerol, 10% SDS, 2% mercaptoethanol) or immunoprecipitated (500 μ g of protein) with anti-A20 or anti-PGC-1 α (4:1, vol/vol) and then run on 10% polyacrylamide gels during approximately 4 hours. The amounts of antibodies used in the immunoprecipitation assays were sufficient to immunodeplete the samples as evaluated by running an immunoblotting assay of the supernatants. Electrotransfer of proteins to nitrocellulose membranes (Bio-Rad) was performed in a Trans Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad) for 1 hour at 15V (constant) in buffer containing methanol and SDS.

After transfer, the membranes were blocked with 5% skimmed milk in Tween-/Tris-buffered saline (TTBS) (10 mmolTris/L, 150 mmolNaCl/L, and 0.5% Tween 20) overnight at 4°C. A20, PGC-1 α and ubiquitin were detected in the membranes after overnight incubation at 4°C with primary antibodies (A20, sc166692; PGC-1 α , sc13067, from Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA and ubiquitin, ab7780 from AbCam, Cambridge, MA, USA; diluted 1:500 in TTBS containing 3% dry skimmed milk). The membranes were then incubated with a secondary specific immunoglobulin G antibody (diluted 1:5,000 in TTBS containing 3% dry skimmed milk) for 2 h at room temperature. Enhanced chemiluminescence (SuperSignal West Pico; Pierce) after incubation with a horseradish peroxidase–conjugated secondary antibody was used for detection by autoradiography. Band intensities were quantified by optical densitometry (UN-Scan-it Gel 6.1, Orem, Utah, USA).

RNA extraction and real-time -qPCR. The samples were homogenized in TRIzol reagent (Invitrogen, São Paulo, Brasil) in a tissue homogenizer (Polytron-Agregate, Kinematica, Littau/Luzern, Switzerland) at maximum speed. The total RNA content was then isolated according to the manufacturer's instructions, quantified and analyzed by spectrophotometry (NanoDrop 8000, Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). The integrity of RNA and the total amount were assessed by Nanodrop (Nanodrp 8000 Thermo Scientific). cDNA synthesis was performed in 3 μ g of total RNA, according the manufacturer's instructions (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Life Technologies, Van Allen Way Carlsbad, CA, USA). The TaqMan System was used in association with real-time PCR to detect A20 (TNFAIP3), PGC-1 α and PPAR γ in the brown, visceral and subcutaneous adipose tissue (Mm00437121_m1; Mm447183m1; Mm01184322_m1, respectively - Life Technologies, Van Allen Way Carlsbad, CA, USA) and the mouse GAPDH gene was used as an endogenous control (#4352339E).

Immunofluorescence staining. For histological evaluation, brown and white adipose tissue samples were fixed in paraformaldehyde (4% final concentration in phosphate-buffered saline [PBS; 50mmol/L of NaH₂PO₄ · H₂O; 5mmol/L of KCl; 1.5mmol/L of MgCl₂ · 6H₂O; and 80.1 mmol/L of NaCl; pH 7.4]) and processed routinely for embedding in a paraffin block. The samples were submitted to dehydration (alcohol at 70%, 80%, 90%, 95%, and absolute alcohol) being diaphanized by immersion in xylol and embedded in paraffin. Subsequently, the hydrated (alcohol at absolute, 95%, 90%, 80%, and 70% concentrations) 5.0 um paraffin sections were processed for immunofluorescence staining using the Ubiquitin, A20 and PGC-1 α antibodies (sc271289; sc166692, sc13067 respectively - Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) and the secondary antibodies conjugated to FITC or rhodamine (sc2777; sc2092, respectively - Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). The images were obtained using a Confocal Laser Microscopy (LSM510, Zeiss, New York, NY). Analyses of results were performed using a Leica Application Suite V3.6 (Switzerland).

Statistical analysis. Results are presented as means $\pm$ SE. The homogeneity of variances was checked by Levene's test to verify if the data were parametric. When necessary, to correct for variance heterogeneity or non-normality, data were log-transformed (18). The results were analyzed by Student-test or One-way ANOVA and complemented by the Tukey test to determine the significance of individual differences. The level of significance was set at $p < 0.05$. The data were analyzed using Statistic for Windows, 7.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA).

Results

PGC-1 α and A20 are reduced in the adipose tissue of obese subjects. Except for body mass index, the groups of subjects presented no differences in age, glucose, HbA1c and cholesterol (Table 2).

Nevertheless, the protein expressions of both PGC-1 α and A20 were reduced before and after surgery, as compared to control (Fig. 1A – 1C), while the associations of PGC-1 α with ubiquitin and A20 were increased (Fig. 1A and 1D – 1E).

PGC-1 α and A20 are differentially expressed in distinct sites and types of adipose tissue in mice.

Because of the differences in function and potential for inflammatory response presented by the distinct sites and types of adipose tissue, we evaluated the expressions of PGC-1 α and A20 in samples obtained from the brown adipose tissue and from either visceral or subcutaneous fat from lean and obese mice. As depicted in Figure 2A-2D, PGC-1 α protein was consistently reduced in all types and sites of adipose tissue of obese mice. The mRNA expression of PGC-1 α was reduced in both visceral and subcutaneous fat (Fig. 2E and 2F) but was unchanged in the brown adipose tissue (Fig. 2G) of obese mice. Differently of obese humans, obese mice presented increased expression of A20 protein only in the subcutaneous fat depot, while in visceral and brown adipose tissue the expression of A20 was similar between lean and obese animals (Fig. 3A-3D). Regarding mRNA levels, A20 expression in obese mice was unchanged in visceral fat, reduced in subcutaneous fat and increased in the brown adipose tissue (Fig. 3E-3G). The association of PGC-1 α with ubiquitin was differently regulated when comparing the distinct types and sites of adipose tissue, while in subcutaneous fat and brown adipose tissue the association was reduced, in visceral fat it was increased (Fig. 4A-4D). The association of PGC-1 α with A20 was also differentially regulated among the distinct types and sites of adipose tissue. Thus, it was increased in the subcutaneous fat, while unchanged in visceral fat and brown adipose tissue (Fig. 4E-4H).

Evaluation of PGC-1 α co-expression with ubiquitin and A20 by immunofluorescence staining.

The changes in association between PGC-1 α and ubiquitin or A20 detected by the co-immunoprecipitation assays were mostly confirmed by immunofluorescence staining. Thus, in

obese mice there was a clear increase in the co-localization of PGC-1 α with ubiquitin in visceral fat (Fig. 5A), while reductions were detected in brown adipose tissue and subcutaneous fat (Fig. 5A). The association of PGC-1 α with A20 was increased in subcutaneous fat while no major changes were detected in brown adipose tissue and visceral fat (Fig. 5B).

Inhibition of A20 impairs whole body glucose homeostasis. To test the hypothesis that A20 controls the levels of PGC-1 α , which potentially would impact on the control of glucose homeostasis, we treated obese mice with an antisense oligonucleotide (ASO) against A20 and evaluated the expression of related proteins and whole body energy homeostasis. A dose-response experiment showed that the treatment with 1.0, 2.0 or 4.0 nmol ASO per day for seven days were sufficient to reduce the expression of either A20 or PGC-1 α in the subcutaneous adipose tissue (Fig. 6A and 6B). The dose of 2.0 nmol/day was used in the remaining experiments. The intraperitoneal treatment with the A20 ASO resulted in significant reduction of A20 only in the subcutaneous fat (Fig. 6C). In brown adipose tissue and visceral fat, no changes in A20 levels were detected following A20 ASO treatment (Fig. 6F and 6I). The expressions of PGC-1 α and PPAR γ were reduced only in the subcutaneous fat (Fig. 6D and 6E), while no changes were detected in brown adipose tissue and visceral fat (Fig. 6G-6H and 6J-6K). The inhibition of A20 resulted in no changes in food intake (Fig. 6L and 6M) and body mass (Fig. 6N). However, fasting glucose levels (Fig. 6O) and the area under glucose curve during a glucose tolerance test were severely worsened by the treatment with the A20 ASO (Fig. 6P and 6Q).

Discussion

In this study we demonstrate that PGC-1 α associates with A20 in the adipose tissue of humans and mice. This association is independently regulated in distinct types and sites of the

adipose tissue, and tends to increase during obesity. In all conditions analyzed, the expression of adipose tissue PGC-1 α was reduced during obesity, and, in the case of humans, even after body mass reduction, the protein level of PGC-1 α was lower than in lean controls. In most conditions, particularly in the subcutaneous fat, the expression of PGC-1 α was inversely correlated with its physical association with A20, thus, raising the question of whether A20 acts to protect or to enhance PGC-1 α degradation.

A20 is a zinc finger protein identified as a regulator of NF κ B activity in response to TNF α (19). It has a dual role, acting as a deubiquitinase due to the catalytic activity of its N-terminal region; and, as an E3 ligase due to its C-terminal region containing the zinc finger domain(20). The regulation of NF κ B activity is the most extensively studied function of A20. It is currently known that upon TNF α signal transduction through TNFR1, A20 removes the polyubiquitinated lysine-63 residues of receptor-interacting protein-1 (RIP1) preventing its interaction with NEMO(21). In addition, A20 adds a lysine-48 polyubiquitinated tail to RIP1, triggering its proteasome mediated degradation(22). These combined catalytic actions result in the inhibition of NF κ B activity, and thus, attenuation of inflammation. Therefore, A20 exerts an important function in the control of NF κ B-dependent inflammatory signaling.

Subclinical inflammation is a common feature of human and experimental obesity (16, 23). Activation of TLR4 signal transduction and induction of endoplasmic reticulum stress (ERS), are regarded as two of the most important mechanisms triggering the inflammatory activity related to obesity (16, 23). Once active, both TLR4 signaling and ERS induce intracellular inflammatory signal transduction through at least two important signaling intermediaries, JNK and NF κ B (24-26). As a consequence of the activation of inflammatory regulated serine-threonine kinases such as JNK, IKK the insulin receptor and some of its important primary substrates are negatively modulated by

serine phosphorylation resulting in the impairment of the insulin signal transduction (26, 27). There are a number of cell specific outcomes resulting from inflammation-induced insulin resistance. In the adipose tissue, one such outcome is the defective activation of PPAR γ which leads to an anomalous distribution of fat and increased expression of inflammatory adipokines, further enhancing inflammation and insulin resistance; thus, creating a vicious cycle(17, 28).

Because PGC-1 α is an important regulator of PPAR γ expression we asked whether in obesity the expression of PGC-1 α would be reduced, and, if so, what would be the role of A20 in this context. First, we showed that in both obese humans and mice the expression of PGC-1 α was indeed reduced. In the case of mice, this was occurring in visceral and subcutaneous fat and also in BAT. These findings confirm previous studies that evaluated PGC-1 α in different groups of obese subjects and showed a consistent reduction in both visceral and subcutaneous depots(29, 30).

Next, to test our working hypothesis, we determined the levels of A20 and its interaction with PGC-1 α . In both humans and mice, in the subcutaneous fat, A20/PGC-1 α association was increased, while in mice visceral fat and BAT it was unchanged. No previous study has evaluated the association of PGC-1 α with A20. However, in other studies, the activity of A20 related to its ability to bind to distinct proteins resulted, in most times, in the modification of the target protein expression levels (20-22, 31).

A20 can act to modify a given target protein expression by at least two mechanisms, deubiquitination or E3 ligase activity (20, 21). Although we have not evaluated the potential involvement of the distinct functions of A20 to control PGC-1 α expression, we employed a method to reduce A20 expression and looked for the outcome on PGC-1 α levels and modulation of metabolic functions. Interestingly, the use of an ASO targeting A20 resulted in the reduction of

A20 expression only in the subcutaneous fat depot, while no changes were detected in the visceral fat and BAT. The reason for this apparent specificity was not investigated but it is currently known that mRNA targeting with ASOs or even siRNA approaches can result in reduction, no modulation or even increase of the target expression (32-34).

In the subcutaneous adipose tissue, the reduction of A20 was accompanied by a reduction of PGC-1 α and PPAR γ , while in the other two adipose sites no changes in the expression of PGC-1 α and PPAR γ were detected. As an outcome of A20 inhibition there was an increase in fasting glucose levels and in the area under glucose curve during a glucose tolerance test, which were independent on changes in caloric intake and body mass. In a number of different contexts the reductions in the expression of either PGC-1 α or PPAR γ in the adipose tissue have been shown to result in impaired glucose tolerance (35-37). Thus, the role of A20 controlling subcutaneous adipose tissue levels of PGC-1 α impacts on PPAR γ levels resulting in an important change in whole body glucose homeostasis.

In conclusion, this study has shown that in distinct sites of the adipose tissue A20 binds to PGC-1 α . At least in the subcutaneous fat of humans and mice the levels of PGC-1 α decrease during obesity, while its physical association with A20 increases. The inhibition of A20 in this site produces a reduction of PGC-1 α and PPAR γ expression, suggesting that A20 acts as a protective factor against PGC-1 α disposal. Thus, we provide additional (12)evidence that mechanisms regulating PGC-1 α ubiquitination are potentially involved in the control of the function of this transcriptional co-activator.

Acknowledgements: We thank Dr. E. Roman, Mr. J. G. Ferraz and Mr. M. Cruz, from the University of Campinas, for assistance with the experiments. We thank Dr. N. Conran, from the University of

Campinas, for editing the English grammar. The grants were provided by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

References

1. **Handschin C, Spiegelman BM** 2006 Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 coactivators, energy homeostasis, and metabolism. *Endocr Rev* 27:728-735
2. **Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM** 1998 A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 92:829-839
3. **De Souza CT, Gasparetti AL, Pereira-da-Silva M, Araujo EP, Carneiro EM, Velloso LA** 2003 Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1-dependent uncoupling protein-2 expression in pancreatic islets of rats: a novel pathway for neural control of insulin secretion. *Diabetologia* 46:1522-1531
4. **Lin J, Wu H, Tarr PT, Zhang CY, Wu Z, Boss O, Michael LF, Puigserver P, Isotani E, Olson EN, Lowell BB, Bassel-Duby R, Spiegelman BM** 2002 Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* 418:797-801
5. **Yoon JC, Puigserver P, Chen G, Donovan J, Wu Z, Rhee J, Adelmant G, Stafford J, Kahn CR, Granner DK, Newgard CB, Spiegelman BM** 2001 Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature* 413:131-138
6. **Herzig S, Long F, Jhala US, Hedrick S, Quinn R, Bauer A, Rudolph D, Schutz G, Yoon C, Puigserver P, Spiegelman B, Montminy M** 2001 CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature* 413:179-183
7. **Handschin C, Rhee J, Lin J, Tarr PT, Spiegelman BM** 2003 An autoregulatory loop controls peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha expression in muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:7111-7116
8. **Nisoli E, Clementi E, Paolucci C, Cozzi V, Tonello C, Sciorati C, Bracale R, Valerio A, Francolini M, Moncada S, Carruba MO** 2003 Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science* 299:896-899
9. **Hondares E, Mora O, Yubero P, Rodriguez de la Concepcion M, Iglesias R, Giralte M, Villarroya F** 2006 Thiazolidinediones and rexinoids induce peroxisome proliferator-activated receptor-coactivator (PGC)-1alpha gene transcription: an autoregulatory loop controls PGC-1alpha expression in adipocytes via peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivation. *Endocrinology* 147:2829-2838
10. **Puigserver P, Rhee J, Lin J, Wu Z, Yoon JC, Zhang CY, Krauss S, Mootha VK, Lowell BB, Spiegelman BM** 2001 Cytokine stimulation of energy expenditure through p38 MAP kinase activation of PPARgamma coactivator-1. *Mol Cell* 8:971-982
11. **Knutti D, Kressler D, Kralli A** 2001 Regulation of the transcriptional coactivator PGC-1 via MAPK-sensitive interaction with a repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:9713-9718
12. **Sano M, Tokudome S, Shimizu N, Yoshikawa N, Ogawa C, Shirakawa K, Endo J, Katayama T, Yuasa S, Ieda M, Makino S, Hattori F, Tanaka H, Fukuda K** 2007 Intramolecular control

- of protein stability, subnuclear compartmentalization, and coactivator function of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha. *J Biol Chem* 282:25970-25980
13. **Welchman RL, Gordon C, Mayer RJ** 2005 Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:599-609
 14. **Kirkin V, McEwan DG, Novak I, Dikic I** 2009 A role for ubiquitin in selective autophagy. *Mol Cell* 34:259-269
 15. **Leotoing L, Chereau F, Baron S, Hube F, Valencia HJ, Bordereaux D, Demmers JA, Strouboulis J, Baud V** 2011 A20-binding inhibitor of nuclear factor-kappaB (NF-kappaB)-2 (ABIN-2) is an activator of inhibitor of NF-kappaB (IkappaB) kinase alpha (IKKalpha)-mediated NF-kappaB transcriptional activity. *J Biol Chem* 286:32277-32288
 16. **Gregor MF, Hotamisligil GS** 2011 Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol* 29:415-445
 17. **Sharma AM, Staels B** 2007 Review: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and adipose tissue--understanding obesity-related changes in regulation of lipid and glucose metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 92:386-395
 18. **Lundbaek K** 1962 Intravenous glucose tolerance as a tool in definition and diagnosis of diabetes mellitus. *Br Med J* 1:1507-1513
 19. **Coornaert B, Carpentier I, Beyaert R** 2009 A20: central gatekeeper in inflammation and immunity. *J Biol Chem* 284:8217-8221
 20. **Wertz IE, O'Rourke KM, Zhou H, Eby M, Aravind L, Seshagiri S, Wu P, Wiesmann C, Baker R, Boone DL, Ma A, Koonin EV, Dixit VM** 2004 De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. *Nature* 430:694-699
 21. **Bertrand MJ, Milutinovic S, Dickson KM, Ho WC, Boudreault A, Durkin J, Gillard JW, Jaquith JB, Morris SJ, Barker PA** 2008 cIAP1 and cIAP2 facilitate cancer cell survival by functioning as E3 ligases that promote RIP1 ubiquitination. *Mol Cell* 30:689-700
 22. **Newton K, Matsumoto ML, Wertz IE, Kirkpatrick DS, Lill JR, Tan J, Dugger D, Gordon N, Sidhu SS, Fellouse FA, Komuves L, French DM, Ferrando RE, Lam C, Compaan D, Yu C, Bosanac I, Hymowitz SG, Kelley RF, Dixit VM** 2008 Ubiquitin chain editing revealed by polyubiquitin linkage-specific antibodies. *Cell* 134:668-678
 23. **Cnop M, Foufelle F, Velloso LA** 2012 Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes. *Trends Mol Med* 18:59-68
 24. **Tsukumo DM, Carvalho-Filho MA, Carvalheira JB, Prada PO, Hirabara SM, Schenka AA, Araujo EP, Vassallo J, Curi R, Velloso LA, Saad MJ** 2007 Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56:1986-1998
 25. **Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, Tuncman G, Gorgun C, Glimcher LH, Hotamisligil GS** 2004 Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 306:457-461
 26. **Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J, Shoelson SE** 2005 Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat Med* 11:183-190
 27. **Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Gorgun CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS** 2002 A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 420:333-336
 28. **Kim JY, van de Wall E, Laplante M, Azzara A, Trujillo ME, Hofmann SM, Schraw T, Durand JL, Li H, Li G, Jelicks LA, Mehler MF, Hui DY, Deshaies Y, Shulman GI, Schwartz GJ, Scherer**

- PE 2007 Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. *J Clin Invest* 117:2621-2637
29. **Semple RK, Crowley VC, Sewter CP, Laudes M, Christodoulides C, Considine RV, Vidal-Puig A, O'Rahilly S** 2004 Expression of the thermogenic nuclear hormone receptor coactivator PGC-1alpha is reduced in the adipose tissue of morbidly obese subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28:176-179
 30. **Ruschke K, Fishbein L, Dietrich A, Kloting N, Tonjes A, Oberbach A, Fasshauer M, Jenkner J, Schon MR, Stumvoll M, Bluher M, Mantzoros CS** 2010 Gene expression of PPARgamma and PGC-1alpha in human omental and subcutaneous adipose tissues is related to insulin resistance markers and mediates beneficial effects of physical training. *Eur J Endocrinol* 162:515-523
 31. **Boone DL, Turer EE, Lee EG, Ahmad RC, Wheeler MT, Tsui C, Hurley P, Chien M, Chai S, Hitotsumatsu O, McNally E, Pickart C, Ma A** 2004 The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses. *Nat Immunol* 5:1052-1060
 32. **Dias N, Stein CA** 2002 Antisense oligonucleotides: basic concepts and mechanisms. *Mol Cancer Ther* 1:347-355
 33. **Wheeler TM, Sobczak K, Lueck JD, Osborne RJ, Lin X, Dirksen RT, Thornton CA** 2009 Reversal of RNA dominance by displacement of protein sequestered on triplet repeat RNA. *Science* 325:336-339
 34. **Castanotto D, Rossi JJ** 2009 The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics. *Nature* 457:426-433
 35. **He W, Barak Y, Hevener A, Olson P, Liao D, Le J, Nelson M, Ong E, Olefsky JM, Evans RM** 2003 Adipose-specific peroxisome proliferator-activated receptor gamma knockout causes insulin resistance in fat and liver but not in muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:15712-15717
 36. **Olswang Y, Cohen H, Papo O, Cassuto H, Croniger CM, Hakimi P, Tilghman SM, Hanson RW, Reshef L** 2002 A mutation in the peroxisome proliferator-activated receptor gamma-binding site in the gene for the cytosolic form of phosphoenolpyruvate carboxykinase reduces adipose tissue size and fat content in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:625-630
 37. **Kleiner S, Mepani RJ, Laznik D, Ye L, Jurczak MJ, Jornayvaz FR, Estall JL, Chatterjee Bhowmick D, Shulman GI, Spiegelman BM** 2012 Development of insulin resistance in mice lacking PGC-1alpha in adipose tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:9635-9640

Tables

Table 1. Composition of the diets

	<i>Diets</i>	
	Chow	High-fat
Protein (g%)	22.5	26

Fat (g%)	4.5	35
Carbohydrate (g%)	55	26
Fiber (g%)	8	6
Ash (g%)	10	7
Total	100	100
Energy value (kCal/g)	3.5	5.2

Table 2. Anthropometric and biochemical parameters of subjects

Parameters	Lean	BS	AS
Number	9	12	16
Gender (F/M)	8/1	8/4	16/0
Age	32±4	38±6	38±6
BMI (kg/m ²)	22±2	36±3*	26±2*#
Glucose (mg/dL)	77±7	80±7	81±4
HbA1c (%)	5.3±0.4	5.4±0.3	5.5±0.4
Total Cholesterol (mg/dL)	193±29	165±17	158±37

Data are presented as means±standard deviation.

AS, obese subjects after surgery; BMI, body mass index; BS, obese subjects before surgery.

Legends for the Figures

Figure 1. PGC-1 α and A20 expression in the adipose tissue of humans. Samples containing 500 μ g total protein from abdominal subcutaneous adipose tissue specimens, collected from 9 lean volunteers, 12 obese subjects before Roux-in-Y gastric bypass (BS) and 16 formerly obese subjects approximately one year after Roux-in-Y gastric bypass (AS) were used in immunoprecipitation

experiments employing anti-PGC-1 α (A, B, D and E) or anti-A20 (A and C) as primary antibodies. The immunoprecipitation procedure used antibodies sufficient to immunodeplete the sample. The immunoprecipitates were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted with anti-PGC-1 α (A and B), anti-A20 (A, C and E) or anti-ubiquitin (A and D) antibodies. In A, typical blots are depicted; in B-E the quantification of bands is graphically represented. *p<0.05 vs. lean.

Figure 2. PGC-1 α expression in distinct adipose tissue depots of mice. Samples containing 500 μ g total protein (A-D) or 25ngcDNA (E-G) from subcutaneous (SC), visceral (VI) or brown (BAT) adipose tissue depots from lean or obese mice were used in immunoprecipitation (A-D) or quantitative real-time PCR (E-G) experiments. In A-D, samples were immunoprecipitated employing anti-PGC-1 α as primary antibody. The immunoprecipitation procedure used antibodies sufficient to immunodeplete the sample. The immunoprecipitates were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted with anti-PGC-1 α antibody. In A, typical blots are depicted; in B-D the quantification of bands is graphically represented. In E-G, the quantification of PGC-1 α mRNA obtained by quantitative real-time PCR is represented graphically. In all experiments n=5-6, *p<0.05 vs. lean.

Figure 3. A20 expression in distinct adipose tissue depots of mice. Samples containing 500 μ g total protein (A-D) or 25ngcDNA (E-G) from subcutaneous (SC), visceral (VI) or brown (BAT) adipose tissue depots from lean or obese mice were used in immunoprecipitation (A-D) or quantitative real-time PCR (E-G) experiments. In A-D, samples were immunoprecipitated employing anti-A20 as primary antibody. The immunoprecipitation procedure used antibodies sufficient to immunodeplete the sample. The immunoprecipitates were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted with anti-A20 antibody. In A, typical blots are

depicted; in B-D the quantification of bands is graphically represented. In E-G, the quantification of A20 mRNA obtained by quantitative real-time PCR is represented graphically. In all experiments n=6, *p<0.05 vs. lean.

Figure 4. PGC-1 α association with ubiquitin and A20 in distinct adipose tissue depots of mice.

Samples containing 500 μ g total protein from subcutaneous (SC), visceral (VI) or brown (BAT) adipose tissue depots from lean or obese mice were used in immunoprecipitation experiments employing anti-PGC-1 α as primary antibody. The immunoprecipitation procedure used antibodies sufficient to immunodeplete the sample. The immunoprecipitates were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted with anti-ubiquitin (A-D) or anti-A20 (E-H) antibodies. In A and E, typical blots are depicted; in B-D and F-H the quantification of bands is graphically represented. In all experiments n=5-6, *p<0.05 vs. lean.

Figure 5. Immunofluorescence evaluation of the co-localizations of PGC-1 α with ubiquitin and A20.

Subcutaneous (SC), visceral (VI) or brown (BAT) adipose tissue specimens from obese mice were used in immunofluorescence assays to detect the presence and co-localizations of PGC-1 α and ubiquitin (Ubi) (A) and PGC-1 α and A20 (B). Figures are typical representations obtained from a total of 2 experiments.

Figure 6. Inhibiting A20 expression.

Obese Swiss mice were treated once a day, for seven days, with a single intraperitoneal injection of a 100 μ l solution containing either A20 antisense (ASO) or scrambled (SCR) oligonucleotide. Fragments from subcutaneous (SC) (A-E), visceral (VI) (F-H) or brown (BAT) (I-K) adipose tissue were employed in quantitative real-time PCR experiments. In A and B, A20 (A) and PGC-1 α (B) expressions were evaluated in a dose-response experiment to determine the efficiency of the method. The amount of ASO per dose is depicted; SCR dose was 2

nmol/dose. In C-Q, the doses of ASO and SCR employed were 2 nmol/dose. In C-K, the expressions of A20 (C, F, I); PGC-1 α (D, G, J); and PPAR γ (E, H, K) were determined and are represented graphically. Cumulative (seven days) food intake in grams (L) and kCal (M), body mass change in seven days (N), fasting glucose levels (at the end of the experimental period) (O) and blood glucose levels during a glucose tolerance test (P and Q) are represented graphically. In all experiments n=8; *p<0.05 vs. SCR.

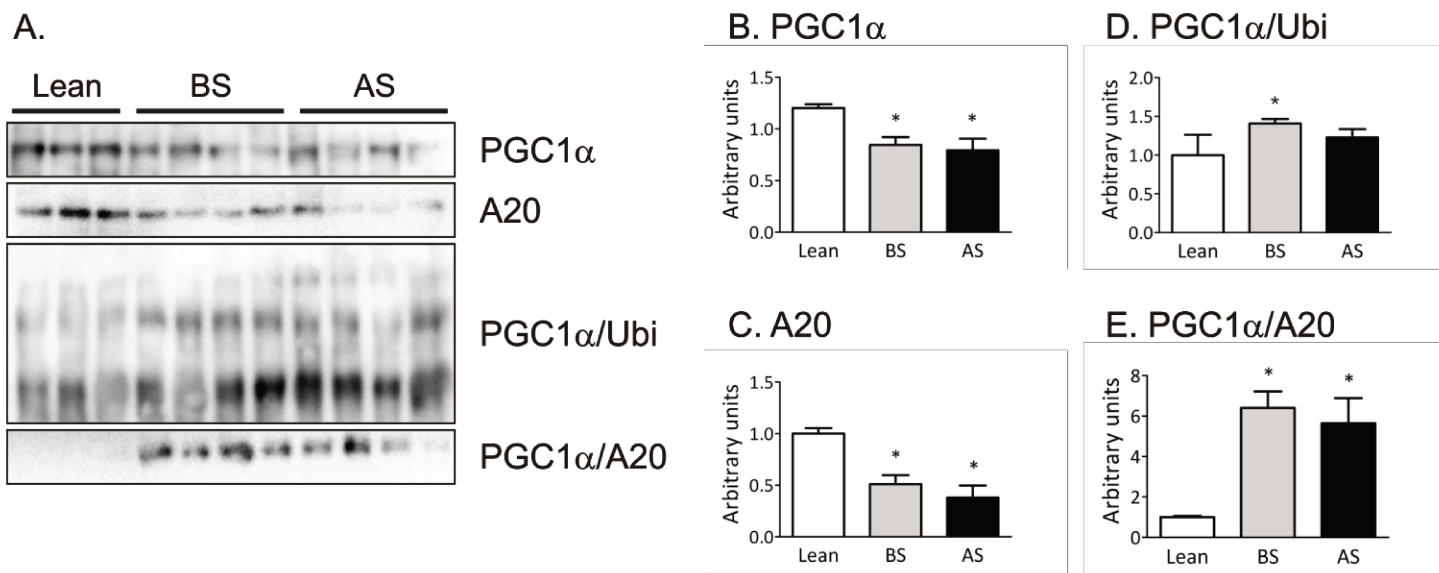


Figure 1

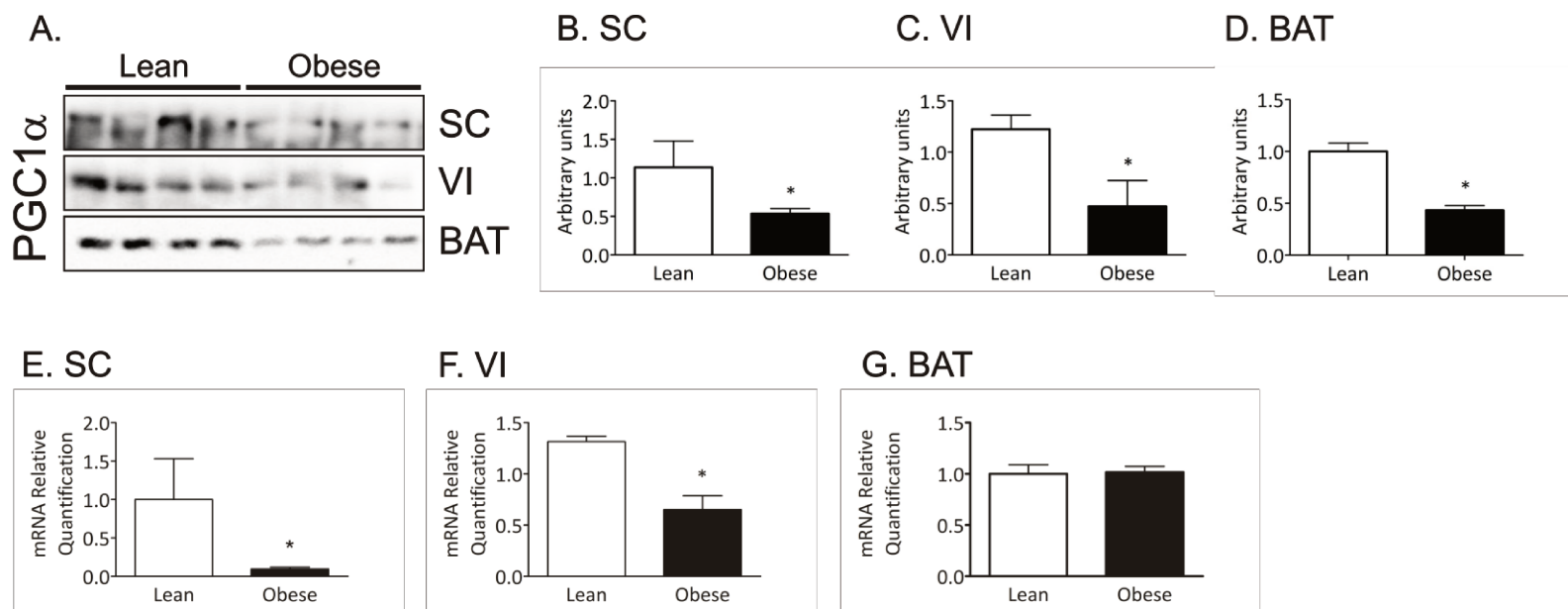


Figure 2

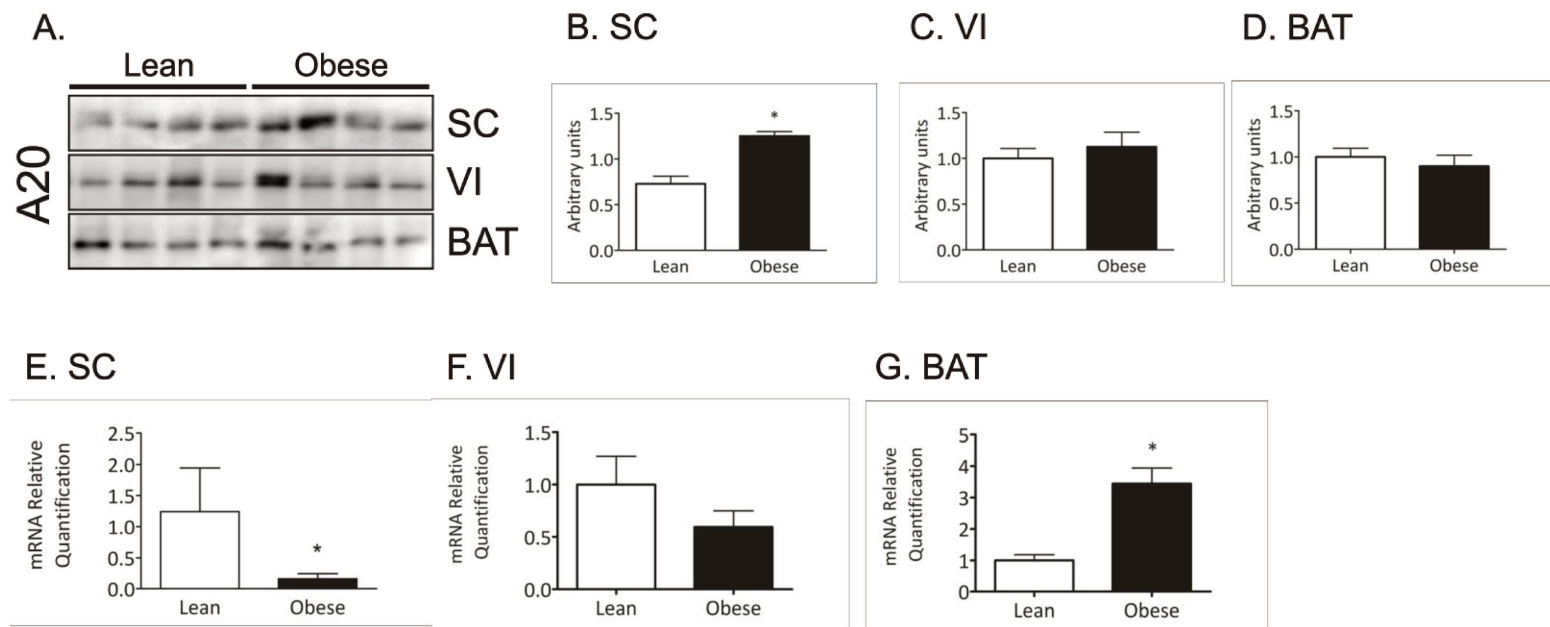


Figure 3

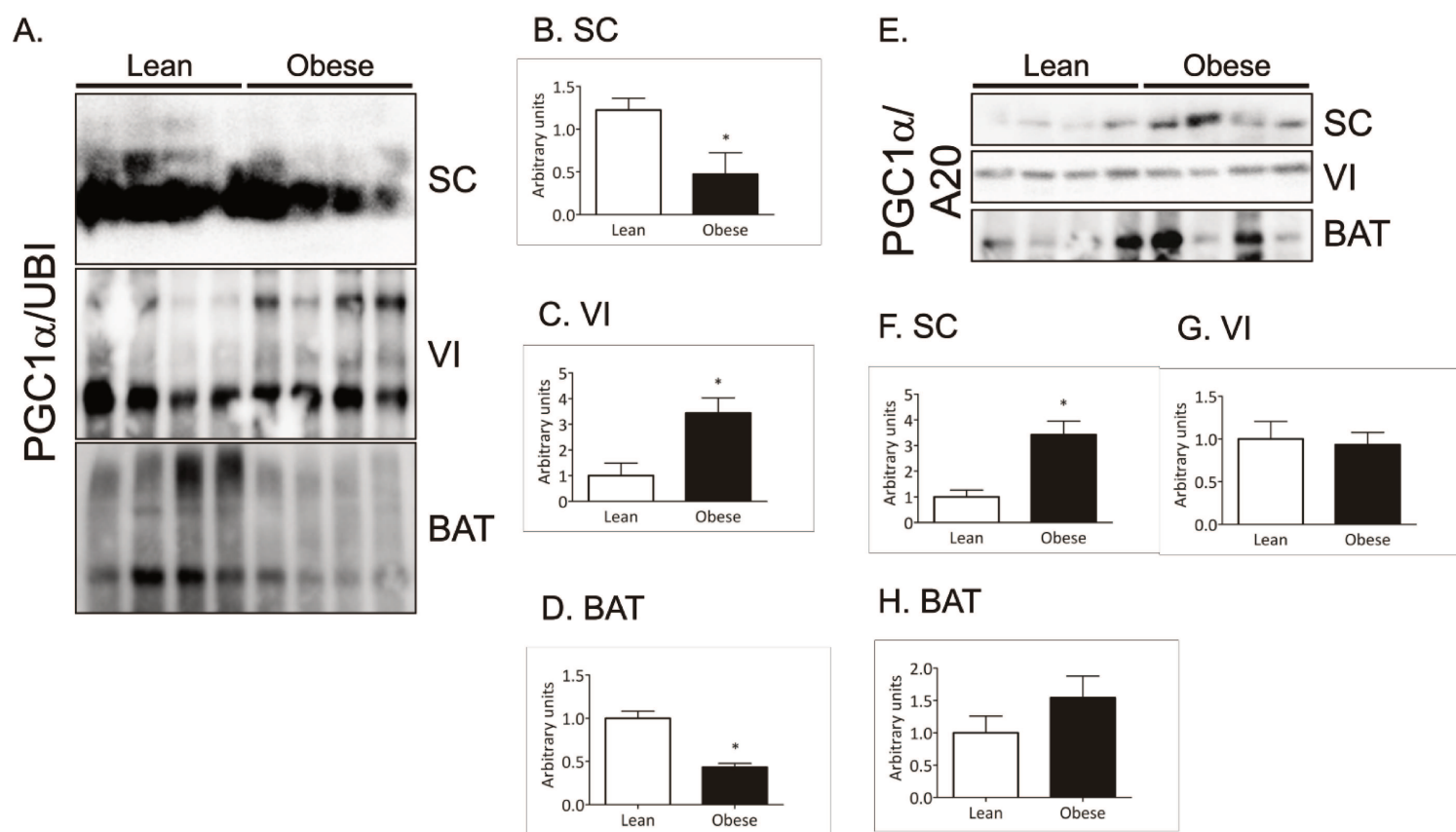
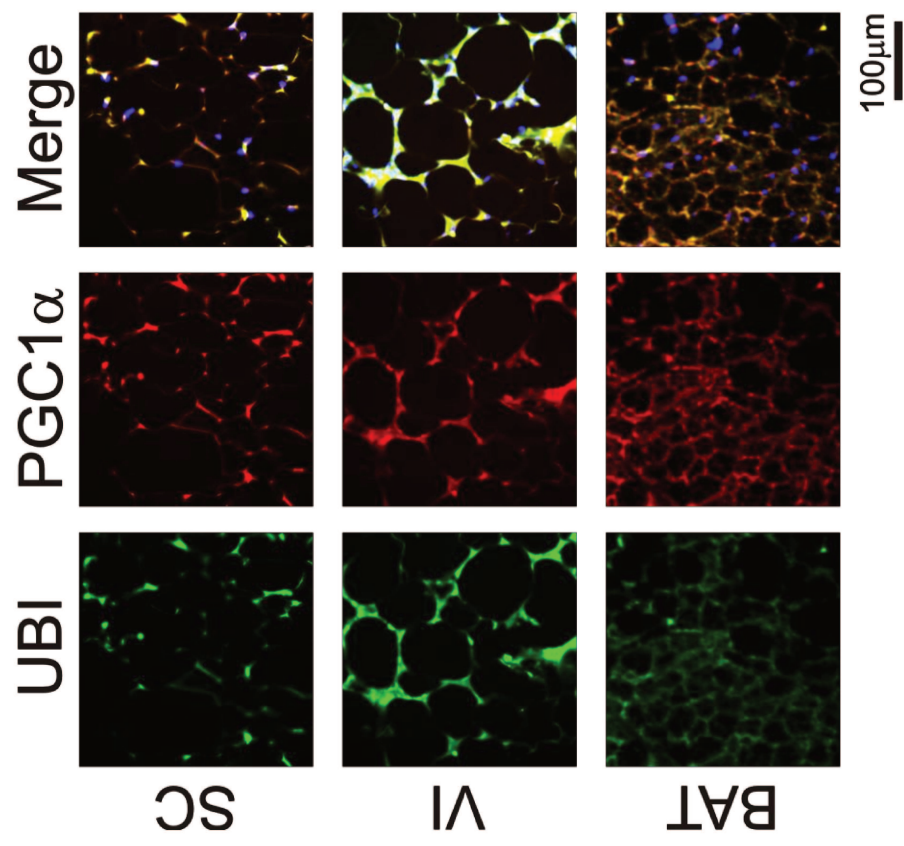


Figure 4

A.



B.

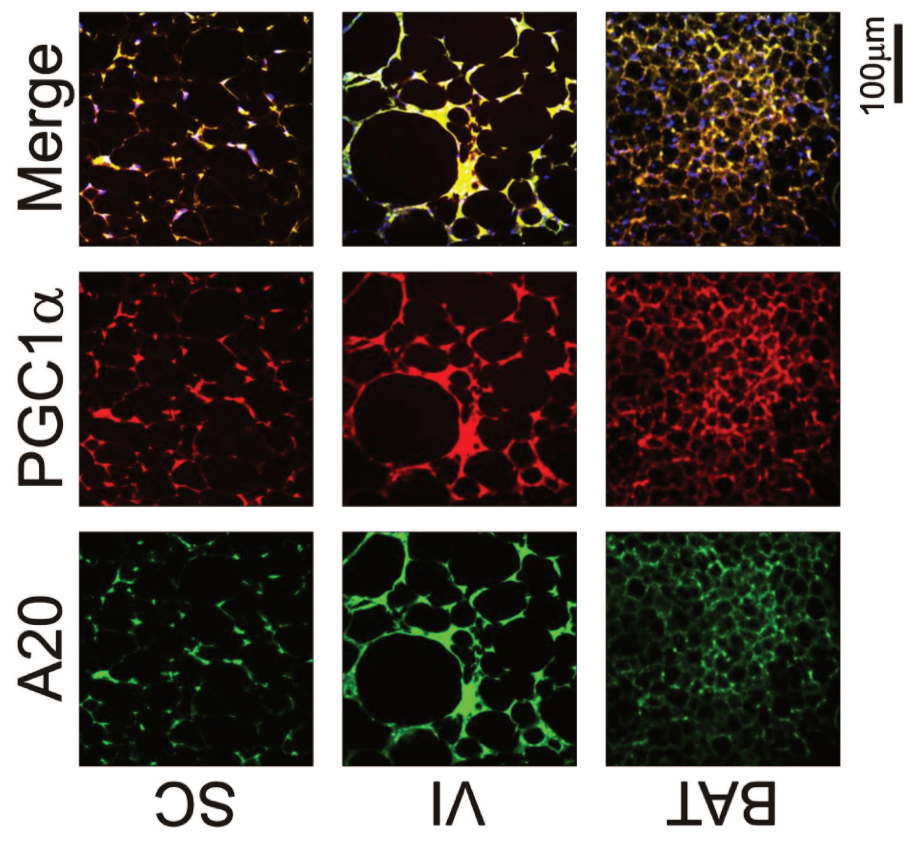


Figure 5

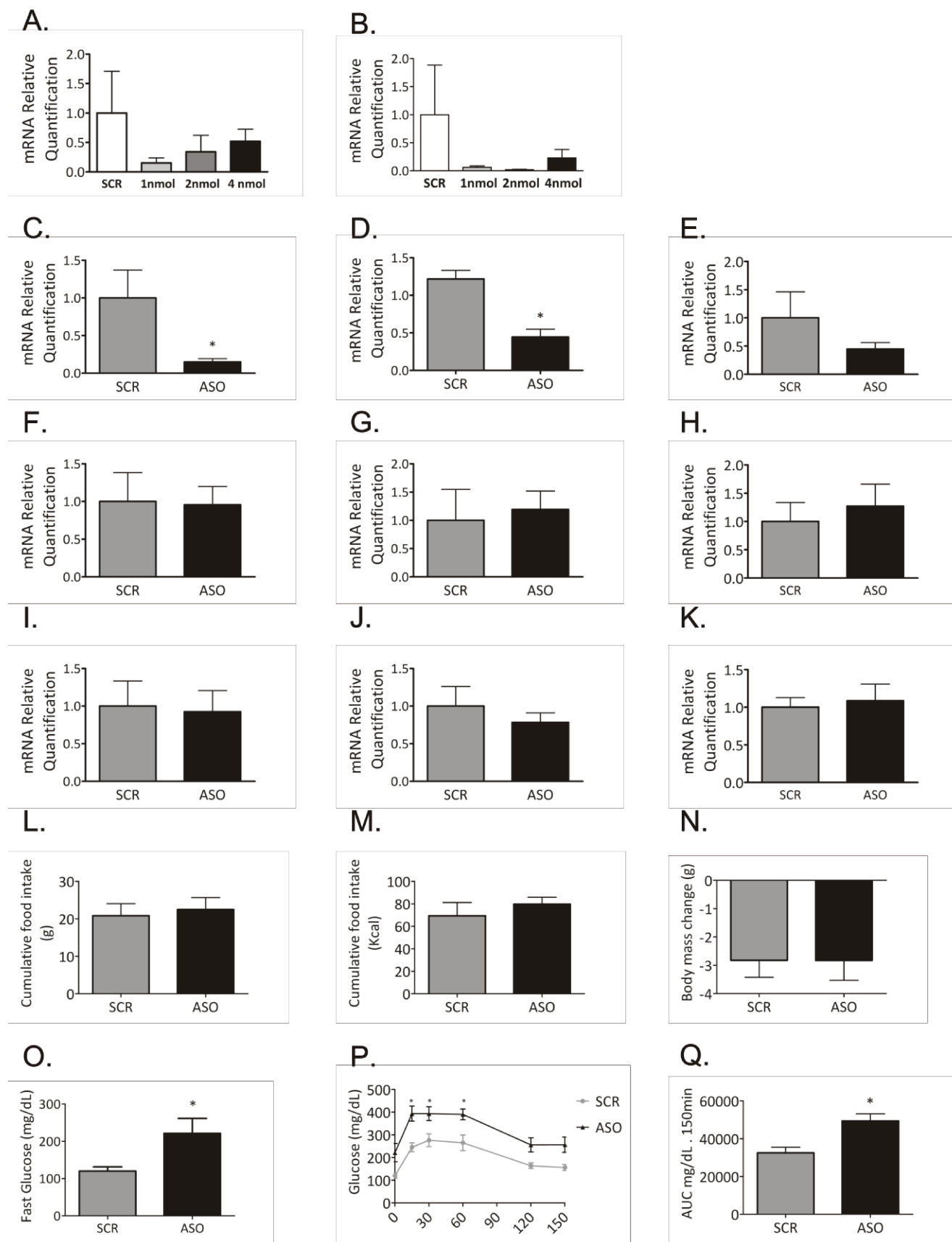


Figure 6

REFERÊNCIAS

- Ajuwon, K. M. and M. E. Spurlock (2005). "Palmitate activates the NF-kappaB transcription factor and induces IL-6 and TNFalpha expression in 3T3-L1 adipocytes." J Nutr **135**(8): 1841-1846.
- Almind, K., M. Manieri, W. I. Sivitz, S. Cinti and C. R. Kahn (2007). "Ectopic brown adipose tissue in muscle provides a mechanism for differences in risk of metabolic syndrome in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(7): 2366-2371.
- Anand, B. K. and J. R. Brobeck (1951). "Localization of a "feeding center" in the hypothalamus of the rat." Proc Soc Exp Biol Med **77**(2): 323-324.
- Baar, K., A. R. Wende, T. E. Jones, M. Marison, L. A. Nolte, M. Chen, D. P. Kelly and J. O. Holloszy (2002). "Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1." FASEB J **16**(14): 1879-1886.
- Bhoj, V. G. and Z. J. Chen (2009). "Ubiquitylation in innate and adaptive immunity." Nature **458**(7237): 430-437.
- Bluher, M., C. J. Williams, N. Kloting, A. Hsi, K. Ruschke, A. Oberbach, M. Fasshauer, J. Berndt, M. R. Schon, A. Wolk, M. Stumvoll and C. S. Mantzoros (2007). "Gene expression of adiponectin receptors in human visceral and subcutaneous adipose tissue is related to insulin resistance and metabolic parameters and is altered in response to physical training." Diabetes Care **30**(12): 3110-3115.
- Chen, Z. J. (2005). "Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway." Nat Cell Biol **7**(8): 758-765.
- Cinti, S. (2005). "The adipose organ." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **73**(1): 9-15.
- Cinti, S. (2009). "Transdifferentiation properties of adipocytes in the adipose organ." Am J Physiol Endocrinol Metab **297**(5): E977-986.
- Danaei, G., E. L. Ding, D. Mozaffarian, B. Taylor, J. Rehm, C. J. Murray and M. Ezzati (2009). "The preventable causes of death in the United States: comparative risk assessment of dietary, lifestyle, and metabolic risk factors." PLoS Med **6**(4): e1000058.
- De Souza, C. T., E. P. Araujo, S. Bordin, R. Ashimine, R. L. Zollner, A. C. Boschero, M. J. Saad and L. A. Velloso (2005). "Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus." Endocrinology **146**(10): 4192-4199.
- Dixit, V. M., S. Green, V. Sarma, L. B. Holzman, F. W. Wolf, K. O'Rourke, P. A. Ward, E. V. Prochownik and R. M. Marks (1990). "Tumor necrosis factor-alpha induction of novel gene products in human endothelial cells including a macrophage-specific chemotaxin." J Biol Chem **265**(5): 2973-2978.

Finkelstein, E. A., J. G. Trogon, J. W. Cohen and W. Dietz (2009). "Annual medical spending attributable to obesity: payer-and service-specific estimates." Health Aff (Millwood) **28**(5): w822-831.

Flegal, K. M., M. D. Carroll, B. K. Kit and C. L. Ogden (2012). "Prevalence of obesity and trends in the distribution of body mass index among US adults, 1999-2010." JAMA **307**(5): 491-497.

Fonseca-Alaniz, M. H., J. Takada, M. I. C. Alonso-Vale and F. B. Lima (2006). "The Adipose Tissue as a Regulatory Center of the Metabolism." Arq Bras Endocrinol Metabol **50**(2): 23.

Ghorbani, M., T. H. Claus and J. Himms-Hagen (1997). "Hypertrophy of brown adipocytes in brown and white adipose tissues and reversal of diet-induced obesity in rats treated with a beta3-adrenoceptor agonist." Biochem Pharmacol **54**(1): 121-131.

Grey, S. T., M. B. Arvelo, W. Hasenkamp, F. H. Bach and C. Ferran (1999). "A20 inhibits cytokine-induced apoptosis and nuclear factor kappaB-dependent gene activation in islets." J Exp Med **190**(8): 1135-1146.

Guo, Z., D. D. Hensrud, C. M. Johnson and M. D. Jensen (1999). "Regional postprandial fatty acid metabolism in different obesity phenotypes." Diabetes **48**(8): 1586-1592.

Hammarstedt, A., P. A. Jansson, C. Wesslau, X. Yang and U. Smith (2003). "Reduced expression of PGC-1 and insulin-signaling molecules in adipose tissue is associated with insulin resistance." Biochem Biophys Res Commun **301**(2): 578-582.

Hershko, A. and A. Ciechanover (1998). "The ubiquitin system." Annu Rev Biochem **67**: 425-479.

Herzig, S., F. Long, U. S. Jhala, S. Hedrick, R. Quinn, A. Bauer, D. Rudolph, G. Schutz, C. Yoon, P. Puigserver, B. Spiegelman and M. Montminy (2001). "CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1." Nature **413**(6852): 179-183.

Hetherington, A. W. and S. W. Ranson (1940). "Hypothalamic Lesions And Adiposity In The Rat." The Anatomical Research **78**(2): 23.

Hotamisligil, G. S. (2006). "Inflammation and metabolic disorders." Nature **444**(7121): 860-867.

Hotamisligil, G. S., N. S. Shargill and B. M. Spiegelman (1993). "Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance." Science **259**(5091): 87-91.

Huang, E. S., A. Basu, M. O'Grady and J. C. Capretta (2009). "Projecting the future diabetes population size and related costs for the U.S." Diabetes Care **32**(12): 2225-2229.

Juge-Aubry, C. E., E. Henrichot and C. A. Meier (2005). "Adipose tissue: a regulator of inflammation." Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **19**(4): 547-566.

Kearney, J. (2010). "Food consumption trends and drivers." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **365**(1554): 2793-2807.

Klein, S., L. Fontana, V. L. Young, A. R. Coggan, C. Kilo, B. W. Patterson and B. S. Mohammed (2004). "Absence of an effect of liposuction on insulin action and risk factors for coronary heart disease." N Engl J Med **350**(25): 2549-2557.

Kleiner, S., R. J. Mepani, D. Laznik, L. Ye, M. J. Jurczak, F. R. Jornayvaz, J. L. Estall, D. Chatterjee Bhowmick, G. I. Shulman and B. M. Spiegelman (2012). "Development of insulin resistance in mice lacking PGC-1alpha in adipose tissues." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(24): 9635-9640.

Lafontan, M. (2008). "Advances in adipose tissue metabolism." Int J Obes (Lond) **32 Suppl 7**: S39-51.

Le, K. A., S. Mahurkar, T. L. Alderete, R. E. Hasson, T. C. Adam, J. S. Kim, E. Beale, C. Xie, A. S. Greenberg, H. Allayee and M. I. Goran (2011). "Subcutaneous adipose tissue macrophage infiltration is associated with hepatic and visceral fat deposition, hyperinsulinemia, and stimulation of NF-kappaB stress pathway." Diabetes **60**(11): 2802-2809.

Liszka, T. G., A. L. Dellon, M. Im, M. F. Angel and L. Plotnick (1998). "Effect of lipectomy on growth and development of hyperinsulinemia and hyperlipidemia in the Zucker rat." Plast Reconstr Surg **102**(4): 1122-1127.

Lu, Y. and D. Goldman (2010). "The Effects of Relative Food Prices on Obesity — Evidence From China: 1991-2006." NBER WORKING PAPER SERIES **15720**: 40.

Ma, A. and B. A. Malynn (2012). "A20: linking a complex regulator of ubiquitylation to immunity and human disease." Nat Rev Immunol **12**(11): 774-785.

Marin, P., B. Andersson, M. Ottosson, L. Olbe, B. Chowdhury, H. Kvist, G. Holm, L. Sjostrom and P. Bjorntorp (1992). "The morphology and metabolism of intraabdominal adipose tissue in men." Metabolism **41**(11): 1242-1248.

Matthews, J. N., D. G. Altman, M. J. Campbell and P. Royston (1990). "Analysis of serial measurements in medical research." BMJ **300**(6719): 230-235.

Medina, E. A., R. R. Afsari, T. Ravid, S. S. Castillo, K. L. Erickson and T. Goldkorn (2005). "Tumor necrosis factor- α decreases Akt protein levels in 3T3-L1 adipocytes via the caspase-dependent ubiquitination of Akt." Endocrinology **146**(6): 2726-2735.

Michael, L. F., Z. Wu, R. B. Cheatham, P. Puigserver, G. Adelmant, J. J. Lehman, D. P. Kelly and B. M. Spiegelman (2001). "Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(7): 3820-3825.

Morton, G. J., D. E. Cummings, D. G. Baskin, G. S. Barsh and M. W. Schwartz (2006). "Central nervous system control of food intake and body weight." Nature **443**(7109): 289-295.

Munzberg, H. and M. G. Myers, Jr. (2005). "Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance." Nat Neurosci **8**(5): 566-570.

Musone, S. L., K. E. Taylor, T. T. Lu, J. Nititham, R. C. Ferreira, W. Ortmann, N. Shifrin, M. A. Petri, M. I. Kamboh, S. Manzi, M. F. Seldin, P. K. Gregersen, T. W. Behrens, A. Ma, P. Y. Kwok and L. A. Criswell (2008). "Multiple polymorphisms in the TNFAIP3 region are independently associated with systemic lupus erythematosus." Nat Genet **40**(9): 1062-1064.

Nishimura, S., I. Manabe and R. Nagai (2009). "Adipose Tissue Inflammation in Obesity and Metabolic Syndrome." Discovery Medicine **8**(41): 5.

Niswender, K. D., D. G. Baskin and M. W. Schwartz (2004). "Insulin and its evolving partnership with leptin in the hypothalamic control of energy homeostasis." Trends Endocrinol Metab **15**(8): 362-369.

O'Rourke, R. W., M. D. Metcalf, A. E. White, A. Madala, B. R. Winters, Maizlin, II, B. A. Jobe, C. T. Roberts, Jr., M. K. Slifka and D. L. Marks (2009). "Depot-specific differences in inflammatory mediators and a role for NK cells and IFN-gamma in inflammation in human adipose tissue." Int J Obes (Lond) **33**(9): 978-990.

Ohno, H., K. Shinoda, B. M. Spiegelman and S. Kajimura (2012). "PPARgamma agonists induce a white-to-brown fat conversion through stabilization of PRDM16 protein." Cell Metab **15**(3): 395-404.

Pickart, C. M. (2001). "Mechanisms underlying ubiquitination." Annu Rev Biochem **70**: 503-533.

Pirola, L., A. M. Johnston and E. Van Obberghen (2004). "Modulation of insulin action." Diabetologia **47**(2): 170-184.

Puigserver, P., J. Rhee, J. Lin, Z. Wu, J. C. Yoon, C. Y. Zhang, S. Krauss, V. K. Mootha, B. B. Lowell and B. M. Spiegelman (2001). "Cytokine stimulation of energy expenditure through p38 MAP kinase activation of PPARgamma coactivator-1." Mol Cell **8**(5): 971-982.

Puigserver, P. and B. M. Spiegelman (2003). "Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Coactivator 1alpha(PGC-1alpha): Transcriptional Coactivator and Metabolic Regulator." Endocrine Reviews **24**(1): 12.

Puigserver, P., Z. Wu, C. W. Park, R. Graves, M. Wright and B. M. Spiegelman (1998). "A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis." Cell **92**(6): 829-839.

Puoane, T., K. Steyn, D. Bradshaw, R. Laubscher, J. Fourie, V. Lambert and N. Mbananga (2002). "Obesity in South Africa: the South African demographic and health survey." Obes Res **10**(10): 1038-1048.

Rosen, E. D., P. Sarraf, A. E. Troy, G. Bradwin, K. Moore, D. S. Milstone, B. M. Spiegelman and R. M. Mortensen (1999). "PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro." Mol Cell **4**(4): 611-617.

Rui, L., M. Yuan, D. Frantz, S. Shoelson and M. F. White (2002). "SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2." J Biol Chem **277**(44): 42394-42398.

Saúde, M. d. (2012). VIGITEL BRASIL 2011 Vigilância De Fatores De Risco E Proteção Para Doenças Crônicas Por Inquérito Telefônico. S. G. E. e. I. e. Saúde. Brasília (BRA), Ministério da Saúde Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Análise de Situação de Saúde: 134.

Seale, P., H. M. Conroe, J. Estall, S. Kajimura, A. Frontini, J. Ishibashi, P. Cohen, S. Cinti and B. M. Spiegelman (2011). "Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice." J Clin Invest **121**(1): 96-105.

Semple, R. K., V. C. Crowley, C. P. Sewter, M. Laudes, C. Christodoulides, R. V. Considine, A. Vidal-Puig and S. O'Rahilly (2004). "Expression of the thermogenic nuclear hormone receptor coactivator PGC-1 α is reduced in the adipose tissue of morbidly obese subjects." Int J Obes Relat Metab Disord. **28**(1): 3.

Sewter, C. P., F. Blows, A. Vidal-Puig and S. O'Rahilly (2002). "Regional differences in the response of human pre-adipocytes to PPAR γ and RXR α agonists." Diabetes **51**(3): 718-723.

Shi, C. S. and J. H. Kehrl (2010). "TRAF6 and A20 regulate lysine 63-linked ubiquitination of Beclin-1 to control TLR4-induced autophagy." Sci Signal **3**(123): ra42.

Snijder, M. B., J. M. Dekker, M. Visser, L. M. Bouter, C. D. Stehouwer, P. J. Kostense, J. S. Yudkin, R. J. Heine, G. Nijpels and J. C. Seidell (2003). "Associations of hip and thigh circumferences independent of waist circumference with the incidence of type 2 diabetes: the Hoorn Study." Am J Clin Nutr **77**(5): 1192-1197.

Steppan, C. M. and M. A. Lazar (2002). "Resistin and obesity-associated insulin resistance." Trends Endocrinol Metab **13**(1): 18-23.

Sun, X. J., J. L. Goldberg, L. Y. Qiao and J. J. Mitchell (1999). "Insulin-induced insulin receptor substrate-1 degradation is mediated by the proteasome degradation pathway." Diabetes **48**(7): 1359-1364.

Swinburn, B. A., G. Sacks, K. D. Hall, K. McPherson, D. T. Finegood, M. L. Moodie and S. L. Gortmaker (2011). "The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments." Lancet **378**(9793): 804-814.

Thorne, A., F. Lonnqvist, J. Aelman, G. Hellers and P. Arner (2002). "A pilot study of long-term effects of a novel obesity treatment: omentectomy in connection with adjustable gastric banding." Int J Obes Relat Metab Disord **26**(2): 193-199.

Tran, T. T. and C. R. Kahn (2010). "Transplantation of adipose tissue and stem cells: role in metabolism and disease." Nat Rev Endocrinol **6**(4): 195-213.

Trausch-Azar, J., T. C. Leone, D. P. Kelly and A. L. Schwartz (2010). "Ubiquitin proteasome-dependent degradation of the transcriptional coactivator PGC-1 α via the N-terminal pathway." J Biol Chem **285**(51): 40192-40200.

- Velloso, L. A., E. P. Araujo and C. T. De Souza (2008). "Diet-Induced Inflammation of the Hypothalamus in Obesity." Neuroimmunomodulation **15**: 4.
- Vereecke, L., R. Beyaert and G. van Loo (2009). "The ubiquitin-editing enzyme A20 (TNFAIP3) is a central regulator of immunopathology." Trends Immunol **30**(8): 383-391.
- Wei, P., D. Pan, C. Mao and Y. X. Wang (2012). "RNF34 is a cold-regulated E3 ubiquitin ligase for PGC-1alpha and modulates brown fat cell metabolism." Mol Cell Biol **32**(2): 266-275.
- Wertz, I. E., K. M. O'Rourke, H. Zhou, M. Eby, L. Aravind, S. Seshagiri, P. Wu, C. Wiesmann, R. Baker, D. L. Boone, A. Ma, E. V. Koonin and V. M. Dixit (2004). "De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling." Nature **430**(7000): 694-699.
- Wing, S. S. (2008). "The UPS in diabetes and obesity." BMC Biochem **9 Suppl 1**: S6.
- Wolfrum, S., D. Teupser, M. Tan, K. Y. Chen and J. L. Breslow (2007). "The protective effect of A20 on atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice is associated with reduced expression of NF-kappaB target genes." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(47): 18601-18606.
- Wozniak, S. E., L. L. Gee, M. S. Wachtel and E. E. Frezza (2009). "Adipose tissue: the new endocrine organ? A review article." Dig Dis Sci **54**(9): 1847-1856.
- Xu, H., G. T. Barnes, Q. Yang, G. Tan, D. Yang, C. J. Chou, J. Sole, A. Nichols, J. S. Ross, L. A. Tartaglia and H. Chen (2003). "Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance." J Clin Invest **112**(12): 1821-1830.
- Yoon, J. C., P. Puigserver, G. Chen, J. Donovan, Z. Wu, J. Rhee, G. Adelmant, J. Stafford, C. R. Kahn, D. K. Granner, C. B. Newgard and B. M. Spiegelman (2001). "Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1." Nature **413**(6852): 131-138.
- Zhande, R., J. J. Mitchell, J. Wu and X. J. Sun (2002). "Molecular mechanism of insulin-induced degradation of insulin receptor substrate 1." Mol Cell Biol **22**(4): 1016-1026.

APÊNDICE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome: _____

RG: _____

PROJETO DE PESQUISA: Avaliação do envolvimento da deubiquitinase A20 no controle da inflamação em tecido adiposo de obesos

RESPONSÁVEL PELA PESQUISA: Bruna Bombassaro

Esta pesquisa tem por objetivo analisar alterações no organismo de pacientes obesos e suas possíveis causas, devido ao crescente aumento da obesidade. Além disso, é sabido que a obesidade associa-se a inúmeras doenças, como a hipertensão arterial e o diabetes mellitus tipo II.

Um pequeno fragmento de tecido adiposo (logo abaixo da pele) será retirado pelo cirurgião responsável que estará realizando a cirurgia, bem como uma pequena amostra de sangue. O tecido coletado terá em torno de 1cm³, o que não causará mudança na aparência do abdômen. A gordura será retirada da própria incisão realizada pelo médico responsável para a manipulação requerida na cirurgia, evitando assim qualquer corte desnecessário. Tanto esse procedimento quanto a retirada do sangue, não apresentam riscos e não levarão a alterações no resultado da cirurgia.

Você pode escolher participar da coleta do material e que este seja usado apenas nesta pesquisa, ou que este material seja armazenado e usado também em outras pesquisas. Caso você concorde em armazenar, o armazenamento segue as diretrizes do CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE, RESOLUÇÃO Nº 347, DE 13 DE JANEIRO DE 2005.

A não participação nesse projeto não acarreta mudanças ou prejuízo no tratamento oferecido no Hospital de Clínicas da Unicamp. Você tem total liberdade para aceitar participar ou não da pesquisa. Como não haverá gastos com sua participação na pesquisa, não haverá ressarcimento. Nas pesquisas, sua identidade será mantida em sigilo.

Eu _____, portador(a)
do RG _____ declaro que li e aceito os termos aqui definidos, bem como é de livre
vontade que participo deste projeto.

Declaro que _____ (aceito/não aceito) o armazenamento do material
para estudos futuros.

Assinatura do Paciente

Em caso de dúvidas entre em contato com o pesquisador :

Bruna Bombassaro

(19) 8173-8263

- Gastrocentro – UNICAMP - Laboratório de Gastroenterologia Experimental
Rua Carlos Chagas, 420 Cidade Universitária Telefone: 3521-8592
- Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental – Laboratório de Sinalização Celular.
Rua 05 de junho Telefone: 3521-7191

Comitê de Ética em Pesquisa

Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126 - Caixa Postal 6111 13083-887 Campinas – SP

Fone (019) 3521-8936 Fax (019) 3521-7187

e-mail: cep@fcm.unicamp.br