

CLAUDIO TEODORO DE SOUZA

***CO-ATIVADOR-1 α DO RECEPTOR ATIVADO POR PROLIFERADOR
DO PEROXISSOMA (PGC-1 α); UM CO-ATIVADOR DE TRANSCRIÇÃO
GÊNICA ENVOLVIDO COM O CONTROLE DA SECREÇÃO E AÇÃO
PERIFÉRICA DA INSULINA***

CAMPINAS

2005



CLAUDIO TEODORO DE SOUZA

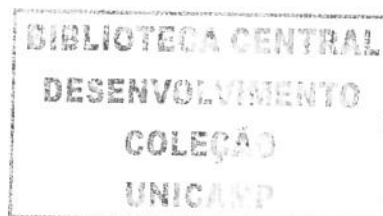
***CO-ATIVADOR-1 α DO RECEPTOR ATIVADO POR PROLIFERADOR
DO PEROXISSOMA (PGC-1 α): UM CO-ATIVADOR DE TRANSCRIÇÃO
GÊNICA ENVOLVIDO COM O CONTROLE DA SECREÇÃO E AÇÃO
PERIFÉRICA DA INSULINA***

Tese de Doutorado apresentada a Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para a obtenção do título de Doutor em Clínica
Médica, área Ciências Básicas

Orientador: Prof. Dr. Lício Augusto Velloso

CAMPINAS

2005



UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	
	f/v N1 UNIP
	2089c
V	EX
TOMBO BC/	53840
PROC.	16-86-05
C	☐
D	☒
PREÇO	12,00
DATA	18/10/05
Nº CPD	

BIBID- 366282

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA

BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

So89c

De Souza, Claudio Teodoro

Co-ativador-1 α do receptor ativado por proliferador do peroxissoma (PGC-1 α): um co-ativador de transcrição gênica envolvido com o controle da secreção e ação periférica da insulina / Claudio Teodoro de Souza. Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientador: Lício Augusto Velloso

Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Insulina - secreção. 2. Mitocôndrias - metabolismo. 3. Diabetes. 4. Resistência à insulina. I. Velloso, Lício Augusto. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

(slp/fcm)

.....

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO

.....

.....

Orientador: Prof. Dr. Lício Augusto Velloso

.....

Membros:

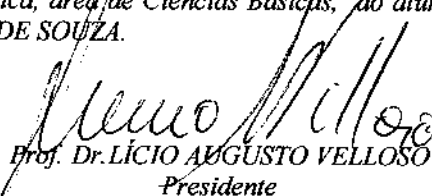
Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini

Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner

Prof. Dr. Ângelo Rafael Carpinelli

Prof^a. Dr^a. Silvana Auxiliadora Bordin da Silva

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Clínica Médica, área de Ciências Básicas, do aluno CLÁUDIO TEODORO DE SOUZA.


Prof. Dr. LÍCIO AUGUSTO VELLOSO
Presidente

**Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas,
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.**

Data 13/04/2005

DEDICO:

*A minha esposa Laura pelo amor, dedicação e paciência
nesta fase da minha vida e por estar ao
meu lado em todos os momentos, me
incentivando. Ao meu filho Théo
Gianolla e Souza que está por chegar,
mas que já é fonte de muita alegria e paz.
A meus pais pelo apoio e incentivo. Por me ensinarem a nunca
desistir. Obrigado pela estima e amor para
comigo!*

Amo vocês!!!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao grande amigo Licio Augusto Velloso pela serenidade e incrível disposição com que conduziu a orientação deste trabalho, pela irrestrita e incontestável contribuição para minha formação acadêmica e pela oportunidade de retribuir a confiança em mim depositada na realização deste estudo. Pela oportunidade de desfrutar de seus conhecimentos e da agradável convivência. Sinceramente, espero um dia poder retribuí-lo por todo o auxílio nesta fase da minha vida. Por hora só tenho a agradecer, MUITO OBRIGADO!!!

A todos os meus irmãos (totalizando 10 – muito não?!) que sempre me apoiaram e não pouparam carinho e amor, amo muito vocês!!!

Aos meus amigos Marcio Pereira e Eliana, pelas discussões acadêmicas, pelas disponibilidades e prestezas e colaborações no presente trabalho, além da agradável companhia e incontestável amizade, meu muito obrigado!!!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Mario José Abdalla Saad, pela colaboração e agradável convivência.

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Boschero, por abrir as portas de seu laboratório e permitir que vários experimentos contidos nessa tese pudessem ser realizados, e ainda, por sua agradável convivência.

Ao Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini e todos os integrantes de seu laboratório, por sempre atenderem de prontidão as necessidades de materiais quando preciso.

A todos os amigos do laboratório, Márcio Torosoni, Brahma, Henrique, Eli, Wilson, Hugo, Fernanda, Maristela, Graziela, Érika, Talita, Rachel, Patrícia Prada, Marcel, pelos momentos de convívio harmônico, pela descontração, pelas discussões e colaborações prestadas.

Aos amigos do departamento de Fisiologia e Biofísica (laboratório do professor Boschero), Fabiano, Fabrizio, Daniel, Helena, Eliane, Marise e Vanessa por estarem sempre prontos para ajudar no que fosse necessário, sem restrições.

Ao Departamento de Educação Física da Unesp de Rio Claro, nas pessoas de Eduardo Kokubun, Maria Alice Rostom de Mello e Clarice Sybua por terem me inserido “no mundo” da pesquisa.

Aos funcionários do laboratório, nas pessoas de Luís Janeri, Jósimo e Gerê, aos funcionários do biotério, em especial ao Márcio, muito obrigado pela disponibilidade, presteza e competência, e aos funcionários da Pós-Graduação e biblioteca, pela assistência e apoio técnico requisitados.

“A educação tem raízes que lhe são próprias, a nutrem, a sustentam, a querem, a engrandecem, a tornam útil e sublime; necessária e imprescindível. Porém, é sensível, quase indefesa porque pessoal; teme a sociedade, o coletivismo, as pertenças, que a envolvem e cercam, tirando-lhe a cor e brilho”.

João Rodrigues

SUMÁRIO

RESUMO.....	xxii
ABSTRACT.....	xxvii
1 – INTRODUÇÃO GERAL.....	17
2 – OBJETIVOS GERAIS.....	25
3 – MATERIAIS e MÉTODOS.....	27
3.1 – Caracterização dos Modelos.....	28
3.1.1 - Animais.....	28
3.1.2 - Avaliação metabólica, bioquímica e hormonal.....	29
3.2 – Protocolo Experimental.....	30
3.2.1 - Animais.....	30
3.2.2 – Denervação cirúrgica do vago e dos ramos paravertebrais simpáticos.....	31
3.2.3 – Oligonucleotídeo sense e antisense específicos.....	31
3.3 – Teste de tolerância intraperitoneal à glicose.....	32
3.4 – Teste de tolerância intraperitoneal à insulina.....	33
3.5 – Clamp hiperinsulinêmico-euglicêmico.....	33
3.6 – Método gravimétrico para determinação dos lipídeos hepáticos totais.....	34

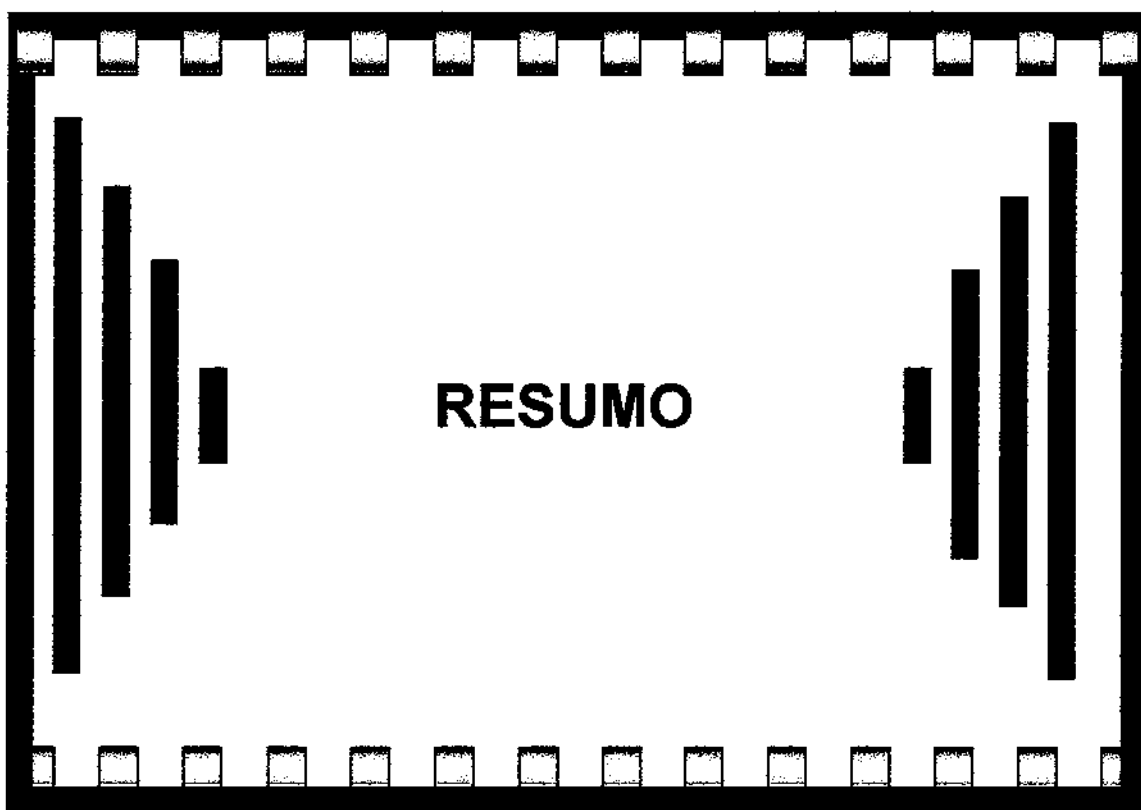
3.7 – Isolamentos das ilhotas pancreáticas.....	34
3.8 – Secreção estática de insulina.....	35
3.9 – Western blot e Imunoprecipitação.....	36
3.9.1 – Extração dos tecidos.....	36
3.9.2 Western blot.....	37
3.9.3 - Imunoprecipitação.....	38
3.10 – Histologia com coloração hematoxilina e eosina.....	39
3.11 - Imunohistoquímica.....	39
3.12 – Análise estatística.....	41
4 - CAPÍTULOS.....	42
4.1 – Artigo 1.....	43
4.2 – Artigo 2.....	54
5 – DISCUSSÃO GERAL.....	67
6 – CONCLUSÃO GERAL.....	81
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
8 – ANEXO.....	97

LISTA DE ABREVIATURAS

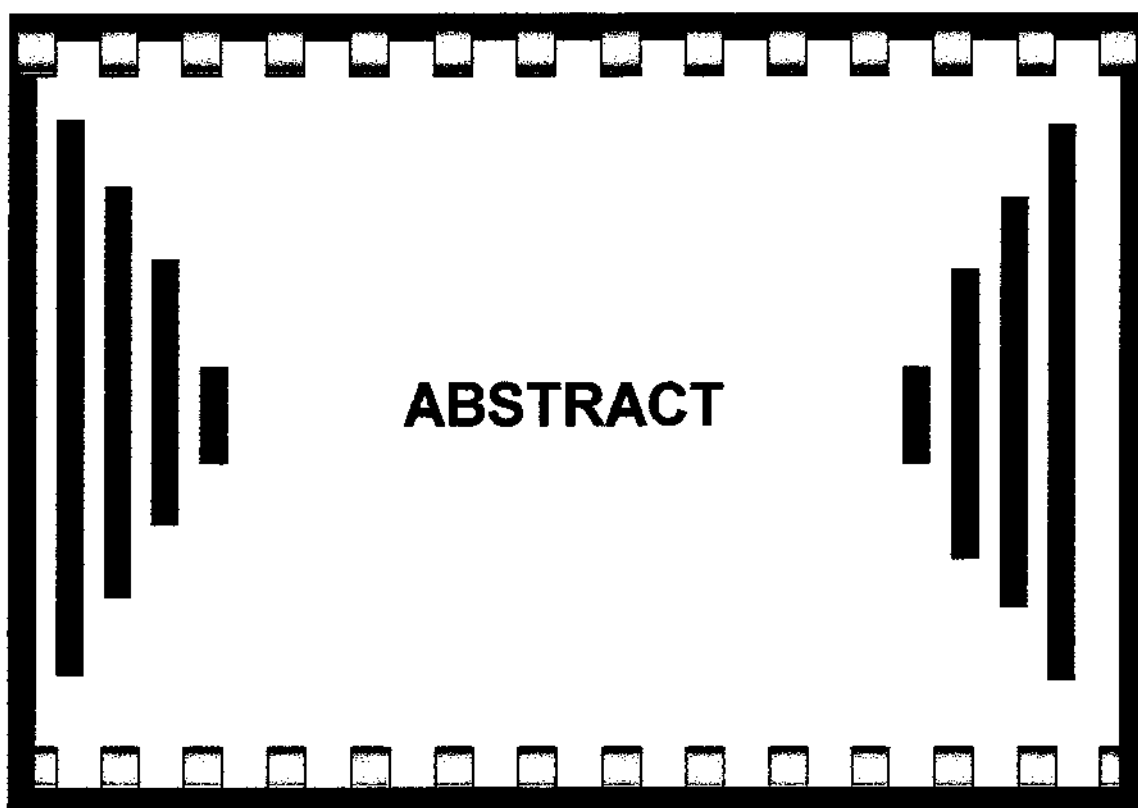
SIGLAS

$\Delta\mu H^+$	Potencial de gradiente eletroquímico de prótons
AC	Adenilil ciclase
ACC	Acetil carnitina carboxilase
ADP	Adenosina difosfato
AGL	Ácidos graxos livres
AKT/PKB	Proteína serina/treonina quinase B
AMP	Adenosina monofostato
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina bovina sérica
CPT-1	Carnitina palmitoil transferase
CREBP	Fator de transcrição ligado ao elemento responsivo do AMP cíclico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FAS	Ácido graxo sintase
FKHR (FOXO-1)	Fator de transcrição da família forkhead
HAT	Histona aciltransferase
HNF-4 α	Fator nuclear de hepatócito 4 α

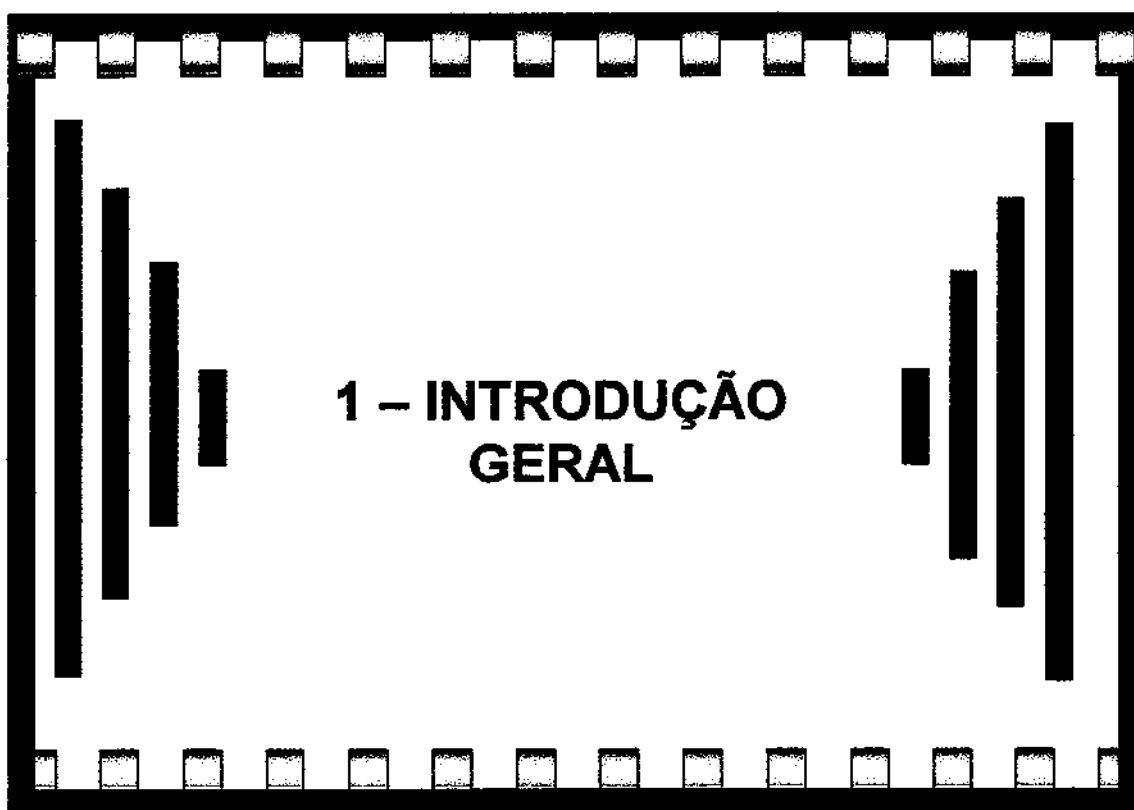
IP ₃	Inositol 3, 4, 5 trifosfato
IR	Receptor de insulina
K ⁺ _{ATP}	Canais de potássio sensíveis ao ATP
kDa	Quilodalton
<i>K_{itt}</i>	Constante de decaimento de glicose
MEF2-C	Fator -2 potencializador de miócito
NEFA	Ácidos graxos livres não esterificados
NRF	Fator respiratório nuclear
PGC-1 α	Co-ativador 1 α do receptor ativado por proliferador de peroxissoma
PI	Fosfoinositol
PLC	Fosfolipase C
PMSF	Fluoreto de fenilmetil sulfonila
PPAR α	Receptor α ativado por proliferador de peroxissoma
PPAR γ	Receptor γ ativado por proliferador de peroxissoma
RNA	Ácido ribonucleico
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SRC-1	Coativador -1 do receptor de esteróide
SREBP-1c	Proteína ligadora -1c do elemento regulador de esteróide
TRB-3	Proteína <i>tribbles</i> , inibidora natural da AKT
Tris	Tri(hidroximetil)-aminometano
TSH	Hormônio tireo-estimulante
UCP-2	Proteína desacopladora mitocondrial -2



Diabetes mellitus tipo 2 é uma doença de etiologia multifatorial que resulta da confluência de pelo menos dois fenômenos distintos, resistência à ação e falência na produção de insulina. Evidências recentes tem sugerido que mecanismos comuns podem participar dos eventos que precipitam o desenvolvimento tanto da resistência à insulina quanto da falência da célula beta pancreática. A caracterização destes eventos pode abrir perspectivas para abordagens terapêuticas unificadas visando corrigir simultaneamente os dois mais importantes distúrbios que participam da gênese desta doença. A proteína co-ativador 1α do receptor ativado por proliferador de peroxissoma, ou PGC- 1α , cumpre alguns requisitos que permitem sua inclusão numa lista de possíveis participantes nos mecanismos acima expostos. Para avaliar o papel desta proteína na produção e na ação periférica da insulina, utilizou-se um oligonucleotídeo antisense capaz de reduzir significativamente a expressão da PGC- 1α . Através deste método observou-se que a PGC- 1α responde a estímulos simpáticos que promovem a inibição da secreção de insulina. Tais estímulos induzem o aumento da expressão desta proteína que por sua vez leva a um aumento da expressão da proteína desacopladora-2 (UCP-2) em ilhotas pancreáticas. O desacoplamento da respiração mitocondrial deve favorecer a redução da produção de ATP decorrente do metabolismo da glicose e desta forma reduzir a secreção de insulina. Por outro lado, em um modelo animal de obesidade e diabetes induzido por dieta hiperlipídica observou-se um aumento da expressão da PGC- 1α em fígado e tecido adiposo. A inibição da expressão da PGC- 1α nestes animais promoveu restauração da homeostase da glicose, aumento da secreção de insulina, melhora na sinalização de insulina em tecidos periféricos e surpreendentemente, regressão da esteatose hepática induzida por dieta. Portanto, a proteína PGC- 1α surge como promissor alvo para abordagem terapêutica em diabetes mellitus e doenças afins.



Type 2 diabetes mellitus is a multifactorial disease that results from the confluence of at least two distinct events, insulin resistance and failure of the pancreatic beta cell. Recent evidences suggest that common mechanisms may participate in the events that precipitate the development of both insulin resistance and beta cell disarrangement. The characterization of such events may offer new perspectives for a unified therapeutic approach for diabetes. The protein PGC-1 α fulfills some of the requirements to be included in a list of potential candidates for playing a role in the genesis of both the main mechanisms involved in the development of diabetes. To evaluate the role of this protein in the production and action of insulin we employed an antisense oligonucleotide to PGC-1 α , which is capable of significantly reducing the expression of this protein. Through this approach it was observed that PGC-1 α responds to sympathetic stimuli that inhibit insulin secretion. Such stimuli induce the expression of PGC-1 α and subsequently of the uncoupling protein-2 (UCP-2). Once induced UCP-2 favors a reduction of ATP production from glucose metabolism and therefore reduces insulin secretion. In addition, the expression of PGC-1 α was increased in liver and adipose tissue of an animal model of diet-induced obesity and diabetes. The inhibition of PGC-1 α promoted an increase of insulin secretion, an increase of peripheral insulin action, an improvement of insulin signal transduction and, surprisingly the reversal of diet-induced hepatic steatosis. Thus, PGC-1 α appears as an attractive potential target for therapeutics in diabetes and related diseases.



Diabetes mellitus é hoje um dos principais problemas de saúde pública do mundo. Nas últimas duas décadas tem ocorrido aumento alarmante no número de pessoas com diagnóstico de diabetes mellitus. Na maior parte dos casos, existe associação ao estilo de vida sedentário e à obesidade. Atualmente, o número global de pessoas com diabetes está em torno de 150 milhões, com estimativa de 220 milhões em 2010 e 300 milhões em 2025 (ZIMMET, 2001). No Brasil, onde doenças infecciosas e carenciais ainda contribuem para elevada mortalidade precoce, estudos epidemiológicos revelam prevalências de 15% e 9% para obesidade e diabetes mellitus, respectivamente (FREIRE et al., 2003; FILOZOF et al., 2001). Uma vez reconhecida a relevância do diabetes mellitus como problema de saúde pública, tem se observado surpreendente aumento no investimento em pesquisa nesta área. Porém, a prevalência de obesidade e diabetes mellitus tipo 2 tem superado em muito o avanço científico.

O diabetes mellitus tipo 2 é o resultado da falha da célula beta pancreática em compensar adequadamente a reduzida sensibilidade periférica à insulina, aumentando a secreção do hormônio (PICK et al., 1998; WEIR et al., 2001). Dessa forma, a hiperglicemia resultante está relacionada à diminuição na captação de glicose pelos tecidos periféricos e a um aumento na produção hepática de glicose. Em indivíduos com função da célula beta normal, aumentos na demanda de insulina devido à resistência periférica ao hormônio são compensados por um aumento coordenado na secreção de insulina, mantendo assim os níveis de glicose plasmática dentro da normalidade. Em indivíduos geneticamente predispostos ao diabetes mellitus tipo 2, a falha da célula beta em compensar o aumento na demanda, resulta em progressiva elevação dos níveis de glicose e determina o início do quadro clínico da doença (DONATH e HALBAN, 2004).

A perda da fase aguda da secreção de insulina induzida por glicose é um defeito funcional que se desenvolve durante a progressão do diabetes. A habilidade da célula beta em secretar insulina em resposta a glicose é conferida a fatores genéticos próprios, sinais neurais e hormonais. O importante neste sentido é a manutenção de vias que otimizam o metabolismo dos combustíveis para a geração de sinais metabólicos, tal como o ATP, que acopla os níveis de glicose plasmática à secreção de insulina (MALAISSE et al., 1976).

Entre os produtos do metabolismo da glicose nas células beta, o ATP é o fator mais importante para ativar a secreção de insulina. Nas células beta, o incremento na razão ATP/ADP inibe os canais de potássio dependentes de ATP (K^+_{ATP}), diminuindo o potencial de membrana, levando ao influxo dos íons cálcio (Ca^{2+}) e à secreção de insulina. No entanto, fatores de origem neural também desempenham papel importante no controle da secreção de insulina. O sistema nervoso autônomo tem função importante na regulação da secreção de insulina estimulada por glicose. A função do estímulo neural sobre a função das células beta tem sido grandemente investigado nos últimos anos (GILON e HENQUIN, 2001). Acredita-se que o efeito exercido pelas fibras parassimpáticas originadas no núcleo motor dorsal do vago (BERTHOUD et al., 1990) e pelas fibras simpáticas da cadeia simpática paravertebral (AHREN et al., 1990), sejam ambos controlados pelo hipotálamo (GILON e HENQUIN, 2001).

A acetilcolina estimula diretamente a secreção de insulina pelas células beta através da ativação de receptores muscarínicos. Uma característica do efeito colinérgico na ilhota é a ação sinérgica com a glicose, aumentando, assim, a hidrólise de fosfoinositol (PI) e a secreção de insulina (KELLEY et al., 1995). A hidrólise de fosfoinositol é ativada pela fosfolipase C (PLC) por mecanismo acoplado a proteína G. Este acoplamento é iniciado por

um agonista ligado aos receptores muscarínicos (VERSPOHL e HERMANN, 1996). A hidrólise da PI resulta na formação de inositol trifosfato (IP_3), liberando cálcio dos estoques de cálcio intracelular, aumentando a concentração de cálcio citosólico, o qual é acompanhado por rápida estimulação da exocitose e secreção de insulina (NIWA et al., 1998). Por outro lado, a secreção de insulina estimulada pela glicose é inibida pela noradrenalina (liberada pelas terminações nervosas simpáticas) por meio da ativação de receptores α_2 -adrenérgicos que agem através das proteínas G_i e G_o , e modulam negativamente a atividade da adenilil ciclase (AC), reduzindo a produção de AMP cíclico e por último a secreção de insulina. (NAKAKI et al., 1981).

Como descrito acima, em indivíduos primariamente insulino-resistentes, somente uma falha da célula beta pancreática em atender à crescente demanda de insulina na periferia, deverá permitir o desenvolvimento do diabetes mellitus tipo 2. Uma vez que os níveis de ATP na célula beta desempenham função central no acoplamento estímulo-secreção, é possível que alteração na razão ATP/ADP seja um dos mecanismos pelos quais não há contínuo ajuste da produção de insulina em situações clínicas nas quais há maior demanda. Nesse sentido, a demonstração que a proteína desacopladora 2 (UCP-2) é expressa em ilhotas pancreáticas (FLEURY et al., 1997), criou um novo foco de interesse, uma vez que, esta proteína parece participar na adaptação crônica da célula beta ao aumento dos secretagogos e contribuir para a supressão da secreção de insulina estimulada por glicose (CHAN et al., 1999). A proteína desacopladora mitocondrial (UCP), inicialmente identificada em tecido adiposo marrom e denominada termogenina, cumpre o papel fisiológico de dissipar o gradiente protônico. As UCPs são proteínas de aproximadamente 32 kDa, localizadas na membrana mitocondrial interna, responsável por

estimular o consumo de oxigênio sem síntese de ATP, gerando calor (NICHOLLS, 1976). A UCP-1, quando estimulada pelo sistema nervoso simpático em adaptação ao frio, é capaz de provocar um aumento da condutância de prótons na membrana mitocondrial interna, permitindo a dissipação do $\Delta\mu H^+$ (gradiente potencial eletroquímico de prótons) e gerar calor. Em geral, a função das UCPs é diminuir a eficiência metabólica por dissociar a oxidação dos substratos na mitocôndria para a proteína ATP sintetase (F_0F_1) (SCHAUWEN e HESSELINK, 2002).

O controle da expressão do gene das UCPs é pouco conhecido. Contudo, recentes estudos revelaram que a proteína denominada *Coativador 1 alfa do receptor ativado por proliferador do peroxissoma* (PGC-1 α) desempenha papel importante nesta regulação (PIUGSERVER et al., 1998) e parece participar de eventos que conectam expressão gênica à função mitocondrial. A PGC-1 α é uma proteína de 798 aminoácidos, inicialmente descrita em tecido adiposo marrom, através de um sistema híbrido em levedura (PIUGSERVER et al., 1998). Essa molécula não se liga ao DNA, mas age através de sua interação (proteína-proteína) com os fatores transcricionais do DNA regulando a expressão gênica. A expressão e a indução pela exposição ao frio evidenciam a participação da PGC-1 α no metabolismo energético e termogênese adaptativa. Marcadamente, a superexpressão de PGC-1 α pode induzir funções ligadas a biogênese mitocondrial. Assim, a PGC-1 α apresenta uma intrincada habilidade de interagir com componentes da maquinaria metabólica.

A termogênese adaptativa é um componente importante da homeostase energética e uma defesa metabólica contra a obesidade (FLIER, 2004). Em órgãos termogenicamente ativos tais como o tecido adiposo marrom e o músculo esquelético, a exposição ao frio

promove a expressão da PGC-1 α devido ao aumento do tônus simpático via receptores β -3 adrenérgicos e AMP cíclico (BOSS et al., 1999). A indução de PGC-1 α aumenta significativamente a atividade transcripcional da PPAR γ e do receptor do hormônio tiroideano no promotor da UCP-1 (WU et al., 1999). A expressão ectópica da PGC-1 α em células de tecido adiposo marrom ativa a expressão da UCP-1 e das principais enzimas mitocondriais da cadeia respiratória, como os fatores respiratórios nucleares (NRFs), além de aumentar o conteúdo celular do DNA mitocondrial (SPIEGELMAN e FLIER, 2001). Estes resultados indicam que a PGC-1 α desempenha papel chave no programa transcripcional dos receptores nucleares da termogênese adaptativa e que a expressão dessa proteína é dependente de estímulos neurais.

A análise de função e estrutura revela que a PGC-1 α contém um domínio de ativação transcripcional potente junto ao aminoácido 200 na região N-terminal. A região entre os aminoácidos 142 e 146 é conhecida como a sequência responsável pela interação dependente de ligante com outros coativadores de receptores nucleares, tais como; receptores de estrógeno (TCHEREPANOVA et al., 2000), PPAR α (VEGA et al., 2000) e receptor de glicocorticóide (KNUTTI et al., 2000), e provavelmente outros receptores nucleares. Interessante é que o fator nuclear de hepatócito (HNF-4 α) também interage com a PGC-1 α sem adição de qualquer ligante, sugerindo que este receptor nuclear de hormônio está em uma conformação ativa sem adição de ligantes exógenos (YOON et al., 2001). A PGC-1 α usa também o domínio entre os aminoácidos 200 e 400, interagindo com o PPAR γ (PUIGSERVER et al., 1998) e NRF-1 (WU et al., 1999); e a região entre os aminoácidos 400 e 500 interagem com MEF2-C (MICHAEL et al., 2001). Em adição, KNUTTI e KRALLI (2001) sugeriram que a PGC-1 α promove transcrição por um complexo contendo

histona acetiltransferase (HAT), pela proteína ligada ao AMP cíclico (CREBP/p300) ou ainda pelo coativador 1 do receptor de esteróide (SRC-1).

A princípio, a PGC-1 α pareceu ser um alvo terapêutico potencial na obesidade, uma vez que esta proteína parecia estar envolvida na termogênese, ou seja, aumento na expressão de tal proteína poderia resultar em maior gasto energético (PUIGSERVER et al., 1998). No entanto, posteriormente, alguns trabalhos demonstraram que a PGC-1 α é uma proteína chave em modular a gliconeogênese hepática, podendo estar envolvida na elevada produção hepática de glicose (YOON et al., 2001), ocorrência comum em indivíduos com diabetes mellitus tipo 2; achados estes confirmados por outros (DAITOKU et al., 2003; KOO et al., 2004). A mais bem sucedida explicação molecular para tal achado foi realizada por DAITOKU et al. (2003). Este grupo demonstrou que a AKT modula a transativação da FOXO-1 no gene da PGC-1 α conferindo, assim, efeito supressivo da insulina sobre a expressão da PGC-1 α , eles concluíram que a fosforilação de CREB e a defosforilação da FOXO-1 podem sinergicamente induzir a expressão de PGC-1 α , isso resulta em rápida gliconeogênese, o que mantém os níveis de glicose sanguínea, e que, nos casos de resistência à insulina essa via está permanentemente ativa, resultados comprovados também por outros (PUIGSERVER et al., 2003; KOO et al., 2004).

Investigações clínicas têm demonstrado que mutações no gene da PGC-1 α estão associados com diabetes mellitus tipo 2 ou obesidade (MULLER et al., 2003). Esses autores verificaram que o polimorfismo na posição 482, com a substituição do aminoácido glicina por serina, aumenta a suscetibilidade e a predisposição ao diabetes mellitus e obesidade em índios Pima. Em adição, outros grupos revelaram que o mesmo polimorfismo

resulta em diabetes mellitus tipo 2 em dinamarqueses (EK et al., 2001) e em pessoas do Reino Unido (ANDERSEN et al., 2002).

Ultimamente foi sugerido que a PGC-1 α pode estar envolvida na lipogênese hepática (OBERKOFLER et al., 2004). Trabalhando com hepatócitos isolados, estes autores verificaram que células superexpressando PGC-1 α tinham elevada expressão gênica da enzima ácido graxo sintase (FAS) e da acetil coA carboxilase (ACC), enzimas conhecidas pelo efeito lipogênico. Esses autores verificaram, ainda, que tal efeito é mediado pela SREBP-1c (regulador chave na ativação transcripcional de genes lipogênicos), uma vez que ao expressar o dominante negativo de tal proteína ocorreu redução da expressão tanto da FAS quanto da ACC.

Assim, partindo-se do conceito de que o diabetes mellitus é o resultado de complexa associação entre diminuição da sensibilidade periférica à insulina e perda funcional da capacidade de ajuste da célula beta pancreática em responder a aumentada demanda, e considerando-se que a PGC-1 α está envolvida tanto no processo de secreção quanto na sensibilidade periférica à insulina, decidiu-se avaliar o envolvimento desta proteína na gênese do diabetes mellitus e doenças relacionadas.



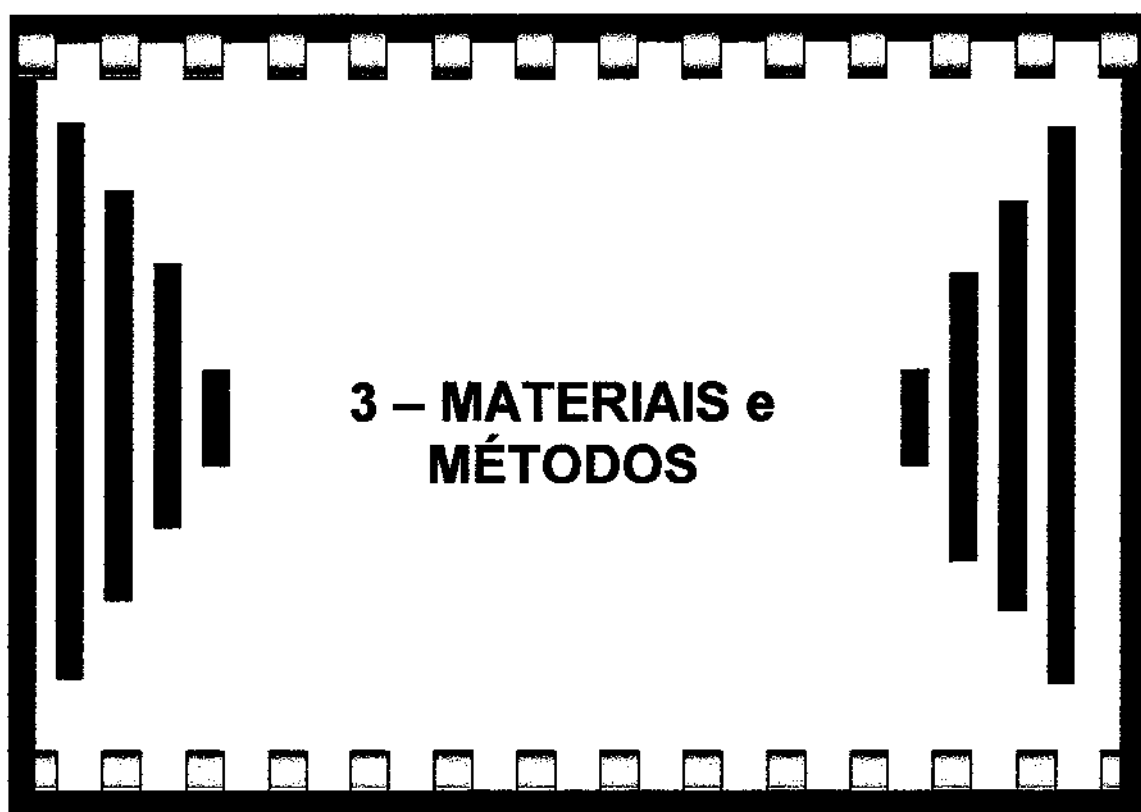
Os objetivos do presente estudo foram:

Estudo 1

✦ Avaliar se estímulos adrenérgicos gerados pela exposição ao frio seriam capazes de induzir a expressão da proteína PGC-1 α em ilhotas de ratos e se esta modularia a expressão da UCP-2 e, conseqüentemente regularia a secreção de insulina

Estudo 2

✦ Avaliar a participação da PGC-1 α no diabetes mellitus induzido por dieta hiperlipídica e se a inibição *in vivo* da PGC-1 α exerceria algum efeito nos parâmetros clínicos da doença.



3.1 – Caracterização dos modelos:

3.1.1 – Animais:

• *Estudo 1:* Para os experimentos constando na primeira publicação da presente tese (Item resultados), foram utilizados ratos machos, da linhagem Wistar-Hannover, de 8 semanas de idade, fornecidos pelo Biotério Central da UNICAMP (CEMIB). Os ratos foram alimentados com ração comercial para roedores da Nuvital, a qual foi oferecida *ad libitum*. Os animais foram divididos nos seguintes grupos: exposição à temperatura de 4°C em incubadora refrigerada com porta de vidro por 8 dias (grupo exposto ao frio) ou exposição à temperatura ambiente ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) por igual período (grupo controle). A avaliação da temperatura corporal, ingestão alimentar, peso corpóreo e a coleta de amostras de sangue para determinação de parâmetros bioquímicos e hormonais foi sempre realizada por volta das 9:00 hs, após jejum de 2 horas. Tais medidas foram realizadas nos tempos 0 e 2 horas e diariamente por oito dias após início da exposição ao frio (4°C). A temperatura corpórea foi aferida utilizando-se um termômetro retal de alta sensibilidade (Thermistor – Hanna Instruments).

• *Estudo 2:* Na segunda parte do estudo, foram utilizados camundongos machos, das linhagens Swiss e CBA de 3 semanas de idade, fornecidos pelo Biotério Central da UNICAMP (CEMIB). Imediatamente após o recebimento, os camundongos foram subdivididos em quatro grupos, a saber: CBA/Uni/C e SW/Uni/C (animais que foram alimentados com ração comercial para roedores da Nuvital, a qual foi oferecida *ad libitum*) e CBA/Uni/F e SW/Uni/F (animais que foram alimentados com dieta hiperlipídica, a qual foi oferecida *ad libitum*). Os animais foram sacrificados em diferentes tempos (0, 4, 8, 12 e 16 semanas de tratamento). Tanto no estudo 1 quanto no 2 os animais foram mantidos em

ciclo de luz controlado de 12 hs. Todos os experimentos animais foram realizados em conformidade com as recomendações do comitê de ética da Unicamp.

3.1.2 – Avaliação metabólica, bioquímica e hormonal:

- *Determinação da glicose plasmática:* A dosagem da glicose sérica foi realizada pelo método enzimático colorimétrico de glicose oxidase-peroxidase (TRINDER, 1969). Os resultados foram expressos em mg/dl.

- *Determinação da insulina:* A insulina plasmática das amostras foi avaliada por radioimunoensaio e, a curva padrão determinada com insulina de rato (SCOTT et al., 1981). Os resultados foram expressos em ng/ml.

- *Determinação de ácidos graxos livres (AGL) e de triglicerídeos séricos:* Os ácidos graxos livres e os triglicerídeos das amostras de soro foram dosados utilizando-se o kit comercial de ELISA segundo a indicação do fabricante (Wako Chemicals, Richmond, CA, USA). Os resultados foram expressos em mM.

- *Determinação de Leptina:* A leptina das amostras de soro foram dosadas utilizando-se o kit comercial de ELISA segundo a indicação do fabricante (Linco Research Inc, St Charles, MO, USA). Os resultados foram expressos em pg/ml.

- *Determinação de TSH:* O hormônio estimulador da tireóide das amostras de soro foi dosado utilizando-se kit de radioimunoensaio conforme a descrição do fabricante (Amersham Pharmacia Biotech, Aylesbury, UK). Os resultados foram expressos em ng/ml.

- *Determinação de corticosterona:* Os níveis de corticosterona nas amostras de soro foram dosadas utilizando-se kit de radioimunoensaio conforme a descrição do fabricante (Amersham Pharmacia Biotech, Aylesbury, UK). Os resultados foram expressos em ng/ml.

3.2 – Protocolo experimental:

3.2.1 – Animais:

- *Estudo 1:* Após a caracterização preliminar do modelo, os animais foram subdivididos em seis grupos: animais que permaneceram em temperatura ambiente ($23 \pm 1^\circ\text{C}$; C), animais mantidos em temperatura ambiente e submetidos a vagotomia, animais mantidos a temperatura ambiente e submetidos a simpatectomia ($23 \pm 1^\circ\text{C}$; C+S), animais que foram expostos ao frio ($23 \pm 1^\circ\text{C}$; 4°C), expostos ao frio e submetidos a vagotomia, ou simpatectomizados expostos ao frio ($23 \pm 1^\circ\text{C}$; $4^\circ\text{C}+\text{S}$). Como a vagotomia não produziu efeito significativo sobre a secreção de insulina *in vivo*, decidiu-se pela não inclusão do grupo vagotomizado no restante dos estudos.

- *Estudo 2:* Após a caracterização preliminar do modelo, os animais foram subdivididos em três grupos, a saber: camundongos Swiss dieta padrão que não foram tratados com oligonucleotídeo (SW/Uni/C); Swiss obesos-diabéticos que foram submetidos ao tratamento com oligonucleotídeo sense (SW/Uni/F); e Swiss obesos-diabéticos que foram submetidos ao tratamento com oligonucleotídeo antisense (SW/Uni/F/PGC-1 α /AS). Como, os animais CBA não desenvolveram o quadro de diabetes, estes foram usados apenas como controles na caracterização do estudo, sendo posteriormente excluídos do restante dos protocolos.

3.2.2 - Desnervação cirúrgica do vago e dos ramos paravertebrais simpáticos:

Os animais privados de alimentação por 10 hs foram anestesiados com pentobarbital de sódio (70 mg/Kg intraperitonealmente). Após incisão da linha transversa abdominal, o lobo esquerdo do fígado foi rebatido e o estômago suavemente tracionado permitindo assim a exposição da porção troncular do nervo vago no seu trajeto peri-esofágico transdiafragmático. Assim os ramos a serem seccionados foram gentilmente liberados do tecido conjuntivo, suportado por um fino micro-gancho e seccionados com micro-tesoura. A parede abdominal foi suturada por planos.

Para desnervação simpática paravertebral, a cavidade abdominal foi aberta por incisão transversal, e após afastamento adequado de lobos hepáticos a grande curvatura gástrica foi mobilizada permitindo a exposição da retrocavidade com visualização por microscopia binocular de gânglios celiacos e paravertebrais altos os quais foram removidos por seccionamento com micro-tesoura. A parede abdominal foi suturada por planos. O tratamento pós-operatório incluiu aplicação de Nitrofurazona para os ferimentos, injeção intramuscular de 10 mg/Kg de antibiótico sulfato de gentamicina, e injeção subcutânea de 20 mg/Kg de hidrocloreto de meperidina como analgésico, conforme descrito (LARSON et al., 1985). Em alguns experimentos, animais simpatectomizados foram tratados intraperitonealmente durante três dias (quinto ao oitavo dia de exposição ao frio) com um agonista α -2 adrenérgico (clonidina) (Sigma, St. Louis, Mo, USA) (0,025 mg/Kg) as 7:00 am, 3:00 pm e 11:00.

3.2.3 – Oligonucleotídeos sense e antisense específicos:

O oligonucleotídeo portando modificação fosforotioato da UCP-2 (sense, 5' TGT ATT GCA GAT CTC A 3' e antisense, 5' TGA GAT CTG CAA TAC A 3') e da PGC-1 α (sense, 5' TCA GGA GCT GGA TGG C 3' e antisense, 5' GCC ATC CAG CTC CTG A 3') foram produzidos pela Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, USA). Cada sequência foi selecionada entre três pares não relacionados de oligonucleotídeos com base nas suas habilidades em bloquear a expressão das proteínas UCP-2 e PGC-1 α , respectivamente, como avaliado por imunoblot. A sequência selecionada foi analisada pelo programa BLAST – NCBI. Para o estudo 1, o bloqueio das proteínas por oligonucleotídeo foi realizado em ilhotas isoladas no meio de cultura primária como descrito abaixo no item *secreção estática de insulina*. Para o estudo 2 os oligonucleotídeos foram utilizados por 16 dias (quando os níveis de glicose estabilizaram por 3 dias consecutivos), com aplicação (IP) diária de 1,0 nmol de oligonucleotídeo diluído em veículo. A concentração ideal foi determinada por curva dose-resposta.

3.3 - Teste de tolerância intraperitoneal à glicose (GTT):

Foi realizado após 12 horas de jejum (9:00PM/9:00AM), após completar 8 dias de exposição ao frio ou temperatura ambiente. Através de corte na extremidade da cauda do animal efetuou-se uma primeira coleta de sangue em capilar previamente heparinizado, que em seguida foi centrifugado (micro centrífuga) para a obtenção da fração sérica para a dosagem de glicose, o que equivaleu ao tempo zero (t0) do teste. Em seguida, foi realizada a injeção de uma solução de glicose 50% (2 g/Kg de peso corporal) administrada intraperitonealmente e posteriormente foram coletadas amostras de sangue nos tempos 30,

60, 120 minutos, para as dosagens de glicose. Para a dosagem de insulina utilizou-se 75 μ l de sangue, diluído em 200 μ l de solução fisiológica nos mesmos tempos acima citado.

3.4 - Teste de tolerância intraperitoneal à insulina (TTT):

O alimento foi retirado seis horas antes do teste, ao final do período experimental. Por meio de um corte na extremidade da cauda do animal efetuou-se uma primeira coleta de sangue para dosagem de glicose, o que equivaleu ao tempo zero do teste. Em seguida, foi injetado intraperitonealmente 2 U de insulina por quilo de peso corporal e amostras de sangue foram coletadas pela cauda nos tempos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos para a determinação da glicose sérica. A velocidade constante do decaimento da glicose (Kitt) foi calculada usando a formula $0,693/t_{1/2}$. O $t_{1/2}$ da glicose foi calculado a partir da curva da análise dos mínimos quadrados da concentração da glicose sérica durante a fase de decaimento linear.

3.5 - Clamp hiperinsulinêmico-euglicêmico:

Após jejum de 12 horas, uma dosagem de glicose foi tomada como valor basal, o qual foi utilizado como ponto de partida para o início do clamp. Em seguida os animais foram anestesiados intraperitonealmente com pentobarbital de sódio (50 mg/kg) e cateteres foram inseridos na veia jugular esquerda (para infusão) e artéria carótida (para amostras de sangue). Após a cirurgia de colocação dos cateteres, aguardou-se aproximadamente 60 minutos ou que os valores de glicose se aproximassem do basal, quando então foi iniciada a infusão contínua de insulina regular ($21,6 \text{ nmol.Kg}^{-2}.\text{min}^{-1}$). Amostras de sangue (1 μ L) foram coletadas em intervalos de 5 minutos para a medida imediata da concentração de

glicose (glicosímetro One Touch Ultra), e glicose, a uma concentração de 10%, foi infundida em frequência necessária por manter os níveis de glicose próximos ao basal. Todas infusões foram realizadas usando equipamento Harvard. Ao final do clamp os animais foram sacrificados através de infusão intravenosa de pentobarbital de sódio.

3.6 – Método Gravimétrico para determinação dos lipídeos hepáticos totais:

Os fragmentos de tecido hepático (0,2g) foram macerados em tubos de ensaio de 7,5 ml e a estes foi adicionada uma solução de metanol/clorofórmio na proporção 1:2, ambos da Merck. Os tubos foram deixados em repouso à temperatura ambiente por uma noite, tempo suficiente para a decantação dos resíduos do tecido delipidado. No dia seguinte, os extratos foram filtrados em filtro de papel 50 e transferidos para frascos pré-pesados e secos. Após a total evaporação da solução de extração, os frascos foram novamente pesados e a diferença com relação ao peso anterior foi considerada a gordura extraída gravimetricamente.

3.7 - Isolamentos das ilhotas pancreáticas:

Após o sacrifício dos animais e laparotomia com visualização do ducto biliar comum, este foi clampeado na sua extremidade distal junto ao duodeno, e dissecado próximo ao pedículo hepático. Nesse ponto foi introduzida uma cânula de polietileno e injetados cerca de 10 ml de solução de Hanks (NaCl 137 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 1 mM, MgSO₄ 1 mM, Na₂HPO₄ 0,3 mM, KH₂PO₄ 0,4 mM, NaHCO₃ 4 mM, equilibrada com carbogênio e mistura de O₂/CO₂ – 95%/5%) e collagenase na proporção de 0,7 mg/mL (Collagenase Type V). A solução fluíu através dos ductos pancreáticos provocando a

divulsão do tecido acinar. O pâncreas foi então retirado e colocado em placa de Petri para dissecação de gânglios linfáticos, gordura e vasos sanguíneos. Em seguida, com o emprego de tesoura foi fragmentado em pedaços de aproximadamente $1,5 \text{ mm}^3$. Os fragmentos foram transferidos para tubo de ensaio de $9,5 \times 1,5 \text{ cm}$. Durante 20 minutos, a preparação foi incubada a 37°C e gaseificada com carbogênio. Em seguida, agitou-se o tubo durante 5 minutos a 37°C e logo após, durante 2 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, várias lavagens das ilhotas com solução de Hanks foram realizadas para a interrupção da digestão do tecido pancreático. Então, procedeu a separação do tecido acinar das ilhotas de Langerhans por decantação (LACY e KOSTIANOVSKI, 1967), modificado por BOSCHERO et al. (1980).

3.8 - Secreção estática de insulina:

Após obtenção das ilhotas, estas foram colhidas uma a uma com uma micropipeta siliconizada de $100 \mu\text{l}$ sob lupa e colocadas em recipientes plásticos (5 ilhotas por frasco), contendo 1 ml de solução de Krebs (Na^+ 139 mM, K^+ 5 mM, Ca^{2+} 1 mM, Mg^{2+} 1 mM, Cl^- 124 mM, HCO_3^- 24 mM). As ilhotas foram pré-incubadas por 30 minutos em solução de Krebs contendo 5,6 mM de glicose. Logo após a pré-incubação, o meio foi descartado e as ilhotas foram colocadas em um novo meio e a este, diferentes concentrações de glicose (2,8; e 16,7 mM) foram acrescidas. Esses recipientes foram então colocados em banho tipo Dubinoff com agitação a 37°C , durante 60 minutos e atmosfera de carbogênio através da injeção de uma mistura de O_2/CO_2 (95%/5%). Para o estudo de secreção estática em ilhotas tratadas com ou sem oligonucleotídeo antisense, o seguinte protocolo foi realizado: grupos de cinco ilhotas isoladas foram inicialmente incubadas por 14 horas a 37°C , em meio RPMI

a 5,6 mM de glicose sem oligonucleotídeo ou na presença de 2,0 nmol de sense ou 2,0 nmol de antisense UCP-2 ou PGC-1 α . Após o término da pré-incubação de 14 horas, o meio foi então removido. As ilhotas foram então colocadas em um novo meio RPMI e mantidas por uma hora nas condições de 2,8 mM ou 16,7 mM de glicose sem oligonucleotídeo ou com sense ou antisense (UCP-2 ou PGC-1 α). Terminada a incubação, o sobrenadante foi recolhido em microtubos Eppendorf e armazenado para determinação da insulina, através de radioimunoensaio. Parte das ilhotas foi utilizada para a avaliação da efetividade do bloqueio.

3.9 – Western blot e Imunoprecipitação:

3.9.1 - Extração dos tecidos:

Para o estudo 1, a obtenção das ilhotas pancreáticas para a avaliação da expressão de UCP2 e de PGC-1 α foi realizada como descrito acima (item, *isolamento das ilhotas pancreáticas*). Para o estudo da PGC-1 α , de proteínas envolvidas no metabolismo lipídico e na sinalização da insulina, os animais foram anestesiados intraperitonealmente com tiopental sódico (50 mg/kg peso), e submetidos à extração do tecido adiposo branco e de fígado para avaliação dos níveis protéicos dessas proteínas, bem como fosforilação do IR. Inicialmente foi aberta a cavidade abdominal e injetada solução fisiológica (grupo negativo) ou insulina regular (grupo positivo – 0,2 ml) pela veia cava do animal. Após tempos pré-estabelecidos da injeção da insulina, foram coletados fragmentos de tecidos periféricos (fígado e tecido adiposo branco), os quais foram colocados imediatamente em tubo cônico tipo *falcon* contendo tampão de extração, mantidos em gelo. Os tecidos foram

homogeneizados durante 20 segundos com processador do *polytron* PTA 20S (modelo PT 10/35, Brinkmann Instruments, Westbury, NY, USA), operado em velocidade máxima. Durante e após o procedimento, o material homogeneizado foi mantido em banho de gelo para evitar a desfosforilação das proteínas. Ao final da extração, foi adicionado Triton X-100 1% em todas as amostras e mantidas em gelo. Após quarenta minutos, os materiais extraídos e homogeneizados foram submetidos à centrifugação. Utilizou-se a velocidade de 12.000 rpm por 20 minutos a 4°C, para remover o material insolúvel, utilizando-se o sobrenadante para as etapas seguintes: uma parte foi utilizada para determinar a concentração protéica de cada amostra pelo método colorimétrico de biureto (BRADFORD, 1976); outra parte foi utilizada para avaliação do extrato total, ou seja, separação das proteínas em SDS-PAGE, com tampão de Laemmli (LAEMMLI, 1970), acrescido de DTT 200 mM, em proporção de 5:1, mantido sempre a 4°C até o momento de submeter à fervura a 100°C durante 5 minutos, e posteriormente aplicados em gel de poliacrilamida; e finalmente outra parte foi utilizada para imunoprecipitação com anticorpos específicos para os antígenos a serem estudados.

3.9.2 – Western blot:

Aliquotas contendo 250 µg de proteína por amostra foram aplicadas sobre gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), de 1,5 mm de espessura. A eletroforese foi realizada em cuba de minigel da *Bio Rad* (Mini-Protean), com solução tampão para eletroforese, previamente diluída. O SDS-PAGE foi submetido a 25 volts, inicialmente, até a passagem da linha demarcada pela fase de empilhamento e 120 volts até o final do gel de resolução. Na sequência, as proteínas separadas no SDS-PAGE, foram transferidas para a membrana de

nitrocelulose, utilizando-se o equipamento de eletrotransferência de minigel da *Bio Rad*, e a solução tampão para transferência mantido em voltagem constante de 120 volts por 2 horas, sob refrigeração contínua por gelo. As membranas de nitrocelulose contendo as proteínas transferidas foram incubadas em solução bloqueadora por 2 horas, a temperatura ambiente, para diminuir a ligação inespecífica de proteínas. A seguir, as membranas foram lavadas com solução basal por 3 sessões de 10 minutos e incubadas com anticorpos específicos sob agitação constante por uma noite a 4°C. Foram então lavadas novamente com solução basal por 3 sessões de 10 minutos e incubadas a seguir em solução com proteína A, marcada com ^{125}I , durante 2 horas à temperatura ambiente. O excesso de proteína A foi lavado com solução basal e então, as membranas expostas ao filme de RX (Kodak XAR - Rochester, NY), com intensificador (Cronex Lightning Plus - DuPont, Wilmington, DE) em cassete mantido a -80°C. Após 48 horas ou mais, os filmes foram revelados na forma convencional.

A intensidade das bandas foi determinada através da leitura das autoradiografias reveladas por densitometria ótica, utilizando um *scanner* (HP 3400) e o programa *Scion Image* (Scion Corporation).

3.9.3 - Imunoprecipitação:

Volumes das amostras, com concentração protéica de 5 mg, foram utilizadas para imunoprecipitação com anticorpos específicos, sendo que a determinação das proteínas seguiu as etapas descritas anteriormente no item “extração dos tecidos”. As amostras foram colocadas sob incubação durante 12 horas a 4°C, sob agitação contínua. Em seguida, acrescentou-se proteína A-Shepharose 6MB em todas as amostras para precipitação do

complexo antígeno/anticorpo, sendo mantidas em agitação contínua por mais duas horas. Após nova centrifugação por 15 minutos, a 12.000 rpm a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o material precipitado lavado por três vezes com a solução tampão específico para lavagem. As proteínas precipitadas, a seguir, foram tratadas com tampão de Laemmli contendo 100 mM de DTT, aquecidas em água fervente por 5 minutos e centrifugadas por 1 minuto. As proteínas foram então submetidas à eletroforese em SDS-PAGE e transferidas para membrana de nitrocelulose, seguindo as etapas descritas no item “Western blot”. Nestes experimentos de imunoprecipitação, as membranas foram submetidas ao *blotting* com anticorpo antifosfotirosina.

3.10 – Histologia com coloração Hematoxilina - Eosina:

Após sacrifício dos animais, fragmentos do tecido hepático foram coletados e colocados em frasco contendo paraformaldeído à 4% por 12 horas. O órgão foi então processado com álcool em diferentes concentrações (70%, 80%, 95% e 100 %), xilol, e xilol/parafina. A seguir, o tecido foi incluído em blocos de parafina, onde foi seccionado em cortes de 5 µm e fixados em lâminas de microscopia previamente silanizadas. Após um repouso de cerca de 24 horas (para completa fixação dos cortes) as lâminas foram desparafinizadas com xilol, re-hidratadas com as diferentes concentrações de álcool. Em seguida foi realizada a coloração com hematoxilina e eosina. A análise foi realizada através de microscopia óptica (Olympus BX 60).

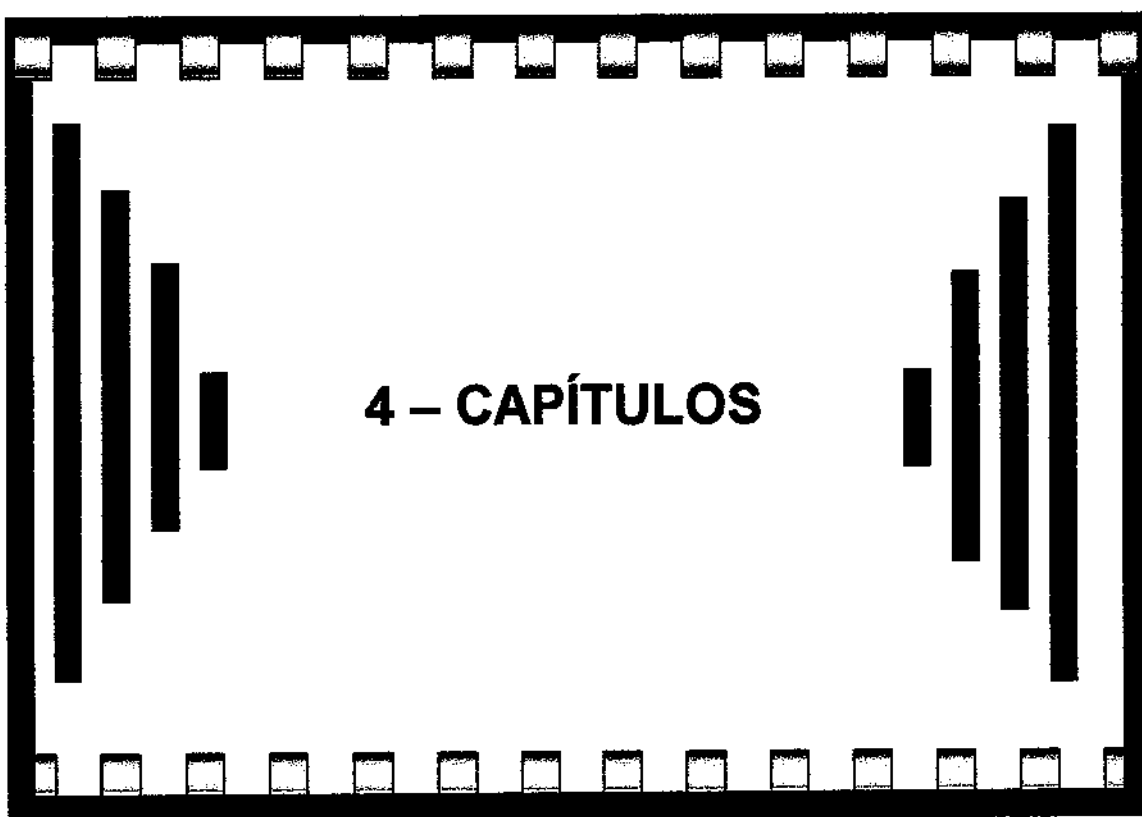
3.10 - Imunohistoquímica:

Os animais foram anestesiados com tiopental (50 mg/Kg), por via intra-peritoneal. Após a perda dos reflexos pedioso e corneano, realizou-se toracotomia mediana com posterior canulação trans-cardíaca da aorta torácica. Os animais foram então perfundidos com cerca de 80 ml de solução fisiológica heparinizada (0,01% volume/volume), e a seguir 80 ml de paraformaldeído (Sigma) a 4% dissolvidos em água destilada pré-aquecida e tampão fosfato 0,2 M, pH 7,4. Ambas as perfusões foram feitas com bomba de infusão, numa velocidade fixa de 4,0 ml/min. Após notar-se a completa fixação do tecido pancreático, este foi retirado e colocado em frasco contendo paraformaldeído à 4% por 12 horas. O órgão foi então processado com álcool em diferentes concentrações (70%, 80%, 95% e 100 %), xilol, e xilol/parafina. Então foi incluído em blocos de parafina, onde foi seccionado em cortes de 5 μ m e fixados lâminas silanizadas. Após um repouso de cerca de 24 horas (para completa fixação dos cortes) as lâminas foram desparafinizadas com xilol, re-hidratadas com as diferentes concentrações de álcool e lavadas cerca de três vezes com PBS 0,1M, pH 7,4. A seguir foi iniciada a reação de imunoperoxidase. Após os cortes terem sido desparafinizados, re-hidratados e tratados com Triton X-100 por 10 min, foram submetidos ao tratamento com H₂O₂ a 1% em PBS 0,1M, pH 7,4, para o bloqueio da peroxidase endógena, por cerca de 30 min e protegidos da luz. A seguir, foi feito o bloqueio com leite desnatado 5% em PBS 0,1M, pH 7,4 por uma hora. Na sequência os cortes foram submetidos à incubação com anticorpo primário específico na diluição de 1/100 em leite desnatado 1% e PBS 0,1 M, overnight à 4°C. Em seguida, os cortes foram lavados e submetidos ao anticorpo secundário associado a peroxidase (Santa Cruz), diluídos em 1/200 em leite desnatado 1% e PBS 0,1M, pH 7,4, durante 2 horas em temperatura ambiente. Os cortes foram então novamente lavados e incubados com a solução reveladora contendo

diaminobenzidina (DAB), H_2O_2 e PBS 0,1M pH 7,4, durante aproximadamente 3 min. A reação foi bloqueada colocando-se as lâminas em água deionizada e o tecido foi contra-corado com hematoxilina de Harris. Os cortes foram então desidratados nas diferentes concentrações de álcool e xilol e as lâminas foram montadas com Entellan®. A análise foi realizada através de microscopia óptica (Olympus BX 60).

3.12 - Análise estatística:

Os resultados foram expressos como média ($\bar{X}$) $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.). Para comparação de dois grupos, foi utilizado teste t de Student para dados não pareados, com nível de significância de 5 % ($p < 0,05$). Para comparação de mais que 2 grupos de valores, foi utilizado análise de variância (ANOVA), seguida de teste para comparação múltipla de médias (teste de Tukey-Kramer), com nível de significância de 5 % ($p < 0,05$).



4.1 – ARTIGO 1

***Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α –
dependent uncoupling protein-2 expression in pancreatic
islets of rats: a novel pathway for neural control of insulin
secretion***

Diabetologia 46: 1522-31, 2003.

Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1-dependent uncoupling protein-2 expression in pancreatic islets of rats: a novel pathway for neural control of insulin secretion

C. T. De Souza¹, A. L. Gasparetti¹, M. Pereira-da-Silva¹, E. P. Araújo¹, J. B. Carnevalheira¹, M. J. A. Saad¹, A. C. Boschero³, E. M. Carneiro³, L. A. Velloso^{1,2}

¹ Department of Internal Medicine, State University of Campinas, UNICAMP, Campinas, SP, Brazil

² Departamento de Clínica Médica, FCM-UNICAMP, Campinas, SP, Brazil

³ Departments of Physiology and Biophysics, State University of Campinas, UNICAMP, Campinas, SP, Brazil

Abstract

Aims/hypothesis. Sympathetic inputs inhibit insulin secretion through α_2 -adrenergic receptors coupled with Gi protein. High adrenergic tonus generated by exposure of homeothermic animals to cold reduces insulin secretion. In this study we evaluate the participation of UCP-2 in cold-induced regulation of insulin secretion.

Methods. Static insulin secretion studies, western blotting and immunohistochemistry were used in this investigation.

Results. Exposure of rats to cold during 8 days promoted 60% ($n=15$, $p<0.05$) reduction of basal serum insulin levels concentration accompanied by reduction of the area under insulin curve during i.p. GIT (50%, $n=15$, $p<0.05$). Isolated islets from cold-exposed rats secreted 57% ($n=6$, $p<0.05$) less insulin following a glucose challenge. Previous sympathectomy, partially prevented the effect of cold exposure upon insulin secretion. Islets isolated from cold-exposed rats ex-

pressed 51% ($n=6$, $p<0.05$) more UCP-2 than islets from control rats, while the inhibition of UCP-2 expression by antisense oligonucleotide treatment partially restored insulin secretion of islets obtained from cold-exposed rats. Cold exposure also induced an increase of 69% ($n=6$, $p<0.05$) in PGC-1 protein content in pancreatic islets. Inhibition of islet PGC-1 expression by antisense oligonucleotide abrogated cold-induced UCP-2 expression and partially restored insulin secretion in islets exposed to cold.

Conclusion/interpretation. Our data indicate that sympathetic tonus generated by exposure of rats to cold induces the expression of PGC-1, which participates in the control of UCP-2 expression in pancreatic islets. Increased UCP-2 expression under these conditions could reduce the beta-cell ATP/ADP ratio and negatively regulate insulin secretion. [Diabetologia (2003) 46:1522–1531]

Keywords Insulin, uncoupling protein, PGC-1, islet, sympathetic.

The role played by neural inputs on beta-cell function has been a matter of intense investigation over the last forty years [1]. The highest effect is believed to be exerted by parasympathetic fibres originated at the

dorsal motor nucleus of the vagus [2] and by sympathetic fibres of the paravertebral sympathetic chain [3], both of which are under tight control of the hypothalamus [1].

Acetylcholine (ACh) mediates parasympathetic signals and acts upon pancreatic beta cells activating muscarinic M3 receptor subtype [4, 5], which in turn promotes phospholipase β (PLC β) stimulation with subsequent diacylglycerol (DAG) and inositol 1,4,5 triphosphate (IP3) accumulation [6]. The net result is the elevation of cytosolic Ca^{2+} and increased insulin secretion. In contrast, norepinephrine (NE) released by sympathetic terminals stimulates beta-cell α_2 adrenergic receptors that acting through G_i or G_o pro-

Received: 20 May 2003 / Revised: 24 July 2003
Published online: 24 October 2003
© Springer-Verlag 2003

Corresponding author: Dr. L. A. Velloso, Departamento de Clínica Médica, FCM-UNICAMP, 13083-970 Campinas, SP, Brazil

E-mail: lavelloso@fcm.unicamp.br

Abbreviations: ACh, acetylcholine; DAG, diacylglycerol; NE, norepinephrine; PLC β , phospholipase β ; PGC-1, PPAR γ coactivator-1; UCP-2, uncoupling protein 2.

teins negatively modulate adenylyl cyclase activity, reducing cAMP production and, ultimately, insulin secretion [7, 8, 9].

Tight regulation of the ATP/ADP ratio in pancreatic beta cells is mostly under the control of metabolite-dependent pathways, and exerts direct effects upon insulin secretion by controlling ATP-sensitive K^+ channels [10]. Recent findings show that uncoupling protein 2 (UCP-2) could participate in physiological control of insulin secretion by modulating mitochondria efficiency and thus the production of ATP [11]. Moreover, adenoviral over-expression of UCP-2 in pancreatic islets leads to impaired insulin secretion due to mechanisms proximal to Ca^{2+} -dependent steps [12].

In thermogenically active organs such as brown adipose tissue and skeletal muscle, exposure to cold promotes the expression of a transcriptional coactivator named PPAR γ coactivator-1 (PGC-1). The induction of PGC-1 increases the transcriptional activity of PPAR γ and the thyroid hormone receptor in the uncoupling protein 1 (UCP-1) promoter. Since exposure of homeothermic animals negatively modulates insulin secretion [13], which seems to be driven by high sympathetic tonus, we hypothesized that adrenergic inputs such as those generated by cold exposure might induce PGC-1 expression in rat pancreatic islets and thus modulate UCP-2 expression. The data obtained reveal a novel pathway that participates in neural control of insulin secretion.

Materials and methods

Antibodies, oligonucleotides, chemicals and buffers. Antibodies against UCP-2 (sc-6526), and PGC-1 (sc-5816) were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, Calif., USA). ^{125}I -Protein A Sepharose and ^{125}I -insulin were from Amersham (Buckinghamshire, UK). Protein A Sepharose 6MB was from Pharmacia (Uppsala, Sweden). All the remaining chemicals used in the experiments were from Sigma (St. Louis, Mo., USA). Buffer A, used in immunoblotting experiments, consisted of 100 mmol/l Tris, 10 g/l SDS, 50 mmol/l Hepes (pH 7.4), 100 mmol/l sodium pyrophosphate, 100 mmol/l sodium fluoride, 10 mmol/l EDTA, 10 mmol/l sodium vanadate, 2.0 mmol/l PMSF and 0.1 mg/ml aprotinin. Krebs-bicarbonate buffer equilibrated with 95% O_2 : 5% CO_2 , pH 7.4 was used in islet isolation and contained either 2.8 or 16.7 mmol/l glucose. Insulin was determined by RIA and serum glucose by the glucose-oxidase method. Sense and antisense phosphorothioate-modified oligonucleotide specific for UCP-2 (sense, 5' TGT ATT GCA GAT CTC A 3' and antisense, 5' TGA GAT CTG CAA TAC A 3') and PGC-1 (sense, 5' TCA GGA GCT GGA TGG C 3' and antisense, 5' GCC ATC CAG CTC CTG A 3') were produced by Invitrogen (Carlsbad, Calif., USA). Each sequence was selected among three unrelated pairs of oligonucleotides on the basis of their ability to block UCP-2 or PGC-1 protein expression as evaluated by immunoblot of total protein extracts of isolated pancreatic islets utilizing specific anti-UCP-2 or anti-PGC-1 antibodies, respectively. The selected sequences were analyzed (BLAST, NCBI) [14] for similarities with mRNA of other proteins and presented an intra-species 100% matching only for *Rattus norvegicus* UCP-2 and PGC-1, respectively.

Cold exposure protocols and characterization of the model. Male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) (8 weeks old/200–260 g) obtained from the University of Campinas Central Animal Breeding Center were used in the experiments. The investigation followed the University guidelines for the use of animals in experimental studies and conforms to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH publication no. 85-23 revised 1996) and the protocol (protocol #510-1) was approved by the State University of Campinas Ethical Committee. The animals were maintained on 12:12 artificial light-dark cycle and housed in individual cages. After an acclimatization period (3 days), the animals were randomly divided into two groups: cold-exposed ($4\pm 1^\circ C$, up to 8 days $-4^\circ C$) and thermoneutrally maintained animals ($23\pm 1^\circ C$ —also referred to as C). The animals were allowed free access to standard rodent chow and water ad libitum. For experimental procedures rats were anaesthetized by intraperitoneal injection of sodium amobarbital (15 mg/kg body weight), and the experiments were carried out after loss of corneal and pedal reflexes. Blood samples were obtained from rats fasted for 2 h for measurement of serum glucose and insulin.

Intraperitoneal glucose tolerance test (GTT). An intraperitoneal (i.p.) GTT was carried out at the end of the experimental period (8 days). After an overnight fast, the rats were anaesthetized as described above. After collection of an unchallenged sample (time 0), a solution of 20% glucose (2.0 g/kg body weight) was administered into the peritoneal cavity. Blood samples were collected from the tail at 30, 60, 90 and 120 min for determination of glucose and insulin concentrations.

Insulin tolerance test (ITT). An intravenous (i.v.) ITT was carried out at the end of the experimental period (8 days). Food was withdrawn 6 h before the test and the rats were anaesthetized as described above. Insulin (6.0 μg) was injected through the tail vein and blood samples were collected from the tail at 0, 4, 8, 12 and 16 min for serum glucose determination. The constant rate for glucose disappearance (K_{it}) was calculated using the formula $0.693/t_{1/2}$. The glucose $t_{1/2}$ was calculated from the slope of the least-square analysis of the plasma glucose concentrations during the linear decay phase [15].

Experimental protocols. Following the preliminary characterization of the model, rats were divided into six groups: thermoneutrally maintained ($23\pm 1^\circ C$; C); thermoneutrally maintained and submitted to vagotomy; thermoneutrally maintained and submitted to sympathectomy ($23\pm 1^\circ C$; C+S); cold-exposed ($4^\circ C\pm 1^\circ C$; $4^\circ C$); cold-exposed and submitted to vagotomy; and cold-exposed and submitted to sympathectomy ($4^\circ C\pm 1^\circ C$; $4^\circ C$ +S). Islets isolated from rats of each group were evaluated for basal and glucose-induced insulin secretion. Since previous vagotomy exerted no effect upon cold-induced modulation of insulin secretion we decided not to include vagotomy groups in further studies. Thereafter, only groups C, $4^\circ C$, C+S and $4^\circ C$ +S were evaluated. Sympathectomy and vagotomy followed previously described techniques [16].

In vivo clonidine treatment. In some experiments sympathetomized rats were treated during 3 days with the α adrenergic agonist compound clonidine. For that, rats were allowed a 7-day recovery period from the surgical procedure and then submitted to cold exposure protocol during 8 days. From day 5 of cold exposure on the rats were treated intraperitoneally with clonidine (Sigma St. Louis, Mo., USA) (0.025 mg/kg) at 7.00 a.m., 3.00 p.m. and 11.00 p.m. [17].

Islet isolation and static insulin secretion studies. Islets were isolated by hand picking following the collagenase digestion method [5, 18]. To measure insulin secretion groups, five islets were pre-incubated for 45 min at 37°C in Krebs-bicarbonate buffer. The solution was then replaced by fresh buffer containing low (2.8 mmol/l) or supra-physiological (16.7 mmol/l) concentrations of glucose, and the islets were incubated for 1 h additionally. The insulin content of the medium at the end of the incubation period was determined by RIA. For static insulin secretion studies in islets treated with sense or antisense oligonucleotides, the following protocol was used; groups of five freshly isolated islets were initially incubated for 14 h at 37°C, in RPMI 5.6 mmol/l glucose with no oligonucleotide or in the presence of either 2.0 nmol sense or 2.0 nmol antisense UCP-2 or PGC-1 oligonucleotide. The medium was then replaced by freshly prepared RPMI and islets were maintained for 1 h additionally under experimental conditions (2.8 mmol/l glucose or 16.7 mmol/l glucose, with either no oligonucleotide addition or with sense or antisense UCP-2 or PGC-1 oligonucleotide). At the end of the incubation period, samples of the incubation medium were collected for hormone measurement. For measurement of the total insulin content, groups of 10 islets were sonicated and maintained overnight in 1 ml of 75% ethanol/0.2 mol/l HCl. After extraction an aliquot was assayed for insulin content, expressed as ng/islet.

Immunohistochemistry. Pancreata from two control rats and two cold-exposed rats were examined to determine the expression and tissue distribution of UCP-2 and PGC-1. Hydrated, 5.0 μ m sections of paraformaldehyde-fixed, paraffin-embedded tissue were stained by the avidine-peroxidase method using primary antibodies against UCP-2 or PGC-1. Analysis and photo-documentation were done using an Olympus BX60 Microscope (Olympus America, Melville, N.Y., USA) [19].

Immunoblot and immunoprecipitation. For specific protein determination groups of 1500 freshly isolated islets from each experimental group were lysed in 0.3 ml of boiling buffer A and insoluble material was removed by centrifugation during 20 min at 12000 $\times$ g. Protein determination in the supernatants was determined by the Bradford method [20]. Samples containing 0.2 mg total proteins were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted with specific antibodies. For immunoprecipitation followed by immunoblot, groups of 1500 pancreatic islets were exposed first to experimental conditions and then to cell lysis. Protein determination was carried out and samples of 1.0 mg total protein were incubated with primary antibody during 12 h at 4°C. Precipitation of immunocomplexes, protein separation and transfer to nitrocellulose membranes was done as previously described [21]. Visualization of specific protein bands was carried out by incubating membranes with 125 I-protein A followed by exposure to RX-films.

Statistical analysis. Specific protein bands present in the blots were quantified by densitometry (ScionCorp, Frederick, Md., USA). Mean values $\pm$ SEM obtained from densitometric scans, and values for serum insulin and glucose during i.p. GTT, ITT and static secretion studies were compared utilizing Turkey-Kramer test (ANOVA). A *p* value of less than 0.05 was considered statistically significant.

Results

Metabolic characterization of rats exposed to cold. Several metabolic changes are induced by exposure of

Table 1. Effects of 8 days cold exposure upon metabolic parameters of rats

Parameters	Control	T+4°C
Food Intake (g/day)	18.0 $\pm$ 0.5	34.0 $\pm$ 1.0*
Temperature (°C)	36.2 $\pm$ 0.1	36.0 $\pm$ 0.2
Glucose (mg/dl)	99.4 $\pm$ 0.4	97.2 $\pm$ 0.3
Insulin (ng/ml)	2.43 $\pm$ 0.12	1.49 $\pm$ 0.23*
Leptin (pg/ml)	2335 $\pm$ 267	2003 $\pm$ 234
TSH (ng/ml)	13.45 $\pm$ 1.43	13.32 $\pm$ 1.58
Corticosterone (ng/ml)	102.5 $\pm$ 15.5	112.9 $\pm$ 12.3

**p*<0.05 vs. Control

homoeothermic animals to cold. As a rule, they present a discrete and transitory fall in body temperature, an increase in food consumption accompanied by weight loss during the initial days of cold exposure, and a discrete and transitory fall in blood glucose concentration, paralleled by a fall in insulin concentration. In this study similar characteristics were found in rats exposed to cold during a period of 8 days (Table 1). Concerning glucose metabolism and insulin secretion, we observed a fall in basal glucose levels at 2 h of cold exposure (Fig. 1a), which was promptly recovered and kept at similar levels of control throughout the remaining experimental period. In contrast, insulin concentration was lower in cold-exposed rats throughout the experimental period (Fig. 1b). During an i.p. GTT the concentration of blood glucose in control rats reached a maximum of about 270 mg/dl at 30 min, and was higher than the glucose concentration of cold-exposed rats throughout the test (maximum glucose level in cold-exposed rats was about 128 mg/dl at 30 min) (Fig. 1c). Although glucose clearance rates were higher in cold-exposed rats, the insulin concentration during the i.p. GTT were lower in these rats (Fig. 1d). A maximum 11.0 ng/ml blood insulin was reached at 30 min in control rats while at the same point in time it reached only about 4.0 ng/ml in cold-exposed rats. Higher responsiveness to insulin in cold-exposed rats was further shown during an i.v.ITT. Cold-exposed rats presented an about 45% increase in *Kitt* (Fig. 1e).

Sympathectomy partially restores glucose-induced insulin secretion in cold-exposed rats. To evaluate the role of neural signals upon cold-induced inhibition of insulin secretion rats were submitted to sympathectomy and vagotomy and static insulin secretion studies were carried out. Vagotomy did not produce an impact on insulin secretion from islets of cold-exposed rats and was therefore excluded from further studies. In contrast sympathectomy produced an increase in glucose-induced insulin secretion in islets isolated from cold-exposed rats (Fig. 2), in such a way that 4°C+S group became statistically similar to C.

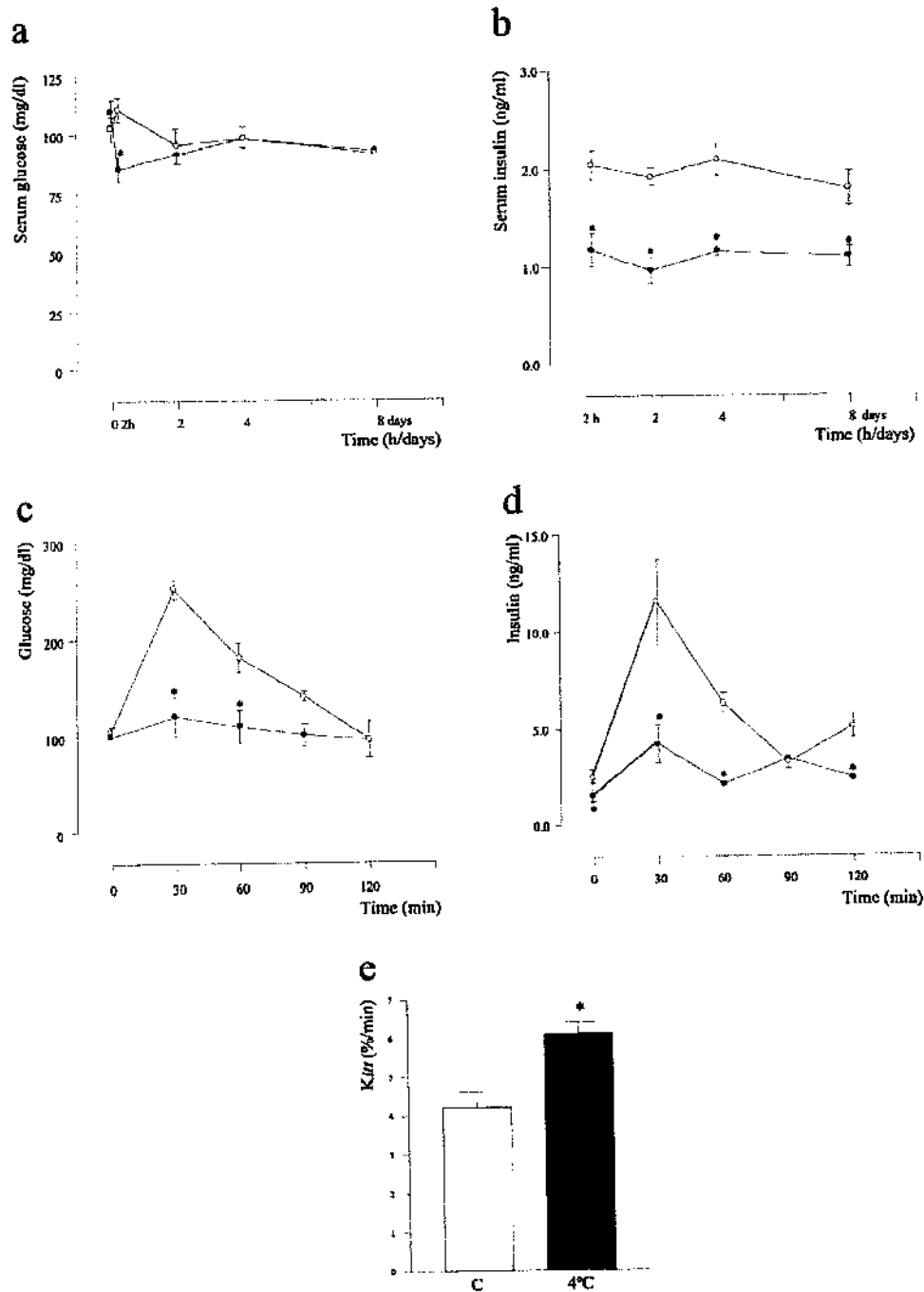


Fig. 1a-e. Metabolic characterization of rats exposed to cold. The variation of serum glucose (**a**) and insulin (**b**) concentrations were determined, in rats exposed to cold (filled circles) or maintained at thermoneutrality (open circles) during 8 days ($n=15$). Serum glucose (**c**) and insulin (**d**) concentrations were determined during an i.p. GTT in rats exposed to cold (filled circles) or maintained at thermoneutrality (open circles) during 8 days ($n=15$). (**e**) The constant rate for glucose disappearance (KITT) was calculated and ITT was carried out in rats exposed to cold (filled bar) (4°C) or maintained at thermoneutrality (open bar) (**c**) during 8 days ($n=6$). In all experiments $*p<0.05$ vs control (C)

Cold exposure induces the expression of PGC-1 and UCP-2 in rat pancreatic islets. By immunoblot of protein extracts from isolated islets, low levels amounts of PGC-1 and UCP-2 were detected in rats from group C (Fig. 3b). By immunohistochemical analysis both UCP-2 (Fig. 3c) and PGC-1 (Fig. 3e) were detected as faint stains in a few scattered islet cells. Following cold exposure (4°C) increases in UCP-2 (51%, $p<0.05$) and PGC-1 (59%, $p<0.05$) were observed in immunoblots (Fig. 3b) and could be more easily detected by immunohistochemistry (Figs. 3d,f). Previous sympathectomy in cold-exposed rats ($4^{\circ}\text{C}+\text{S}$) led to a reduction in UCP-2 and PGC-1 expression (Fig. 3a,b).

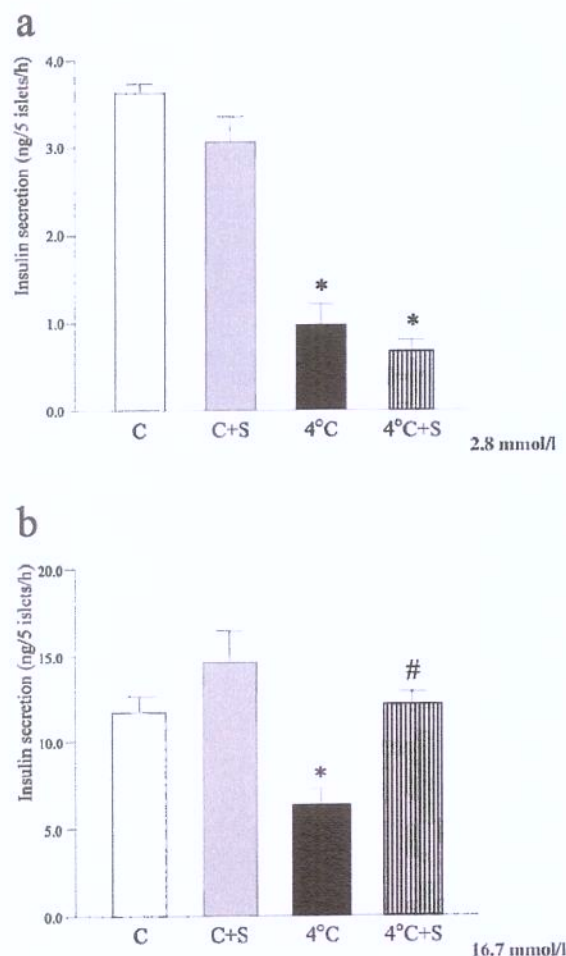


Fig. 2a, b. Static insulin secretion studies. Groups of five islets/well isolated from rats maintained at thermoneutrality and submitted (C+S) or not (C) to sympathectomy, or isolated from rats exposed to cold and submitted (4°C+S) or not (4°C) to sympathectomy, were incubated in the presence of 2.8 mmol/l glucose (a) or 16.7 mmol/l glucose (b) and evaluated for insulin secretion. In all experiments $n=6$, * $p<0.05$ vs. control (C) and # $p<0.05$ vs. 4°C

Inhibition of UCP-2 expression partially restores cold-induced inhibition of insulin secretion. Rats from each experimental group were treated with sense (S) or antisense (AS) UCP-2 phosphorothioate modified oligonucleotide and compared to animals treated with no oligonucleotide, for basal and glucose-stimulated static insulin secretion. Treatment with AS but not S oligonucleotide led to decreases of 34% ($n=4$, NS) and 53% ($n=4$, $p<0.05$) in pancreatic islet UCP-2 protein expression in C and 4°C groups, respectively (Fig. 4a). S oligonucleotide treatment produced no changes in any of the evaluated conditions in the pattern of insulin secretion as compared to islets treated with no oligonucleotide. In contrast, inhibition of UCP-2 expression in pancreatic islets from 4°C rats increased basal (Fig. 4c) and glucose-induced (Fig. 4g) static insulin secretion. Islet insulin content

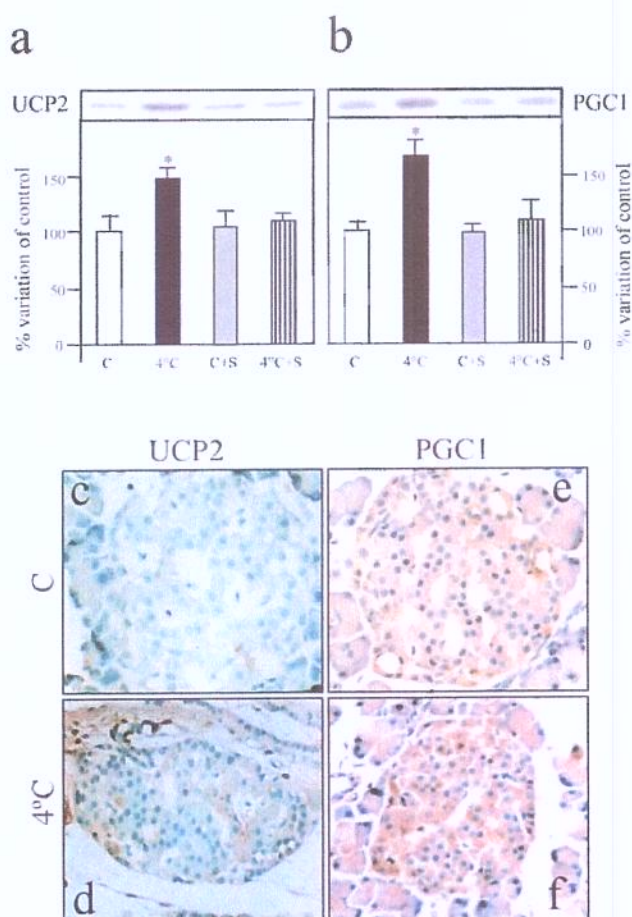
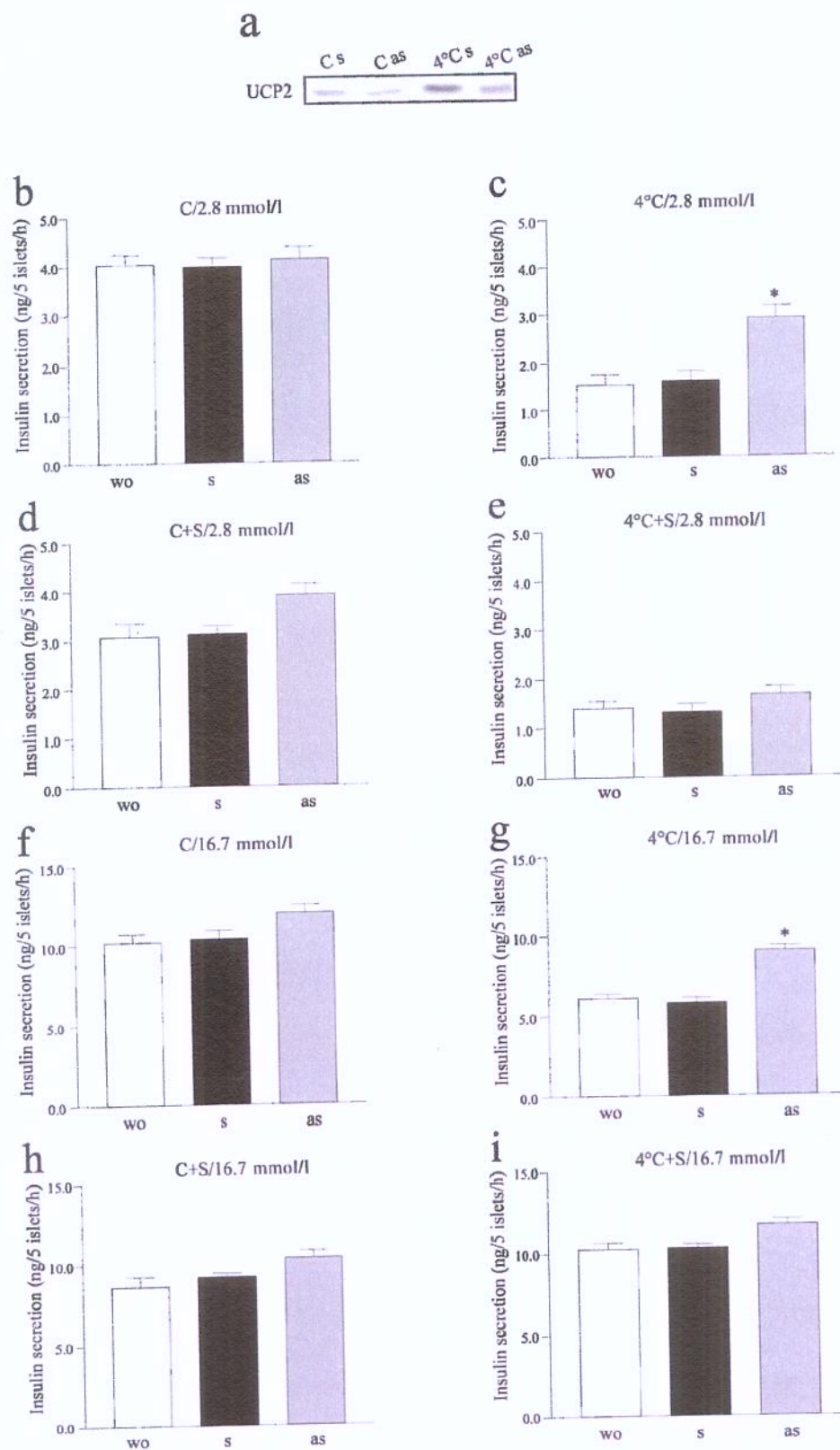


Fig. 3a-f. Expression of UCP-2 and PGC-1 in pancreatic islets. The protein amounts of UCP-2 (a) and PGC-1 (b) were determined in protein extracts obtained from islets of rats maintained at thermoneutrality and submitted (C+S) or not (C) to sympathectomy, or islets of rats exposed to cold and submitted (4°C+S) or not (4°C) to sympathectomy. 200 μ g of total protein extracts from each group were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted with anti-UCP-2 (a), or anti-PGC-1 (b) antibodies. Tissue distribution of UCP-2 (c, d) and PGC-1 (e, f) were evaluated by immunohistochemistry in paraffin-embedded sections of pancreata obtained from rats maintained in thermoneutrality (C), or exposed to cold (4°C) during 8 days. In (a) and (b), $n=6$, * $p<0.05$ vs. control (C). From c to f, $n=2$

Fig. 4a-i. Effect of UCP-2 protein expression blockade upon insulin secretion. The protein amounts of UCP-2 (a) were determined in protein extracts obtained from islets of rats maintained at thermoneutrality (C) or exposed to cold (4°C) and treated with sense (s) or antisense (as) UCP-2 phosphorothioate-modified oligonucleotide. 200 μ g of total protein extracts from each group were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted with anti-UCP-2 antibody. Groups of five islets/well isolated from rats maintained at thermoneutrality (C) (b, d, f, h) or exposed to cold (4°C) (c, e, g, i), were incubated in the presence of 2.8 mmol/l glucose (b-e) or 16.7 mmol/l glucose (f-i) and evaluated for static insulin secretion. Groups of islets were previously treated with sense (s), antisense (as) or no (wo) UCP-2 phosphorothioate-modified oligonucleotide. In all experiments $n=6$, * $p<0.05$ vs. wo



was neither modified by cold exposure (58.1 ± 6.9 vs 51.6 ± 4.5 ng/islet, for C and 4°C , respectively; $n=4$, NS), nor by UCP-2 protein expression blockade within each of the experimental groups (control + UCP-2 antisense oligonucleotide $=48.7 \pm 7.8$ ng/islet, $n=4$, NS vs C; and 4°C + UCP-2 antisense oligonucleotide $=48.4 \pm 4.6$ ng/islet, $n=4$, NS vs 4°C).

PGC-1 expression blockade abrogates cold-induced UCP-2 expression and partially restores cold-induced inhibition of insulin secretion. Rats of each experimental group were treated with sense (S) or antisense (AS) PGC-1 phosphorothioate modified oligonucleotide and compared to rats treated with no oligonucleotide, for basal and glucose-stimulated static insulin secretion, and for UCP-2 protein expression. Treatment with AS but not S PGC-1 oligonucleotide led to decreases of 25% ($n=4$, NS) and 58% ($n=4$, $p<0.05$) in pancreatic islet PGC-1 protein expression in C and 4°C groups, respectively (Fig. 5a). Blockade of PGC-1 expression produced significant effects upon cold-induced UCP-2 expression, in such a way that cold-exposed, AS PGC-1-treated islets from 4°C rats expressed 40% ($n=4$, $p<0.05$) less UCP-2 than islets from 4°C rats treated with no oligonucleotide (Fig. 5a). Similar to that observed in islets treated with AS UCP-2 oligonucleotide, in all of the herein evaluated conditions S PGC-1 oligonucleotide treatment produced no changes in the pattern of insulin secretion as compared to islets treated with no oligonucleotide. In contrast, inhibition of PGC-1 expression in pancreatic islets from 4°C rats increased basal (Fig. 5c) and glucose-induced (Fig. 5g) static insulin secretion. The blockade of PGC-1 protein expression did not modify islet insulin content within each of the experimental groups (control + PGC-1 antisense oligonucleotide $=46.3 \pm 6.7$ ng/islet, $n=4$, NS vs C; and 4°C + PGC-1 antisense oligonucleotide $=44.4 \pm 5.8$ ng/islet, $n=4$, NS vs 4°C).

Clonidine reestablishes pancreatic islet PGC-1 amounts in cold-exposed sympathectomized rats. Since most studies suggest that sympathetic stimulus inhibits insulin secretion through α adrenergic receptors, 4°C +S rats were treated during 3 days with the α adrenergic compound clonidine following a previously described in vivo clonidine treatment protocol [17]. Clonidine treatment of cold-exposed sympathectomized rats reestablished pancreatic islet PGC-1 protein expression to amounts similar to those encountered in 4°C rats (Fig. 6).

Discussion

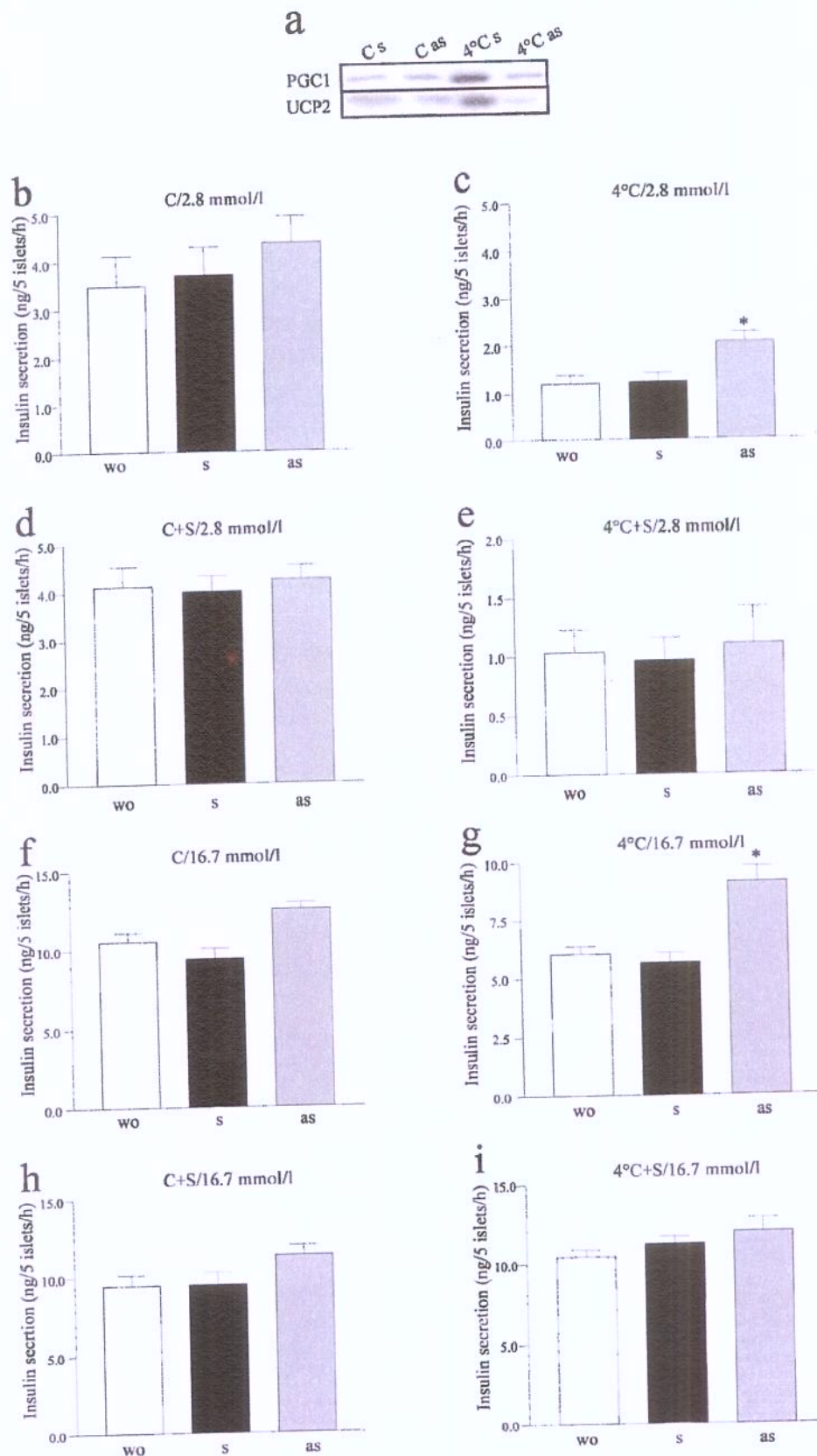
Fine-tuning of the insulin secretion rate is an important requirement for avoiding great variations in blood glucose concentration. Nutrients, hormones and neural

signals are the main participants of this complex and integrated system [22]. Since early studies [23], noradrenergic stimulation of pancreatic islets is known to produce a net inhibitory effect upon insulin secretion. During the last three decades several studies have provided strong evidence that NE, acting through α_2 adrenergic receptors expressed on the beta-cell surface, leads to reduced cAMP formation [24] and subsequently, to inhibition of the distal components of the insulin exocytotic machinery [9]. In addition, hyperpolarization of the pancreatic beta cells following adrenergic stimulus favours the opening of ATP-regulated K^+ channels [25]. The maintenance of opened ATP-regulated K^+ channels inhibits Ca^{2+} uptake and therefore inhibits insulin secretion. The molecular events that contribute for a sustained opening of the ATP-regulated K^+ channels in adrenergic stimulated beta cells are not yet fully understood.

In this study we provide evidence that high sympathetic tonus generated by exposure of homeothermic animals to cold induces an increase of PGC-1 and UCP-2 protein amounts in the pancreatic islets, and that blockade of expression of either protein partially reverses cold-induced inhibition of insulin secretion. Since UCP-2 expression in mice pancreatic islet inhibits ATP production and through this mechanism interferes with insulin secretion [11], we hypothesized that the hyperpolarization of beta cells described in adrenergic-stimulated islets could be due to decreased ATP production as consequence of higher UCP-2 expression.

UCP-2 is a member of the mitochondrial uncoupling protein family [26, 27]. Proteins that belong to this family are characterized by sub-cellular localization to the inner mitochondrial membrane where they uncouple biochemical respiration from oxidative phosphorylation by leaking protons into the mitochondrial matrix, which leads to a bypass of ATP synthase [28]. UCP-1 is the prototype of uncoupling proteins. It is predominantly expressed in brown adipose tissue

Fig. 5a–i. Effect of PGC-1 protein expression blockade upon UCP-2 expression and insulin secretion of pancreatic islets isolated from cold exposed rats. The protein amounts of PGC-1 and UCP-2 (a) were determined in protein extracts obtained from islets of rats maintained at thermoneutrality (C) or exposed to cold (4°C) and treated with sense (s) or antisense (as) PGC-1 phosphorothioate-modified oligonucleotide. 200 μg of total protein extracts from each group were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted with anti-PGC-1 (a, upper blot) or anti-UCP-2 (a, lower blot) antibodies. Groups of five islets/well isolated from rats maintained at thermoneutrality (C) (b, d, f, h) or exposed to cold (4°C) (c, e, g, i), were incubated in the presence of 2.8 mmol/l glucose (b–e) or 16.7 mmol/l glucose (f–i) and evaluated for static insulin secretion. Groups of islets were previously treated with sense (s), antisense (as) or no (wo) PGC-1 phosphorothioate-modified oligonucleotide. In all experiments $n=6$, * $p<0.05$ vs. wo



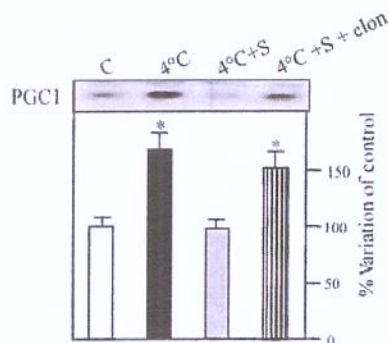


Fig. 6. Effect of in vivo clonidine treatment upon PGC-1 expression in pancreatic islets of cold-exposed, sympathectomized rats. The protein amounts of PGC-1 were determined in protein extracts obtained from islets of rats maintained at thermoneutrality (C), exposed to cold (4°C), exposed to cold and submitted to sympathectomy ($4^{\circ}\text{C}+\text{S}$) and exposed to cold, submitted to sympathectomy and treated with clonidine ($4^{\circ}\text{C}+\text{S}+\text{clon}$). 200 μg of total protein extracts from each group were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted with anti-PGC-1 antibody. $n=6$, $*p<0.05$ vs. control (C)

and participates in adaptive thermogenesis [29]. UCP-2 [30] and UCP-3 [31] have been identified more recently and are expressed in different tissues than UCP-1. UCP-2 is the homologue with the widest distribution and the only one reported to be expressed in pancreatic islets [32]. In a recent study, pathophysiological significance for UCP-2 expression in pancreatic islets was established in the obesity prone, leptin deficient ob/ob mouse [11]. According to this study obese mice express higher amounts of UCP-2 in the pancreatic islets than their respective controls. By intercrossing heterozygous ob/+ with UCP-2 +/- mice, double KO mice were generated (ob/ob, UCP-2 -/-). The abrogation of UCP-2 expression in ob/ob mice led to an improvement of first phase insulin secretion and whole body glucose metabolism [11]. It is of interest that exposure of pancreatic islets to leptin inhibits UCP-2 expression [33]. Thus, in ob/ob mice the lack of leptin could be the main factor responsible for increased islet UCP-2 expression. Another possible linkage between UCP-2 expression in pancreatic islets and anomalous insulin secretion refers to the fact that some fatty acids induce UCP expression and function, so it is possible that defective insulin secretion observed in some hyperlipidaemic states could be a consequence of UCP-2 expression [34, 35]. Therefore, in at least two examples of defective insulin secretion, a possible involvement of UCP-2 hyperexpression in pancreatic islets has been described. However, in none of these conditions the molecular mechanisms that lead to increased UCP-2 expression were shown.

PGC-1 is a nuclear receptor coactivator initially shown to be expressed in response to cold exposure in brown adipose tissue and skeletal muscle [36]. There is a difference from most nuclear receptor coactivators, PGC-1 activity seems to be regulated mostly by

its tissue concentration [36]. The main physiological consequence of cold-induced PGC-1 expression in brown adipose tissue and skeletal muscle is the induction of UCP-1 protein expression and a subsequent increase in thermogenesis. The transcriptional control of the *Ucp-1* gene is regulated by cAMP levels contents [37], thyroid hormone [38] and PPAR γ [36]. The same seems to be true for UCP-2 gene transcriptional control [39, 40, 41].

Our study shows that PGC-1 is expressed at low amounts in rat pancreatic islets. Exposure of rats to a cold environment or treatment of isolated islets with an α adrenergic agonist augment PGC-1 expression, while sympathectomy prevents this effect. A straight correlation between PGC-1 and UCP-2 amounts was established and inhibition of PGC-1 expression abrogates both cold-induced UCP-2 hyperexpression and cold-induced defective insulin secretion. In fact, this study shows that partial blockade of PGC-1 or UCP-2 expression results in up to a 60% increase in basal and a 55% increase in glucose-induced insulin secretion. However, this increase was not sufficient to completely overcome the secretion defect induced by cold exposure. As reviewed elsewhere [42], reduction of cAMP accumulation in pancreatic islets is responsible for some, but not all, inhibitory effects of an adrenergic stimulus upon insulin secretion. By stimulating PGC-1 protein expression, adrenergic stimulus controls the amount of UCP-2 in pancreatic islets and therefore might modulate the ATP/ADP ratio. This mechanism, in parallel to classic dampening of cAMP signalling, transduces the inhibitory signal generated by adrenergic stimulus and thus regulates insulin secretion.

Acknowledgements. All studies were supported by grants from FAPESP.

References

1. Gilon P, Henquin JC (2001) Mechanisms and physiological significance of the cholinergic control of pancreatic beta-cell function. *Endocr Rev* 22:565–604
2. Berthoud HR, Fox EA, Powley TL (1990) Localization of vagal preganglionics that stimulate insulin and glucagon secretion. *Am J Physiol* 258:R160–R168
3. Ahren B, Karlsson S, Lindskog S (1990) Cholinergic regulation of the endocrine pancreas. *Prog Brain Res* 84:209–218
4. Henquin JC, Nenquin M (1988) The muscarinic receptor subtype in mouse pancreatic B-cells. *FEBS Lett* 236:89–92
5. Boscher AC, Szpak-Glasman M, Carneiro EM et al. (1995) Oxotremorine-m potentiation of glucose-induced insulin release from rat islets involves M3 muscarinic receptors. *Am J Physiol* 268:E336–E342
6. Sasaguri T, Hirata M, Itoh T, Koga T, Kuriyama H (1986) Guanine nucleotide binding protein involved in muscarinic responses in the pig coronary artery is insensitive to islet-activating protein. *Biochem J* 239:567–574
7. Chan SL, Perrett CW, Morgan NG (1997) Differential expression of alpha 2-adrenoceptor subtypes in purified rat pancreatic islet A- and B-cells. *Cell Signal* 9:71–78

8. Lacey RJ, Chan SL, Cable HC et al. (1996) Expression of alpha 2- and beta-adrenoceptor subtypes in human islets of Langerhans. *J Endocrinol* 148:531–543
9. Sharp GW (1996) Mechanisms of inhibition of insulin release. *Am J Physiol* 271:C1781–C1799
10. Ashcroft FM, Gribble FM (1999) ATP-sensitive K⁺ channels and insulin secretion: their role in health and disease. *Diabetologia* 42:903–919
11. Zhang CY, Baffy G, Perret P et al. (2001) Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, beta cell dysfunction, and type 2 diabetes. *Cell* 105:745–755
12. Chan CB, MacDonald PE, Saleh MC, Johns DC, Marban E, Wheeler MB (1999) Overexpression of uncoupling protein 2 inhibits glucose-stimulated insulin secretion from rat islets. *Diabetes* 48:1482–1486
13. Vallerand AL, Frim J, Kavanagh MF (1988) Plasma glucose and insulin responses to oral and intravenous glucose in cold-exposed humans. *J Appl Physiol* 65:2395–2399
14. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA et al. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389–3402
15. Bonora E, Manicardi V, Zavanoni I, Coscelli C, Butturini U (1987) Relationships between insulin secretion, insulin metabolism and insulin resistance in mild glucose intolerance. *Diabet Metab* 13:116–121
16. Larson GM, Sullivan HW, O'Dorisio T (1985) Surgical sympathectomy increases pancreatic polypeptide response to food. *Surgery* 98:236–242
17. Gurtu S, Shukla S, Mukerjee D (1994) Morphine, clonidine coadministration in subanalgesic doses: effective control of tonic pain. *Neuroreport* 5:715–717
18. Bjork E, Velloso LA, Kampe O, Karlsson FA (1994) GAD autoantibodies in IDDM, stiff-man syndrome, and autoimmune polyendocrine syndrome type I recognize different epitopes. *Diabetes* 43:161–165
19. Araujo EP, Amaral ME, Souza CT et al. (2002) Blockade of IRS1 in isolated rat pancreatic islets improves glucose-induced insulin secretion. *FEBS Lett* 531:437–442
20. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
21. Velloso LA, Folli F, Sun XJ, White MF, Saad MJ, Kahn CR (1996) Cross-talk between the insulin and angiotensin signaling systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:12490–12495
22. Newgard CB (2002) While tinkering with the beta-cell...metabolic regulatory mechanisms and new therapeutic strategies: American Diabetes Association Lilly Lecture, 2001. *Diabetes* 51:3141–3150
23. Porte D Jr, Williams RH (1966) Inhibition of insulin release by norepinephrine in man. *Science* 152:1248–1250
24. Nakaki T, Nakadate T, Ishii K, Kato R (1981) Postsynaptic alpha-2 adrenergic receptors in isolated rat islets of Langerhans: inhibition of insulin release and cyclic 3',5'-adenosine monophosphate accumulation. *J Pharmacol Exp Ther* 216:607–612
25. Nilsson T, Arkhammar P, Rorsman P, Berggren PO (1988) Inhibition of glucose-stimulated insulin release by alpha 2-adrenoceptor activation is paralleled by both a repolarization and a reduction in cytoplasmic free Ca²⁺ concentration. *J Biol Chem* 263:1855–1860
26. Jezek P, Engstova H, Zackova M et al. (1998) Fatty acid cycling mechanism and mitochondrial uncoupling proteins. *Biochim Biophys Acta* 1365:319–327
27. Skulachev VP (1998) Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochim Biophys Acta* 1363:100–124
28. Polonsky KS, Semenkovich CF (2001) The pancreatic beta cell heats up: UCP-2 and insulin secretion in diabetes. *Cell* 105:705–707
29. Klingenberg M, Huang SG (1999) Structure and function of the uncoupling protein from brown adipose tissue. *Biochim Biophys Acta* 1415:271–296
30. Fleury C, Neverova M, Collins S et al. (1997) Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat Genet* 15:269–272
31. Boss O, Samec S, Paoloni-Giacobino A et al. (1997) Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. *FEBS Lett* 408:39–42
32. Zhou YT, Shimabukuro M, Koyama K et al. (1997) Induction by leptin of uncoupling protein-2 and enzymes of fatty acid oxidation. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:6386–6390
33. Brown JE, Thomas S, Digby JE, Dunmore SJ (2002) Glucose induces and leptin decreases expression of uncoupling protein-2 mRNA in human islets. *FEBS Lett* 513:189–192
34. Briand I, Kelpke CL, Johnson LM, Tran PO, Poitout V (2002) Differential effects of hyperlipidemia on insulin secretion in islets of Langerhans from hyperglycemic versus normoglycemic rats. *Diabetes* 51:662–668
35. Li LX, Skorpen F, Egeberg K, Jorgensen IH, Grill V (2002) Induction of uncoupling protein 2 mRNA in beta-cells is stimulated by oxidation of fatty acids but not by nutrient oversupply. *Endocrinology* 143:1371–1377
36. 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
37. Cassard-Doulcier AM, Gelly C, Fox N et al. (1993) Tissue-specific and beta-adrenergic regulation of the mitochondrial uncoupling protein gene: control by cis-acting elements in the 5'-flanking region. *Mol Endocrinol* 7:497–506
38. Silva JE, Rabelo R (1997) Regulation of the uncoupling protein gene expression. *Eur J Endocrinol* 136:251–264
39. Armstrong MB, Towle HC (2001) Polyunsaturated fatty acids stimulate hepatic UCP-2 expression via a PPARalpha-mediated pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281:E1197–E1204
40. Nakatani T, Tsuboyama-Kasaoka N, Takahashi M, Miura S, Ezaki O (2002) Mechanism for peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activator-induced up-regulation of UCP-2 mRNA in rodent hepatocytes. *J Biol Chem* 277:9562–9569
41. Lopez-Solache I, Marie V, Camirand A, Silva JE (2002) Regulation of uncoupling protein-2 mRNA in L6 myotubes: II: thyroid hormone amplifies stimulation of uncoupling protein-2 gene by thiazolidinediones and other peroxisome proliferator-activated receptor ligands in L6 myotubes: evidence for a priming effect. *Endocrine* 19:209–217
42. Ahren B (2000) Autonomic regulation of islet hormone secretion—implications for health and disease. *Diabetologia* 43:393–410

4.2 – ARTIGO 2

Short-term inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α expression reverts diet-induced diabetes mellitus and hepatic steatosis in mice

Diabetologia, 48 (9): 1860-71, 2005.

C. T. De Souza · E. P. Araújo · P. O. Prada ·
M. J. A. Saad · A. C. Boschero · L. A. Velloso

Short-term inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α expression reverses diet-induced diabetes mellitus and hepatic steatosis in mice

Received: 20 September 2004 / Accepted: 18 April 2005 / Published online: 16 July 2005
© Springer-Verlag 2005

Abstract *Aims/hypothesis:* The coactivator of nuclear receptors, peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α (PGC-1 α) has been implicated in a series of events that contribute to the control of glucose metabolism. We have recently reported the use of a PGC-1 α antisense oligonucleotide (PGC-1 α AS) that inhibits up to 60% of PGC-1 α expression in pancreatic islets, leading to increased insulin secretion. This oligonucleotide was used in this study to try to ameliorate diet-induced type 2 diabetes in a genetically predisposed mouse strain (Swiss mice). *Materials and methods:* Glucose and insulin tolerance tests, euglycaemic-hyperinsulinaemic clamp, immunoprecipitation assays, immunoblotting assays and immunohistochemistry were used in this investigation. *Results:* Swiss mice became obese and overtly diabetic after 8 weeks of feeding with chow containing 24% saturated fat. One daily dose (1.0 nmol) of PGC-1 α AS significantly reduced glucose and increased insulin blood levels without affecting food intake and body weight. These effects were accompanied by a reduced area under the glucose curve during an intraperitoneal glucose tolerance test, an increased constant of glucose decay (K_{it}) during an insulin tolerance test, and an increased glucose consumption rate during a euglycaemic-hyperinsulinaemic clamp. Moreover, mice

treated with PGC-1 α AS presented an outstanding reduction of macroscopic and microscopic features of hepatic steatosis. These effects were accompanied by reduced expression or function of a series of proteins involved in lipogenesis. *Conclusions/interpretation:* PGC-1 α is an attractive target for pharmacological therapeutics in type 2 diabetes mellitus and diet-induced hepatic steatosis.

Keywords Insulin resistance · Obesity · Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α · PGC-1 α · Steatosis

Abbreviations ACC: acetyl CoA carboxylase · AMPK: AMP-activated kinase · CBA/Uni/C: CBA/Uni mice fed with standard rodent chow · CBA/Uni/F: CBA/Uni mice fed with fat-rich chow · CREB: cyclic AMP response element binding protein · CPT-1: carnitine palmitoyl transferase-1 · FAS: fatty acid synthase · HNF-4 α : hepatocyte nuclear factor-4 α · IR: insulin receptor · ITT: insulin tolerance test · PPAR α : peroxisome proliferator-activated receptor- α · PPAR γ : peroxisome proliferator-activated receptor- γ · PGC-1 α : peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α · PGC-1 α AS: peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α antisense oligonucleotide · PGC-1 α S: peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α sense oligonucleotide · pY: phosphotyrosine · SW/Uni/C: SW/Uni mice fed with standard rodent chow · SW/Uni/F: SW/Uni mice fed with fat-rich chow · WAT: white adipose tissue · SRC-1: steroid receptor coactivator-1 · SREBP-1c: sterol-regulatory element-binding-protein-1c

C. T. De Souza · E. P. Araújo · P. O. Prada · M. J. A. Saad ·
L. A. Velloso (✉)
Department of Internal Medicine,
Faculty of Medical Sciences (FCM),
State University of Campinas (UNICAMP),
Campinas, São Paulo, 13083-970, Brazil
e-mail: lavelloso@fcm.unicamp.br
Tel.: +55-19-37888022
Fax: +55-19-37888950

A. C. Boschero
Department of Physiology and Biophysics,
State University of Campinas,
Campinas, Brazil

L. A. Velloso
Laboratory of Experimental Gastroenterology-Gastrocentro,
State University of Campinas,
Campinas, Brazil

Introduction

Insulin resistance and type 2 diabetes mellitus are the phenotypic results of complex interactions between genetic and environmental predisposing factors [1, 2]. In recent years, the progressive increase in the prevalence of obesity in populations of several areas of the world has contrib-

uted enormously to the parallel increase in the prevalence of diabetes mellitus [2, 3]. Although dietetic and behavioural approaches, associated with the use of currently available drugs, contribute to a certain degree to loss of body weight and improved control of blood glucose levels, the optimal therapeutic approach for diabetes has yet to be developed [4]. In this regard, the search for candidate targets for drug action that may be useful for the control of this metabolic disease is the main focus of much of the current research in this field [4].

Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α (PGC-1 α) is a 795-amino-acid protein identified in brown adipose tissue and skeletal muscle by a yeast two-hybrid system [5]. As a transcriptional coactivator, PGC-1 α has several functional domains that participate in protein-protein interaction with PPAR γ [5], PPAR α [6], nuclear respiratory factor [7], cyclic AMP response element binding protein (CREB)-binding protein [8], hepatocyte nuclear factor-4 α (HNF-4 α) [9, 10], forkhead transcription factor-1 [11], steroid receptor coactivator-1 [12] and myocyte enhancer factor-2 [13]. Recent studies have implicated PGC-1 α expression in the control of glucose uptake and insulin sensitivity in muscle cells [13] and the liver [6]. Moreover, at least two clinical series have found a correlation between mutations of the *Ppargc1a* (previously known as PGC-1 α gene) and insulin resistance or diabetes [14, 15].

In a previous study, we employed an antisense phosphorothioate-modified oligonucleotide to PGC-1 α (PGC-1 α AS), which inhibits the expression of this protein by up to 60% in pancreatic islets and leads to a significant increase in glucose-stimulated insulin secretion [16]. As the development of diabetes in primary insulin-resistant subjects is thought to be a consequence of a failure of the pancreatic beta cell to compensate for the peripheral demand for insulin [17], we used PGC-1 α AS in an attempt to reverse diet-induced diabetes in a genetically predisposed mouse strain. To our surprise, not only a significant improvement in insulin secretion was achieved, but also increased insulin action in peripheral tissues and an outstanding amelioration of hepatic steatosis.

Materials and methods

Antibodies, chemicals and buffers

Reagents for SDS-PAGE and immunoblotting were from Bio-Rad (Richmond, CA, USA). HEPES, phenylmethylsulphonyl fluoride, aprotinin, dithiothreitol, Triton X-100, Tween 20, glycerol and bovine serum albumin (fraction V) were from Sigma (St Louis, MO, USA). ¹²⁵I-protein A and nitrocellulose paper (BA85, 0.2 μ m) were from Amersham (Aylesbury, UK). Sodium thiopental and human recombinant insulin (Humulin R) were from Lilly (Indianapolis, IN, USA). Anti-insulin receptor (IR) (sc-711, rabbit polyclonal), anti-Akt (sc-1618, goat polyclonal), anti-phosphotyrosine (pY) (sc-508, mouse monoclonal), anti-phospho [Ser⁴⁷³]Akt (rabbit polyclonal, sc-7985-R), anti-PGC-1 α

(goat polyclonal, sc-5816), anti-fatty acid synthase (FAS) (goat polyclonal, sc-16146), anti-carnitine palmitoyl transferase-1 (CPT-1) (goat polyclonal, sc-20514), anti-HNF-4 α (goat polyclonal, sc-6556) and anti-peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ) (rabbit polyclonal, sc-7196) antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Anti-phospho [Thr¹⁷²]AMP-activated kinase (AMPK) (rabbit polyclonal, no. 2531S) was from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA) and anti-phospho [Ser⁷⁹]acetyl CoA carboxylase (ACC) (rabbit polyclonal, no. 07-184) was from Upstate Biotechnology (Charlottesville, VA, USA).

Sense and antisense oligonucleotide treatment protocols

Sense and antisense oligonucleotides (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) were diluted to a final concentration of 5.0 μ mol/l in dilution buffer containing 10 mmol/l Tris-HCl and 1.0 mmol/l EDTA. The mice were injected (i.p.) with one daily dose of 200 μ l dilution buffer containing, or not, sense (PGC-1 α /S) or antisense (PGC-1 α /AS) oligonucleotides. Phosphorothioate-modified oligonucleotides were designed according to the *Mus musculus* and *Rattus norvegicus* *Ppargc1a* sequences deposited at the NIH-NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>) under the designations BC 066868 and NM 031347, and were composed of sense (5'- TCA GGA GCT GGA TGG C -3') and antisense (5'- GCC ATC CAG CTC CTG A -3'). These oligonucleotides have been tested previously: PGC-1 α /AS reduced the expression of PGC-1 α by around 60% in pancreatic islets [16] and around 70% in skeletal muscle [18].

Experimental protocols

Male, 4-week-old Swiss (SW/Uni) and CBA/Uni mice, inbred strains, originally imported from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) and currently bred at the State University of Campinas Breeding Center were used in all experiments. The investigation followed the University guidelines for the use of animals in experimental studies and conformed to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH publication no. 85-23, revised 1996). The animals were maintained on a 12-h artificial light-dark cycle and housed in individual cages. After the acclimatising period (3 days), the animals were randomly divided into four experimental groups: SW/Uni mice fed with standard rodent chow (SW/Uni/C), SW/Uni mice fed with fat-rich chow (SW/Uni/F; composition, see Table 1), CBA/Uni mice fed with standard rodent chow (CBA/Uni/C), and CBA/Uni mice fed with fat-rich chow (CBA/Uni/F). In the first part of the study the animals were evaluated every 4 weeks for biochemical and hormonal parameters to assess diet-induced modulation of glucose homeostasis. Blood samples were always collected at 11.00

Table 1 Macronutrient composition of diets

	Standard chow		Fat-rich chow	
	g%	kJ%	g%	kJ%
Protein	19	20	24	20
Carbohydrate	67	70	41	35
Saturated fat	4	10	24	45
kJ/g	15.8		19.6	

hours, after 4 h of fasting. Eight weeks of fat-rich diet feeding was set as the time by which all SW/Uni/C mice should have developed diabetes; after this period a second part of the study was started. In this experimental approach, SW/Uni/C and SW/Uni/F were treated either with a daily dose of oligonucleotide dilution vehicle, with PGC-1 α /S oligonucleotides or with PGC-1 α /AS oligonucleotides from the 8th week of the diet onwards. In this part of the study, hormonal and biochemical parameters were evaluated every second day. At day 16 of oligonucleotide treatment, glucose and insulin tolerance tests were performed. Some animals were anaesthetised and tissue was extracted for measurement of PGC-1 α expression, liver histology, triglyceride content, insulin-induced activation of IR and Akt signalling and expression of key proteins of the liver metabolism.

Hormone and biochemical measurements

Plasma insulin was measured by RIA according to a previously described method [19]. Serum glucose was measured by the glucose oxidase method [20]. Serum triglycerides were assessed by colorimetric assays (Wako Chemicals, Neuss, Germany). Liver total lipids were measured by the gravimetric method.

Intraperitoneal glucose tolerance test

After an overnight fast, the mice were anaesthetised, and following the collection of an unchallenged sample (time 0), a solution of 25% glucose (11.1 mmol/kg body weight) was administered into the peritoneal cavity. Blood samples were collected from the tail at 30, 60, 90 and 120 min for measurement of glucose and insulin concentrations.

Insulin tolerance test

Insulin (14.5 nmol/kg) was administered by intraperitoneal injection and blood samples were collected at 0, 5, 10, 15, 20, 25 and 30 min for measurement of serum glucose. The constant rate for glucose disappearance (K_{it}) was calculated using the formula $0.693/t_{1/2}$. The glucose $t_{1/2}$ was calculated from the slope of the least-square analysis of the plasma glucose concentrations during the linear decay phase [21].

Clamp studies

After a 4-h fast, a 2-h euglycaemic-hyperinsulinaemic clamp study was performed in the lower limb. Under sodium thiopental anaesthesia and aseptic conditions, a mono-occlusive polyethylene catheter was inserted into the femoral artery for infusion of insulin and glucose. A second polyvinyl catheter was inserted into the femoral vein, for blood sampling, and the animal was kept in a heated box (37°C) throughout the study. During the first phase of the study (30 min), a priming dose of insulin was infused at a rate of $3.6 \text{ mU kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ to achieve steady state concentrations of plasma insulin. After glucose equilibration, insulin infusion was maintained for 2 h with constant rate, and a variable infusion of glucose (5% solution) was adjusted to maintain the serum glucose concentration at approximately 6.6 mmol/l. Blood samples were collected from the femoral vein every 5 min for serum glucose measurement and every 30 min for measurement of plasma insulin. Insulin was measured in duplicate by RIA and oscillated between 0.65 and 15.0 nmol/l in samples collected from animals of both experimental groups.

Liver histology

Hydrated, 5.0- μm sections of paraformaldehyde-fixed, paraffin-embedded liver fragments were stained with haematoxylin-eosin, and analysed and photo-documented using an Olympus BX60 microscope.

Immunoprecipitation and immunoblotting

The abdominal cavities of anaesthetised mice were opened and the animals received an infusion of insulin (200 μl , 10^{-6} mol/l) or saline (200 μl) through the cava vein. After different intervals (see Results), fragments ($3.0 \times 3.0 \times 3.0 \text{ mm}$) of white adipose tissue (WAT) and liver were excised and immediately homogenised in solubilisation buffer at 4°C (1% Triton X-100, 100 mmol/l Tris-HCl [pH 7.4], 100 mmol/l sodium pyrophosphate, 100 mmol/l sodium fluoride, 10 mmol/l EDTA, 10 mmol/l sodium orthovanadate, 2.0 mmol/l phenylmethylsulphonyl fluoride and 0.1 mg aprotinin/ml) using a Polytron PTA 20S generator (model PT 10/35; Brinkmann Instruments, Westbury, NY, USA). Insoluble material was removed by centrifugation for 20 min at 9,000 g in a 70.Ti rotor (Beckman, Fullerton, CA, USA) at 4°C. The protein concentration of the supernatants was measured by the Bradford dye-binding method. Aliquots of the resulting supernatants containing 5.0 mg of total protein were used for immunoprecipitation overnight with antibodies against IR at 4°C, followed by SDS-PAGE, transfer to nitrocellulose membranes and blotting with anti-pY antibodies. In direct immunoblot experiments, 0.2 mg of protein extracts obtained from each tissue were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted with

anti-IR, anti-Akt, anti-phospho [Ser⁴⁷³]Akt, anti-PGC-1 α , anti-HNF-4 α , anti-phospho [Thr¹⁷²]AMPK, anti-phospho [Ser⁷⁹]ACC, anti-CPT-1, anti-FAS and anti-PPAR γ antibodies. Specific bands were labelled with ¹²⁵I-protein A, as previously described [22]. Visualisation of protein bands was performed by exposure of membranes to RX-films.

Statistical analysis

Specific protein bands present in the blots were quantified by digital densitometry (ScionCorp, Frederick, MD, USA). Mean values $\pm$ SEM obtained from densitometric scans, and values for insulin, glucose, triglycerides, body weight, glucose consumption rates and food intake were compared using the Tukey–Kramer test (ANOVA). A *p* value of less than 0.05 was accepted as statistically significant.

Results

Metabolic characterisation of the animal model

Swiss/SW and CBA are mice strains genetically related to the obesity- and diabetes-prone AKR strain [23]. To evaluate the metabolic consequences of long-term exposure to a fat-rich diet, Swiss (SW/Uni) and CBA (CBA/Uni) mice were fed exclusively with a fat-rich diet (Table 1) from the fourth week of age and compared, every fourth week, with respective controls (fed regular rodent chow), for body weight variation, mean daily food ingestion, serum glucose and plasma insulin. As shown in Fig. 1, SW/Uni fed a fat-rich diet (SW/Uni/F) became obese, hyperinsulinaemic and hyperglycaemic after 8 weeks of fat-rich feeding. CBA/Uni fed a fat-rich diet (CBA/Uni/F) also became obese (more than 30% body weight increase as compared with respective controls, *p*<0.05) and hyperinsulinaemic, but did not develop diabetes. Fat-rich feeding did not promote significant changes in mean daily food intake in any of the strains (data not shown).

Ageing and fat-rich diet feeding increased the expression of PGC-1 α in the liver and adipose tissue

To evaluate the effect of fat-rich feeding on the expression of PGC-1 α , SW/Uni and CBA/Uni mice fed regular chow or a fat-rich diet were maintained on respective diets for 0, 8, 12 or 16 weeks. At the end of predetermined experimental periods, fragments of liver and adipose tissue were obtained for protein extraction and immunoblotting experiments. As shown in Fig. 2, the protein levels of PGC-1 α were very low in both tissues, in SW/Uni and CBA/Uni mice, before introduction of the experimental diet (at the fourth week of age). Both ageing and a fat-rich diet promoted significant increases in PGC-1 α expression in the liver and adipose tissue in the two strains evaluated.

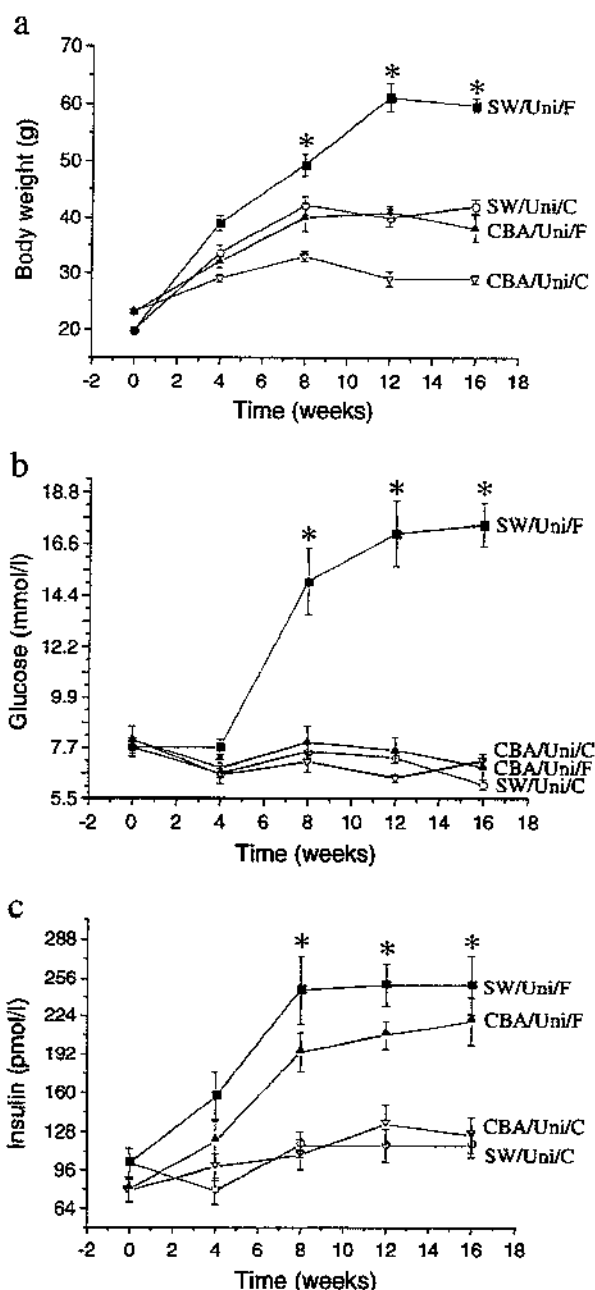
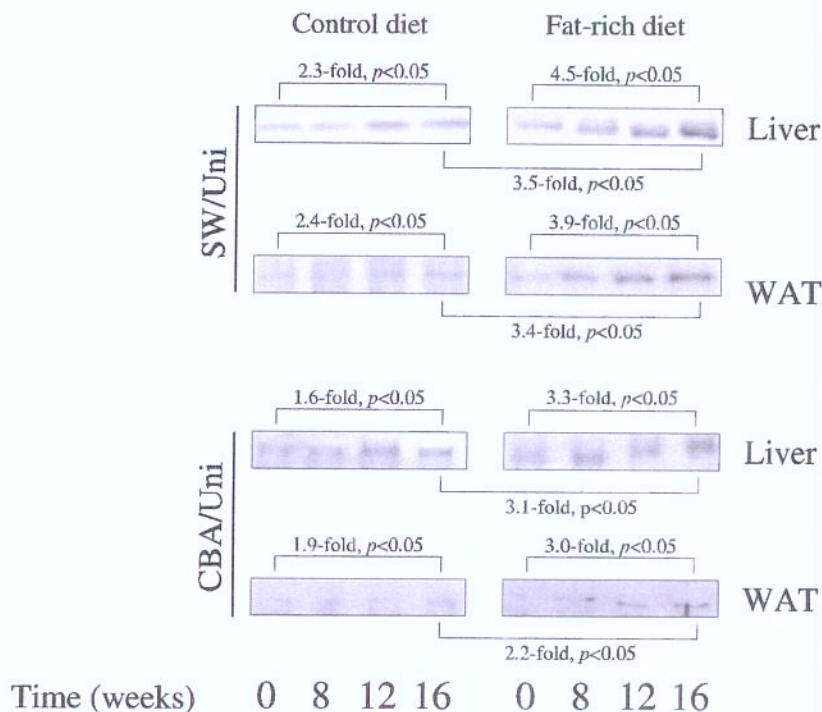


Fig. 1 Body mass (a), serum glucose (b) and plasma insulin (c) levels in SW/Uni and CBA/Uni mice fed a regular (C) or fat-rich (F) diet. Respective diets were introduced at 4 weeks of age and parameters were evaluated every 4 weeks. For all experiments the results are presented as means $\pm$ SEM of *n*=6; **p*<0.05 vs. SW/Uni/C mice

Inhibition of PGC-1 α expression reversed diet-induced diabetes

To evaluate the effect of the inhibition of PGC-1 α expression on the glucose homeostasis of SW/Uni mice, a phosphorothioate-modified antisense oligonucleotide to PGC-1 α (PGC-1 α /AS) was used. Given that glucose and insulin levels became significantly higher from 8 weeks

Fig. 2 Immunoblot evaluation of PGC-1 α expression in the liver and WAT of SW/Uni and CBA/Uni mice fed a regular (control) or fat-rich diet. Mice were introduced to the respective diets at 4 weeks of age (time 0). Groups of four mice were randomly selected every 4 weeks (up to 16 weeks) for extraction of liver and WAT protein. Samples containing 0.2 mg total protein were resolved by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted with anti-PGC-1 α antibodies. Specific bands were quantified by digital scanning densitometry. For all experiments, $n=4$ and results are presented as mean fold increase in band digital density



after the introduction of the fat-rich diet in SW/Uni mice, we decided to begin PGC-1 α /AS treatment from the eighth experimental week onwards. The potency of PGC-1 α /AS was tested in a dose-response experiment. As shown in Fig. 3a, a daily dose of 0.5 nmol PGC-1 α /AS was sufficient to inhibit PGC-1 α expression by $44\pm7\%$ and $40\pm8\%$ ($n=4$, $p<0.05$), while 2.0 nmol/day resulted in $86\pm11\%$ and $75\pm14\%$ ($n=4$, $p<0.05$) inhibition of PGC-1 α expression in the liver and adipose tissue of SW/Uni/F mice, respectively. One daily dose of 1.0 nmol PGC-1 α /AS was sufficient to inhibit PGC-1 α expression by $84\pm12\%$ and $70\pm13\%$ ($n=4$, $p<0.05$) in the liver and adipose tissue of SW/Uni/F mice, respectively (Fig. 3a,b), and was therefore used in the remaining experiments. PGC-1 α /AS promoted no significant changes in the expression of the structural proteins actin and vimentin in the liver and adipose tissue, respectively (Fig. 3b). From the eighth day of PGC-1 α /AS administration, the levels of serum glucose became significantly lower than control levels and presented a continuous drop until reaching the level of 7.2 mmol/l at the 14th day (Fig. 3c). The levels of plasma insulin increased significantly from the tenth day of PGC-1 α /AS treatment (Fig. 3d). PGC-1 α /AS caused no significant changes in body mass and food intake (Fig. 3e,f). However, during an intraperitoneal glucose tolerance test, mice treated with PGC-1 α /AS presented a reduced area under the glucose curve and an increased area under the insulin curve (Fig. 4a,b), and during an ITT, a higher constant of glucose decay (K_{it}) was observed in PGC-1 α /AS mice (Fig. 4c). Finally, during a euglycaemic-hyperinsulinaemic clamp, an increase in glucose consumption rate (new rate 75%) was observed in PGC-1 α /AS mice (Fig. 4d).

Improved insulin signal transduction in the liver and adipose tissue of PGC-1 α /AS-treated mice

To evaluate the effect of PGC-1 α /AS on the activity of the insulin signal transduction pathway, we anaesthetised SW/Uni/F mice, treated or not with PGC-1 α /AS for 16 days, and injected a single dose of saline (200 μ l) or insulin (200 μ l, 10^{-6} mol/l) through the cava vein. After 2 or 5 min, fragments of liver and WAT were obtained and used in typical immunoprecipitation and immunoblotting experiments to assess tyrosine phosphorylation of the IR, and [Ser⁴⁷³]-phosphorylation of Akt. As depicted in Fig. 5, inhibition of PGC-1 α expression was associated with a significant increase in insulin-induced tyrosine phosphorylation of the IR (Fig. 5a,b) and [Ser⁴⁷³]-phosphorylation of Akt (Fig. 5c,d) in the liver and adipose tissue. These phenomena were accompanied by increased expression of IR in the liver and adipose tissue and increased expression of Akt in adipose tissue but not in the liver (Fig. 5).

Reversal of diet-induced hepatic steatosis by PGC-1 α /AS

During the preceding experiments, we observed outstanding macroscopic modification in the livers of mice fed a fat-rich diet. The livers of SW/Uni/F mice were yellowish in colour and slightly larger in size. After 16 days of PGC-1 α /AS treatment, the livers of SW/Uni/F mice recovered their reddish colour and normal size. Four SW/Uni/F mice treated with PGC-1 α /AS, PGC-1 α /S or vehicle for 16 days were randomly selected for histological

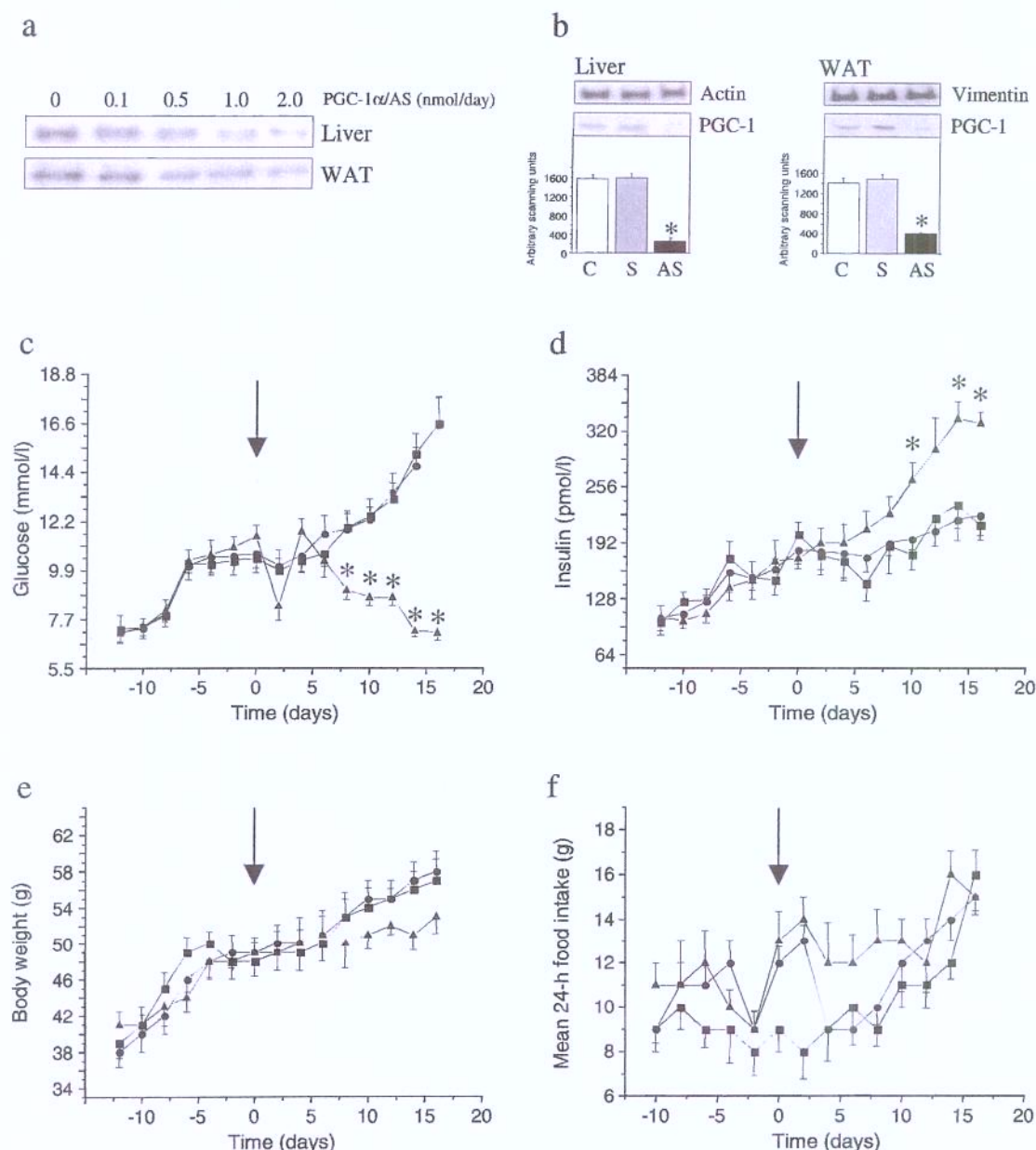


Fig. 3 Clinical and metabolic effects of PGC-1 α expression inhibition. **a, b** Immunoblot evaluation of PGC-1 α expression in the liver and WAT of SW/Uni mice fed a fat-rich diet and treated with a daily dose of sense (S) or antisense (AS) PGC-1 α oligonucleotide, or vehicle (C). **a** Dose-response to PGC-1 α AS; doses employed are depicted in the panel. **b** The dose of PGC-1 α S and PGC-1 α AS was 1.0 nmol/day. Liver and WAT protein extracts were obtained after 8 days of treatment and samples containing 0.2 mg protein were resolved by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted with anti-PGC-1 α , anti-actin or anti-vimentin antibodies. **c-f** Evaluation of effects of PGC-1 α expression inhibition

on serum glucose levels (**c**), plasma insulin levels (**d**), body mass (**e**) and mean daily food ingestion (**f**). In all of these experiments (**c-f**), groups of six SW/Uni mice fed a fat-rich diet were treated with a single daily dose (1.0 nmol) of PGC-1 α S (filled circles) or PGC-1 α AS (filled triangles) oligonucleotides and compared with controls (filled squares). Measurements (every 4 days) began 12 days before starting treatment with oligonucleotides (first dose of oligonucleotides is marked with the vertical arrow, time 0), and continued until the 16th day of oligonucleotide injection. Results are presented as means $\pm$ SEM of $n=4$ (**a, b**) or $n=6$ (**c-f**); * $p<0.05$ vs. C.

analysis of the liver. As shown in Fig. 6a, SW/Uni/F mice treated with vehicle or PGC-1 α S for 16 days presented a steatotic liver, with intra-hepatocyte fat depots predominantly in the perivenular zone with extension to the external areas of the lobule. Treatment with PGC-1 α AS

almost completely restored the microscopic aspect of the liver (Fig. 6a). In SW/Uni/F mice not treated with PGC-1 α AS, the serum levels of triglycerides were low while the concentration of total lipids in hepatic tissue was high. The treatment with PGC-1 α AS for 16 days promoted

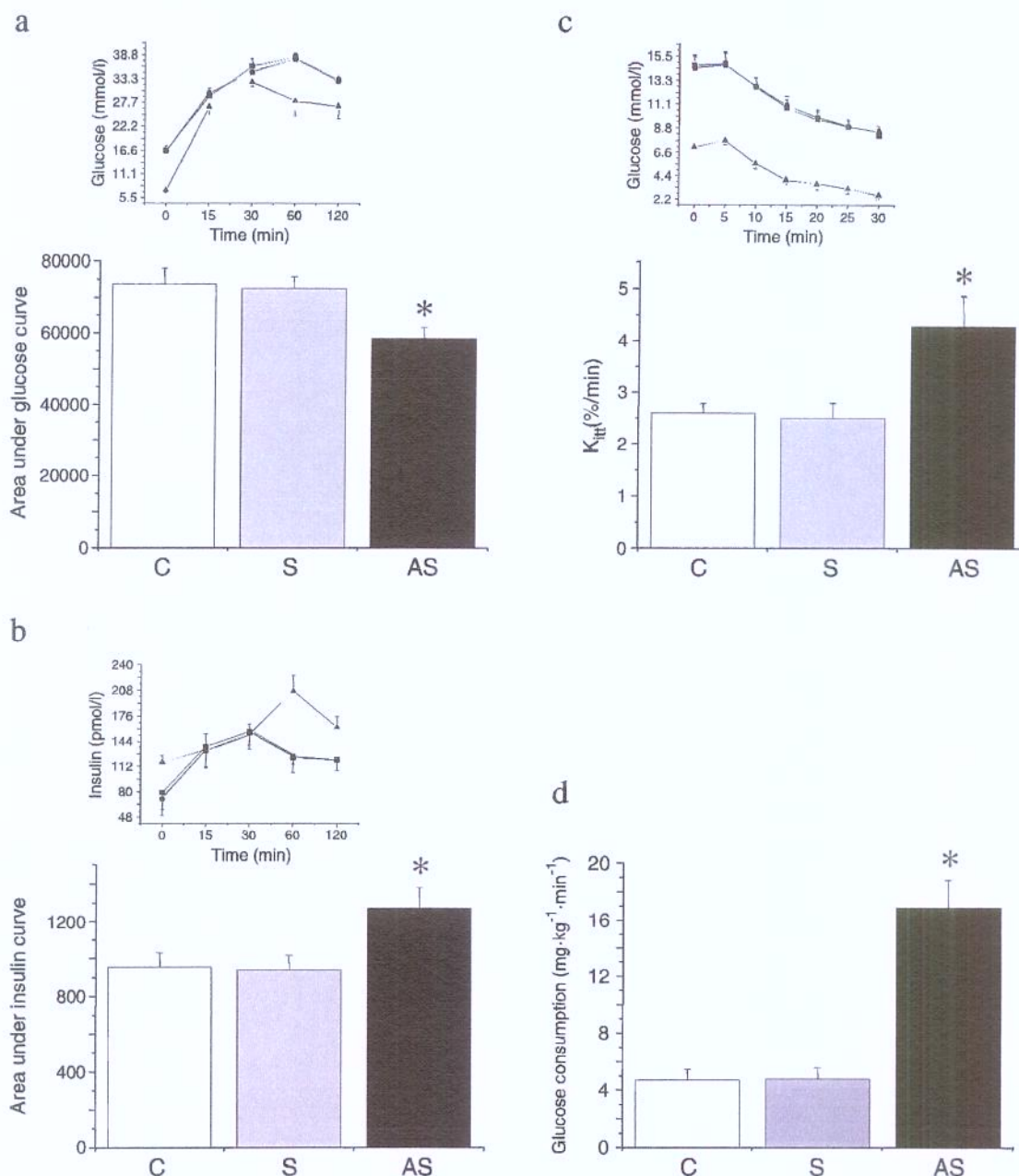


Fig. 4 Clinical and metabolic effects of PGC-1 α expression inhibition. For all experiments, groups of six SW/Uni mice fed a fat-rich diet were treated with a single daily dose (1.0 nmol) of PGC-1 α S (filled circles) or PGC-1 α AS (filled triangles) oligonucleotides and compared with controls (filled squares). Mice from each group were used for the assessment of the area under the glucose (a) and insulin (b) curves during a glucose tolerance test, or were submitted

for an ITT and the constant of glucose decay (K_{it}) was calculated (c). The excursion curves for glucose (a–c) and insulin (b) are depicted as insets. d The rate of glucose consumption ($\text{mg kg}^{-1} \text{min}^{-1}$) during a euglycaemic–hyperinsulinaemic clamp is presented. In all experiments the results are presented as means $\pm$ SEM of $n=6$; * $p < 0.05$ vs. C

significant reduction in liver total fat content but increased the levels of triglycerides in serum (Fig. 6b,c). Finally, the amount of protein (CPT-1, FAS, HNF-4 α and PPPA γ) or the molecular activation status (AMPK and ACC) of proteins involved in key steps of the control of liver lipogenesis and gluconeogenesis were evaluated by typical immunoblot. As expected, fat-rich feeding increased the

molecular activation of AMPK and inhibited the molecular activation of ACC, as measured by [Thr¹⁷²]-phosphorylation of the first and [Ser⁷⁹]-phosphorylation of the second enzyme (Fig. 6d). Moreover, a fat-rich diet increased the expression of CPT-1, FAS and PPPA γ , but promoted a significant reduction in HNF-4 α (Fig. 6d). The treatment with PGC-1 α /AS promoted a complete restoration of CPT-1 and

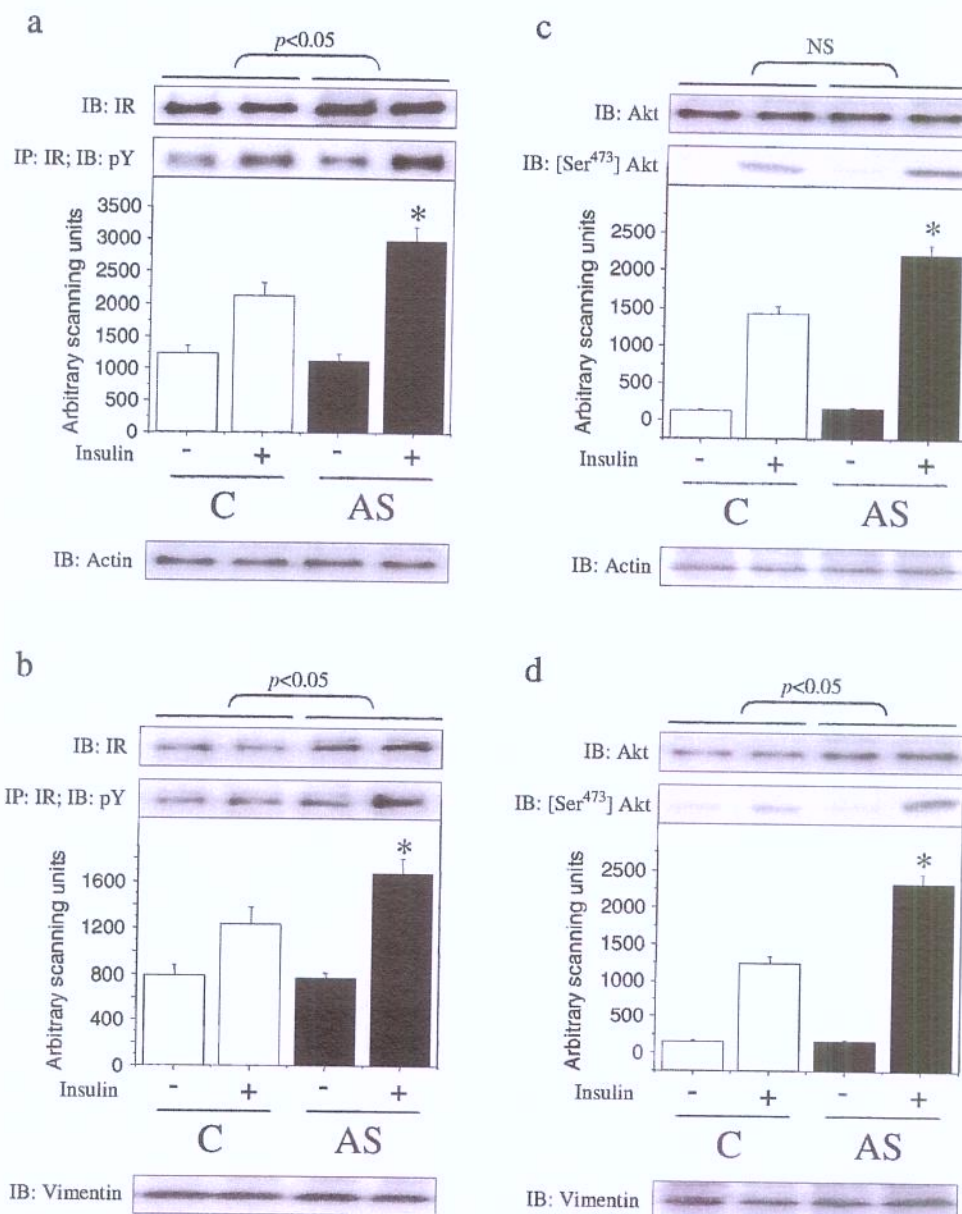


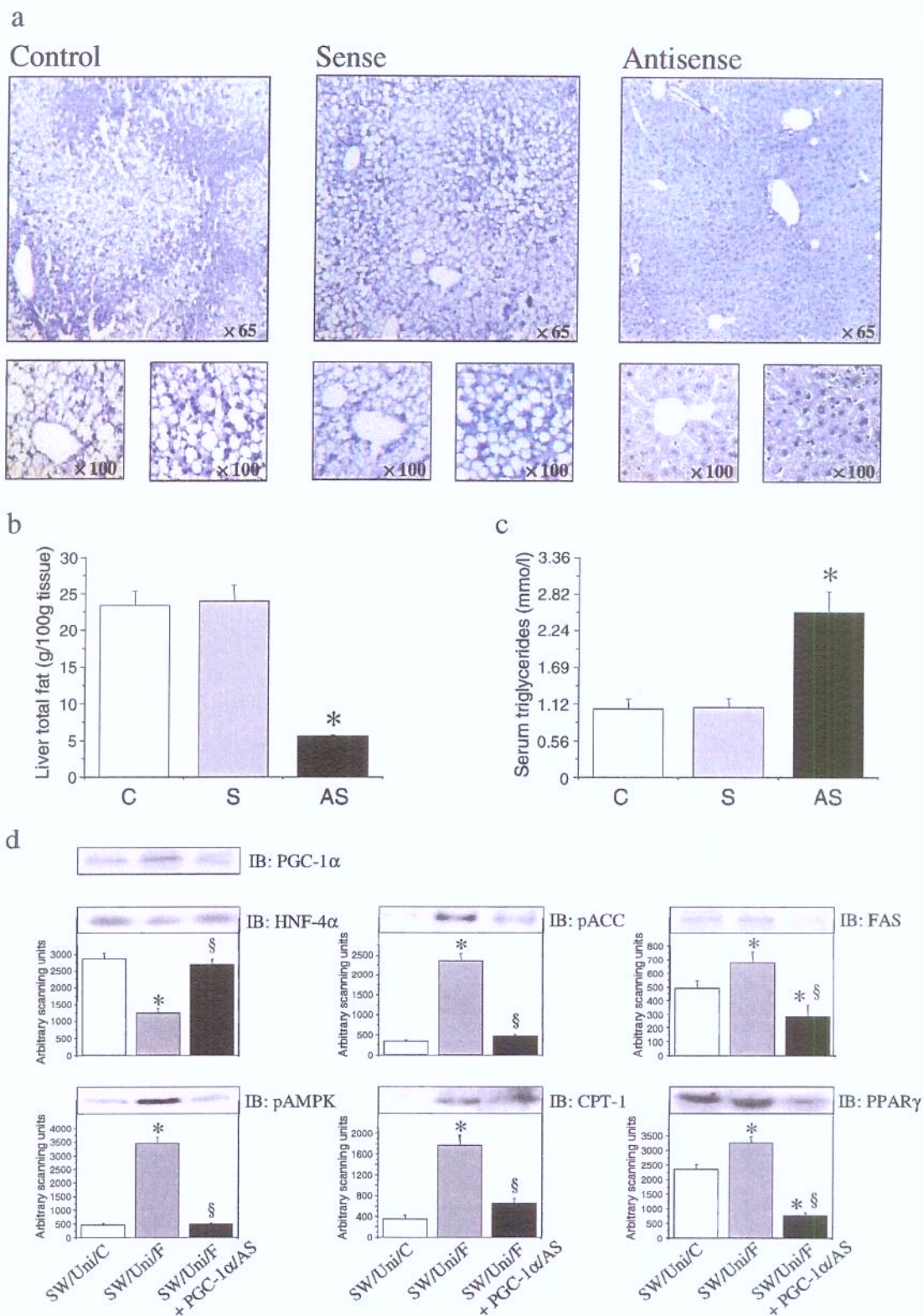
Fig. 5 Analysis of insulin-induced tyrosine phosphorylation of the IR (a, b) and of insulin-induced [Ser⁴⁷³] phosphorylation of Akt (c, d) in the liver (a, c) and WAT (b, d) of SW/Uni mice fed a fat-rich diet and treated (AS) or not (C) with the antisense oligonucleotide to PGC-1 α . Mice were treated for 16 days with a single daily dose (1.0 nmol) of oligonucleotide (AS) or vehicle (C). Insulin (+) (200 μ l, 10^{-6} mol/l) or a similar volume of saline (-) was injected through the cava vein, and after 2 min (a, b) or 5 min (c, d), fragments of liver and WAT were obtained for protein extraction. a, b Samples containing 5.0 mg were used in immunoprecipitation (IP) experiments with anti-IR antibodies; the immunocomplexes obtained were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes

and immunoblotted (IB) with anti-pY antibodies. c, d 0.2 mg protein was resolved by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and immunoblotted with anti-phospho[Ser⁴⁷³] Akt antibody. In all panels, the upper blots were obtained by immunoblotting nitrocellulose transfers of 0.2 mg total protein extracts, separated by SDS-PAGE, with anti-insulin receptor (a, b) or anti-Akt (c, d) antibodies. In all panels, the lower blots were obtained by reprobating the original nitrocellulose transfers used for IR and Akt assessment (upper blots) with anti-actin (a, c) and anti-vimentin (b, d) antibodies. Respective bands were quantified by digital densitometry. For all experiments the results are presented as means $\pm$ SEM of $n=4$, * $p<0.05$ vs. C+

HNF-4 α levels and restoration of AMPK [Thr¹⁷²]-phosphorylation and ACC [Ser⁷⁹]-phosphorylation to levels similar to those observed in SW/Uni/C mice (Fig. 6d). Finally, in PGC-1 α /AS-treated mice, FAS and PPAR γ protein levels dropped to levels below those seen in SW/Uni/C mice (Fig. 6d).

Discussion

PGC-1 α was first identified as a coactivator of nuclear receptors that participate in the control of thermogenesis, responding directly to environmental thermal oscillations [5]. In recent years, questions have been raised about



the possible roles played by this protein in tissues not traditionally involved in thermogenesis. Some of these studies have provided important clues regarding a multifaceted and multi-organic role for PGC-1 α in the control of

glucose homeostasis [24]. In this context, PGC-1 α was shown to participate in the regulation of hepatic gluconeogenesis [8], in the connection of neural stimuli and beta cell insulin production [16], in the control of muscle glucose

◀ **Fig. 6** Effects of PGC-1 α expression inhibition on histological and metabolic parameters of the liver. **a** Haematoxylin staining of 5.0- μ m sections of livers obtained from SW/Uni mice fed a fat-rich diet and treated with vehicle (control) or sense or antisense oligonucleotide to PGC-1 α for 16 days. Liver content of total lipids (**b**) and serum levels of triglycerides (**c**) were measured in SW/Uni mice fed a fat-rich diet and treated for 16 days with sense (S) or antisense (AS) oligonucleotide to PGC-1 α or with vehicle (C). **d** The protein amounts of PGC-1 α , HNF-4 α , CPT-1, FAS and PPAR γ , the [Thr¹⁷²]-phosphorylation of AMPK, and the [Ser⁷⁹]-phosphorylation of ACC were measured in the livers of SW/Uni mice fed a control (SW/Uni/C) or fat-rich diet, and treated (SW/Uni/F+PGC-1 α /AS) or not (SW/Uni/F) with the PGC-1 α AS oligonucleotide by immunoblot (IB) of nitrocellulose membranes containing the transfers of liver total protein extracts resolved by SDS-PAGE. **a** The figures are representative of four different experiments. **b–d** Results are presented as mean $\pm$ SEM for $n=6$ (**b**, **c**) and $n=4$ (**d**); * $p<0.05$ vs. C

uptake [18] and in the modulation of adipose tissue insulin signalling [25].

As a participant of the transcriptional control of several programs related to glucose metabolism and energy mobilisation, PGC-1 α has become an interesting potential target for therapeutics in diabetes, obesity and related diseases. Therefore, we decided to employ a PGC-1 α antisense oligonucleotide to study the effects of the inhibition of whole-body PGC-1 α expression on some clinical parameters of diet-induced diabetes. Previous studies have demonstrated that the AKR-related [23] SW/Uni mouse strain develops diabetes, hyperinsulinaemia and obesity when fed a fat-rich diet (M. J. Saad, unpublished data). In the first part of the study, we confirmed the predisposition of SW/Uni mice to diabetes and showed that this is not a common feature of all strains related to AKR mice, since CBA/Uni mice developed obesity and hyperinsulinaemia but not diabetes. It is interesting to note that, like in many humans, the mice strains evaluated here depend on a combination of environmental and genetic factors to present the complete obesity and diabetes phenotype [26]. Thus, they become attractive models to study these complex diseases [27].

We next evaluated the effects of a fat-rich diet on the expression of PGC-1 α in the liver and adipose tissue of the two mice strains. At 4 weeks of age, the levels of PGC-1 α are very low in both tissues of both strains. However, ageing as well as consumption of a fat-rich diet promoted significant increases in PGC-1 α expression in the liver and adipose tissue. Moreover, the magnitude of the increases in PGC-1 α expression owing to ageing and diet seemed to be more pronounced in the SW/Uni mice than in the CBA/Uni strain.

By treating the SW/Uni/F mice with a single daily dose of 1.0 nmol PGC-1 α /AS, we obtained an almost complete inhibition of PGC-1 α expression in the liver and adipose tissue. The effectiveness of this antisense oligonucleotide was surprising, and even a dose as low as 0.5 nmol/day was capable of significantly reducing the expression of the target protein. As a result, we observed a complete remission of hyperglycaemia after 16 days. This effect was a consequence of increased insulin production and improved peripheral insulin action as assessed by functional tests and the evaluation of important steps of the insulin

signalling pathway. Interestingly, the inhibition of PGC-1 α expression was accompanied not only by improved signal transduction through IR and Akt, but also by an increased expression of IR and Akt in the liver and of IR in adipose tissue. Thus, the inhibition of PGC-1 α exerts a coordinated effect to amplify insulin signalling, acting simultaneously upon protein expression and functional activation. However, at this time, we cannot be sure whether the effect of PGC-1 α inhibition on IR and Akt expression occurs at transcriptional levels, at translational levels, or perhaps at both levels.

The ability of PGC-1 α to inhibit insulin secretion by pancreatic islets has been previously shown [16, 28]. Sympathetic tonus generated by the exposure of experimental animals to a cold environment, or a direct stimulus of isolated pancreatic islets with the adrenergic agonist clonidine, increases PGC-1 α expression in islets and reduces glucose-stimulated insulin secretion. Inhibition of PGC-1 α expression partially restores the capacity of beta cells to secrete insulin [16]. Furthermore, adenoviral induction of PGC-1 α in pancreatic islets reduces insulin secretion [28]. Finally, in several animal models of diabetes, the expression of PGC-1 α is increased, coinciding with the suppression of proteins involved in beta cell metabolism and production of ATP [16, 28]. Therefore, we were not surprised that the inhibition of PGC-1 α in the animal model presented here produced an increase in insulin secretion.

Conversely, the effect of PGC-1 α suppression upon whole-body insulin action was unexpected. Using three distinct methods, ITT, euglycaemic-hyperinsulinaemic clamp and evaluation of insulin-induced molecular activation of IR and Akt in fat and the liver, we observed an improvement in insulin function in SW/Uni/F mice treated with PGC-1 α /AS. Few studies have evaluated the role of PGC-1 α in WAT, and the data available indicate that its expression in this tissue activates a transcriptional program that induces mitochondria biogenesis and promotes a phenotypical and functional shift towards brown adipocyte [29]. Moreover, some studies have suggested a correlation between the level of expression of PGC-1 α in WAT and insulin action [25, 30]. However, no study has evaluated whether PGC-1 α expression in WAT plays a mechanistic role or is a consequence of insulin resistance. In this context, Coulter and coworkers [31] have shown that the consumption of dietary fat, which leads to insulin resistance, imposes a regulation upon PGC-1 α expression that is different in brown and white adipose tissue.

In contrast to the limited information available regarding the roles for PGC-1 α in WAT, enormous progress in the characterisation of PGC-1 α functions in the liver has occurred in recent years. In this tissue, induction of PGC-1 α participates in the late regulation of gluconeogenesis during prolonged fasting [9, 32]. It does so by acting as a coactivator of transcriptional factors that induce the expression of gluconeogenic proteins such as phosphoenolpyruvate carboxylase and G6Pase [8, 9]. To exert this function, PGC-1 α depends on the expression of HNF-4 α [9]; in the absence of HNF-4 α PGC-1 α may participate in the control of the expression of other genes, but not of

gluconeogenic genes [9, 32]. In parallel to its involvement in gluconeogenic pathways, PGC-1 α also plays an important role in the complex mechanisms that coordinate lipid storage and oxidation in the liver [33]. During fasting, in parallel to the increased expression of PGC-1 α the transcription factor CREB is induced in response to cortisol and glucagon [33]. The induction of CREB imposes a negative regulation upon the expression of PPAR γ which results in increased lipid oxidation and reduced lipogenesis [33]. In the present study, we demonstrate that with a fat-rich diet, the hepatic expression of lipogenic genes is significantly increased while the expression of HNF-4 α is inhibited. When PGC-1 α expression is blunted, a rapid reversal of the macroscopic and microscopic features of steatosis is achieved and this is accompanied by a reduction in the expression of genes involved in lipogenesis. In contrast, the expression of HNF-4 α is restored. Of particular interest is the finding that inhibition of PGC-1 α leads to a remarkable reduction of FAS expression. In this context, in a recent study, Oberkofler and colleagues showed that PGC-1 α induces the expression of the sterol-regulatory-element binding protein-1c and, through this mechanism, regulates the expression of FAS and ACC [34].

Although we did not measure the hepatic production of glucose, we show that the molecular activation of Akt is reduced, and several studies have demonstrated the association of steatosis and hepatic insulin resistance [35, 36]. In a recent study, PGC-1 α was shown to induce hepatic insulin resistance through PPAR α , a protein known to be hyperexpressed in diet-induced steatotic livers [6, 37]. Therefore, the consumption of a high-fat diet stimulates liver lipogenesis and induces insulin resistance in association with increased PGC-1 α expression. Inhibition of PGC-1 α expression reduces lipogenesis while ameliorating molecular parameters of insulin action. The net result is the reversal of diet-induced diabetes and improvement of histological steatosis, but with increased levels of blood triglycerides.

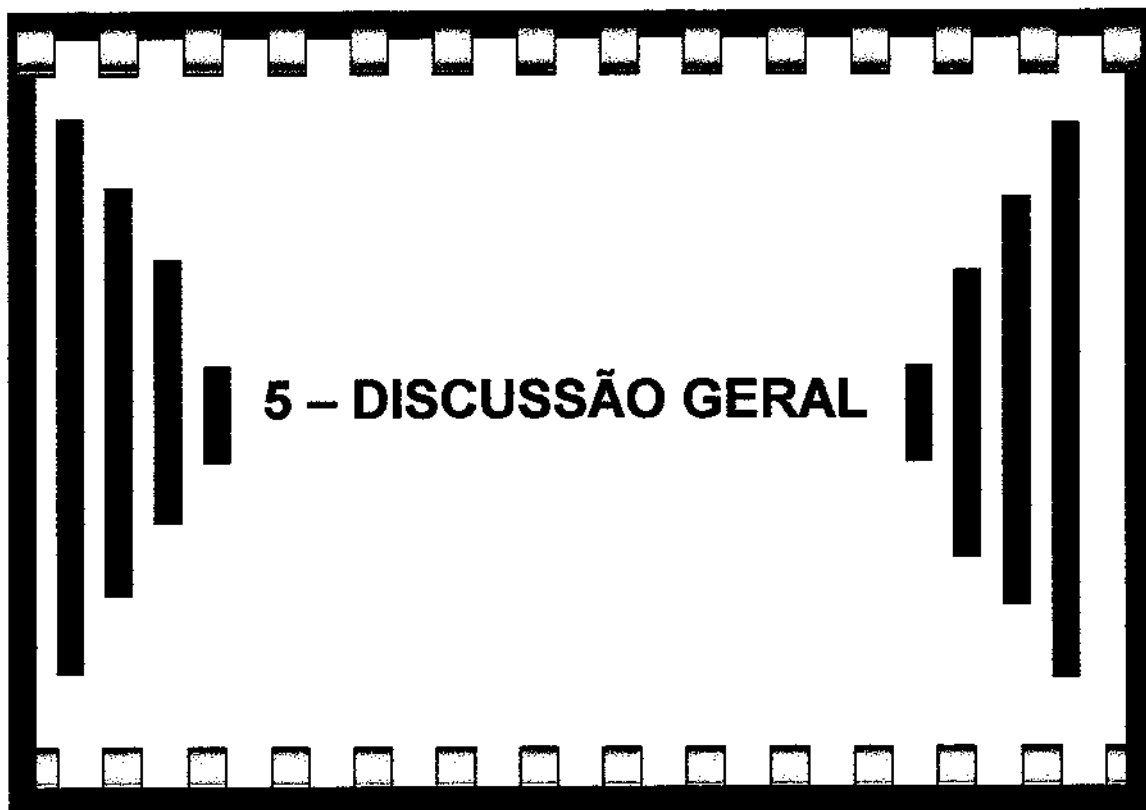
In conclusion, the present study demonstrates that in contrast to previous ideas, not only hepatic, but, at least in certain clinical conditions, whole-body PGC-1 α may be an attractive target for therapeutics in diabetes and related diseases.

Acknowledgements These studies were supported by grants from The State of São Paulo Research Foundation (FAPESP) and the national research commission Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq). We are indebted to Dr N. Conran for English grammar editing.

References

- Goldstein BJ (2003) Insulin resistance: from benign to type 2 diabetes mellitus. *Rev Cardiovasc Med* 4(Suppl 6):S3-S10
- Zimmet P, Alberti KG, Shaw J (2001) Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414:782-787
- Flier JS (2004) Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell* 116:337-350
- Moller DE (2001) New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Nature* 414:821-827
- 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
- Koo SH, Satoh H, Herzig S et al (2004) PGC-1 promotes insulin resistance in liver through PPAR- α -dependent induction of TRB-3. *Nat Med* 10:530-534
- Wu Z, Puigserver P, Andersson U et al (1999) Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 98:115-124
- Herzig S, Long F, Jhala US et al (2001) CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature* 413:179-183
- Yoon JC, Puigserver P, Chen G et al (2001) Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature* 413:131-138
- Yamamoto T, Shimano H, Nakagawa Y et al (2004) SREBP-1 interacts with hepatocyte nuclear factor-4 α and interferes with PGC-1 recruitment to suppress hepatic gluconeogenic genes. *J Biol Chem* 279:12027-12035
- Puigserver P, Rhee J, Donovan J et al (2003) Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1 α interaction. *Nature* 423:550-555
- Chang E, Bartholomew G, Pimental R et al (1999) Direct binding and in vivo regulation of the fission yeast p21-activated kinase shk1 by the SH3 domain protein scd2. *Mol Cell Biol* 19:8066-8074
- Michael LF, Wu Z, Cheatham RB et al (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* 98:3820-3825
- Ek J, Andersen G, Urhammer SA et al (2001) Mutation analysis of peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 (PGC-1) and relationships of identified amino acid polymorphisms to Type II diabetes mellitus. *Diabetologia* 44:2220-2226
- Hara K, Tobe K, Okada T et al (2002) A genetic variation in the PGC-1 gene could confer insulin resistance and susceptibility to Type II diabetes. *Diabetologia* 45:740-743
- De Souza CT, Gasparetti AL, Pereira-da-Silva M et al (2003) Peroxisome proliferator-activated receptor γ 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
- Porte D Jr, Kahn SE (2001) beta-cell dysfunction and failure in type 2 diabetes: potential mechanisms. *Diabetes* 50(Suppl 1):S160-S163
- Oliveira RL, Ueno M, de Souza CT et al (2004) Cold-induced PGC-1 α expression modulates muscle glucose uptake through an insulin receptor/Akt-independent, AMPK-dependent pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287:E686-E695
- Scott AM, Atwater I, Rojas E (1981) A method for the simultaneous measurement of insulin release and B cell membrane potential in single mouse islets of Langerhans. *Diabetologia* 21:470-475
- Trinder P (1969) Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. *J Clin Pathol* 22:158-161
- Bonora E, Manicardi V, Zavaroni I, Coscelli C, Butturini U (1987) Relationships between insulin secretion, insulin metabolism and insulin resistance in mild glucose intolerance. *Diabetes Metab* 13:116-121
- Gasparetti AL, de Souza CT, Pereira-da-Silva M et al (2003) Cold exposure induces tissue-specific modulation of the insulin-signalling pathway in *Rattus norvegicus*. *J Physiol* 552:149-162
- Rossmeisl M, Rim JS, Koza RA, Kozak LP (2003) Variation in type 2 diabetes-related traits in mouse strains susceptible to diet-induced obesity. *Diabetes* 52:1958-1966
- Puigserver P, Spiegelman BM (2003) Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α (PGC-1 α): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev* 24:78-90

25. Hammarstedt A, Jansson PA, Wesslau C, Yang X, Smith U (2003) Reduced expression of PGC-1 and insulin-signaling molecules in adipose tissue is associated with insulin resistance. *Biochem Biophys Res Commun* 301:578–582
26. Speakman JR (2004) Obesity: the integrated roles of environment and genetics. *J Nutr* 134:2090S–2105S
27. Ktorza A, Bernard C, Parent V et al (1997) Are animal models of diabetes relevant to the study of the genetics of non-insulin-dependent diabetes in humans? *Diabetes Metab* 23(Suppl 2): 38–46
28. Yoon JC, Xu G, Deeney JT et al (2003) Suppression of beta cell energy metabolism and insulin release by PGC-1alpha. *Dev Cell* 5:73–83
29. Tiraby C, Tavernier G, Lefort C et al (2003) Acquirement of brown fat cell features by human white adipocytes. *J Biol Chem* 278:33370–33376
30. Yang X, Enerback S, Smith U (2003) Reduced expression of FOXC2 and brown adipogenic genes in human subjects with insulin resistance. *Obes Res* 11:1182–1191
31. Coulter AA, Bearden CM, Liu X, Koza RA, Kozak LP (2003) Dietary fat interacts with QTLs controlling induction of Pgc-1 alpha and Ucp1 during conversion of white to brown fat. *Physiol Genomics* 14:139–147
32. Rhee J, Inoue Y, Yoon JC et al (2003) Regulation of hepatic fasting response by PPARgamma coactivator-1alpha (PGC-1): requirement for hepatocyte nuclear factor 4alpha in gluconeogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4012–4017
33. Herzig S, Hedrick S, Morante I, Koo SH, Galimi F, Montminy M (2003) CREB controls hepatic lipid metabolism through nuclear hormone receptor PPAR-gamma. *Nature* 426:190–193
34. Oberkofler H, Schraml E, Krempler F, Patsch W (2004) Restoration of *sterol-regulatory-element-binding protein-1c* gene expression in HepG2 cells by peroxisome-proliferator-activated receptor-gamma co-activator-1alpha. *Biochem J* 381: 357–363
35. Gupta G, Cases JA, She L et al (2000) Ability of insulin to modulate hepatic glucose production in aging rats is impaired by fat accumulation. *Am J Physiol Endocrinol Metabol* 278: E985–E991
36. Browning JD, Horton JD (2004) Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest* 114:147–152
37. Gavrilova O, Haluzik M, Matsusue K et al (2003) Liver peroxisome proliferator-activated receptor gamma contributes to hepatic steatosis, triglyceride clearance, and regulation of body fat mass. *J Biol Chem* 278:34268–34276



Diabetes mellitus é uma doença crônica e progressiva que associada a condições como hipertensão, aterosclerose, obesidade e outras, é responsável por elevados índices de mortalidade em várias regiões do planeta (ZIMMET et al., 2001). Indivíduos com diabetes mellitus tipo 2 têm um fenótipo complexo que inclui, em graus variáveis, defeitos na secreção de insulina, elevada produção hepática de glicose e resistência à ação da insulina. Todos esses fatores contribuem para o surgimento da hiperglicemia. Entretanto, os mecanismos precisos através dos quais estes três fatores interagem e levam ao desenvolvimento do diabetes são desconhecidos. De uma forma geral, existem evidências de que na maior parte dos pacientes ocorre falência da célula beta pancreática em suprir a demanda periférica por insulina (MARTIN et al., 1992; WIESLI et al., 2004; DeFRONZO, 2004). Assim defeitos de secreção de insulina parecem desempenhar um papel central na fisiopatologia desta doença.

Com base nos conceitos expostos acima e, visando avaliar os mecanismos moleculares envolvidos na função da célula beta em uma situação onde há reduzida secreção de insulina, utilizou-se na primeira parte da presente tese o modelo de exposição ao frio. A exposição de animais homeotérmicos ao frio constitui situação fisiológica única, caracterizada por baixa secreção de insulina e acompanhada por aumento na mobilização de glicose, melhora na resposta biológica à ação da insulina (GASPARETTI et al., 2003) e aumento na captação muscular de glicose por mecanismos dependente e independente da insulina (OLIVEIRA et al., 2004).

De forma similar a estudos pregressos (BING et al., 1998), foi observado no presente modelo, aumento na ingestão alimentar acompanhado de perda inicial na massa corporal e menor ganho de massa pelos animais expostos ao frio, o que pode estar

relacionado a um aumento na termogênese pois, embora tenha havido breve e discreta queda na temperatura corporal desses animais, a mesma retornou à normalidade e manteve-se estável até o fim do período experimental. Por outro lado, a manutenção de baixas concentrações de insulina ao longo do período de exposição ao frio não foi acompanhada por hiperglicemia ou redução dos níveis circulantes de AGL conforme verificado em outro estudo (HOO-PARIS et al., 1988). Isto pode ser explicado pelo fato desses autores terem utilizado diferente protocolo experimental de hipotermia, o mesmo não acontecendo no atual trabalho onde a temperatura corporal dos animais expostos ao frio manteve-se estável.

Embora a exposição ao frio seja utilizada em alguns estudos como modelo experimental de estresse, a ausência de alterações nos níveis circulantes de TSH e corticosterona observada no presente trabalho exclui a possibilidade dos demais resultados refletirem respostas a condição de estresse. Por outro lado, glicocorticóides estão associados à redução na termogênese e atividade do tecido adiposo marrom, provavelmente por estimular diretamente a expressão de neuropeptídeo Y no núcleo arqueado (STRACK et al., 1995). Portanto, é provável que a não elevação nos níveis de corticosterona seja um dos fatores necessários para que haja aumento da termogênese e conseqüente sobrevivência frente à exposição prolongada ao frio. Adicionalmente, animais expostos ao frio apresentam maior mobilização da gordura corporal evidenciada pelo menor percentual de massa gorda associada ao aumento na massa magra e elevação nos níveis hepáticos de glicogênio (PEREIRA-DA-SILVA et al., 2003).

No presente estudo, a exposição de ratos ao frio foi utilizada como modelo para que, num primeiro momento se avaliasse o papel do estímulo neural sobre a secreção de insulina, e num segundo momento investigar se o aumento no tônus adrenérgico modularia

proteínas envolvidas na função da célula beta.

O controle fino da secreção de insulina desempenha papel fundamental nos mecanismos que visam evitar mudanças drásticas da concentração da glicose sanguínea. Os nutrientes, hormônios e estímulos neurais são os principais participantes deste complexo e integrado sistema (NEWGARD, 2002). Estudo prévio (PORTE e WILLIAMS, 1966), verificou que estímulos adrenérgicos em ilhotas pancreáticas são capazes de produzir efeito inibitório sobre a secreção de insulina. No presente estudo, o grupo exposto ao frio apresentou menor secreção de insulina tanto basal quanto estimulada por glicose. Por outro lado, a simpatectomia restaurou parcialmente a secreção de insulina estimulada por glicose.

Durante as últimas três décadas vários estudos têm proporcionado fortes evidências de que a noradrenalina, agindo através de receptores α_2 -adrenérgicos expressos em células beta, induz reduzida formação de AMP cíclico (NAKAKI et al., 1981) e subsequente inibição de componentes distais da exocitose (SHARP, 1996). Mais recentemente, PETERHOFF et al. (2003) utilizando camundongos *knockout* do receptor α_2 -adrenérgico verificaram maior secreção de insulina induzida por glicose, porém, não observaram diferença na concentração de 2,8 mM, resultado também encontrado no presente estudo. Tal fato deve decorrer da conhecida capacidade do AMP cíclico em potencializar a secreção de insulina a qual é observada em altas concentrações de glicose, porém, ausente em baixas concentrações, mesmo na presença de agonistas como o glucagon e forskolina (HEDESKOV, 1980; MALAISSE e MALAISSE-LAGAE, 1984; HENQUIN e MEISSNER, 1984; MALAISSE et al., 1984; SHARP, 1979; ULRICH e WOLLHEIN, 1984).

Em animais expostos ao frio ocorrem vários ajustes ao nível celular, um dos mais importantes é a alteração da biogênese mitocondrial e a expressão dos genes que controlam a razão da oxidação dos combustíveis e síntese de ATP nessas organelas (WU et al., 1999). Neste sentido, num segundo momento, avaliou-se a participação das proteínas desacopladoras mitocondriais no processo de secreção de insulina em animais expostos ao frio. Pôde-se verificar através de imunoblot e imunohistoquímica que animais expostos ao frio apresentam aumento na expressão da UCP-2 e que a desnervação reduziu a expressão dessa proteína, revertendo parcialmente a inibição da secreção de insulina.

As UCPs participam dos mecanismos de regulação do aproveitamento energético em células, promovendo o desacoplamento entre a cadeia mitocondrial de elétrons e a produção de ATP. A secreção de insulina depende primariamente do ATP no acoplamento metabolismo-secreção e é estimado que 90% da produção de ATP na célula beta seja proveniente do processo oxidativo na mitocôndria (ERECINSKA et al., 1992). No trabalho atual, apesar de não terem sido quantificados os níveis de ATP, a secreção reduzida de insulina em animais expostos ao frio foi revertida após o uso de oligonucleotídeo antisense anti-UCP-2, o que demonstra a importância dessa proteína em controlar a relação ATP/ADP.

Com o *knockout* de UCP-2, surgiu um modelo para que se determinasse diretamente o papel dessa proteína na secreção de insulina. Em cultura de ilhotas isoladas ocorre aumento na responsividade à glicose, caracterizada por desvio da curva concentração-resposta para a esquerda (JOSEPH et al., 2002). Camundongos *knockout* apresentam um aumento na razão insulina/glicose *in vivo*. Além disso, camundongos heterozigotos para o gene UCP-2 desenvolveram padrão secretório intermediário entre o tipo selvagem e o

knockout (ZHANG et al., 2001). Porém, estes autores utilizaram como base para a mutação, camundongos deficientes de leptina (ob/ob), sendo fato conhecido que a exposição de ilhotas pancreáticas à leptina inibe a expressão da UCP-2 (BROWN et al., 2002). Desse modo, em camundongo ob/ob, a ausência de leptina pode ser um dos fatores responsáveis pelo aumento na expressão da UCP-2. Os efeitos modulatórios da glicose, leptina e ácidos graxos (ZHOU et al., 1997; YAMASHITA et al., 1999; VILLARROYA et al., 2001; LAMELOISE et al., 2001; BROWN et al., 2002; LI et al., 2002) foram minimizados uma vez que tais parâmetros foram modulados de forma limítrofe pela exposição ao frio. Assim, no presente estudo, o componente neural assumiu papel central no controle dos parâmetros avaliados. Em adição, vários estudos proporcionaram evidências diretas de que a UCP-2 é capaz de regular negativamente a secreção de insulina por catalisar a evasão do gradiente eletro-químico na mitocôndria da célula beta, levando a redução dos níveis de ATP gerado nesta organela (CHAN et al., 1999; CHAN et al., 2001; HONG et al., 2001; ZHANG et al., 2001; NAKAZAKI et al., 2002). No entanto, nesses estudos, os mecanismos moleculares que levam ao aumento da expressão da UCP-2, não foram identificados.

A biogênese da mitocôndria é um fenômeno dependente da participação de um grande número de proteínas, das quais a maioria é codificada pelo genoma nuclear, mas seu controle não é totalmente conhecido. A identificação da PGC-1 α , uma proteína coativadora transcricional, despertou grande interesse na área. Em órgãos termogenicamente ativos, tal como o tecido adiposo marrom, a exposição ao frio promove a expressão da PGC-1 α devido a um aumento do tônus simpático via receptores β -3 adrenérgicos e AMP cíclico (BOSS et al., 1999). A indução de PGC-1 α significativamente aumenta a atividade transcricional do PPAR γ , receptor do hormônio tireoidiano e AMP cíclico no promotor da

UCP-1 (WU et al., 1999). O presente estudo demonstrou, simultaneamente a outro (YOON et al., 2003), que a PGC-1 α está expressa em ilhotas pancreáticas. A exposição de ratos ao frio induz ao aumento na expressão da PGC-1 α , enquanto que a simpatectomia reverte tal efeito. Em adição, tratamento *in vivo* de ratos simpatectomizados expostos ao frio com um agonista α 2-adrenérgico (clonidina) induz expressão de tal proteína, mostrando que o estímulo simpático é responsável por controlar a expressão da PGC-1 α nesse modelo. Em adição, ao incubar ilhotas pancreáticas de ratos expostos ao frio com oligonucleotídeo antisense anti-PGC-1 α , houve significativo bloqueio de tal proteína, o que foi acompanhado por inibição da proteína UCP-2 e conseqüente reversão parcial da secreção reduzida de insulina. Isso demonstra a estreita associação entre PGC-1 α e UCP-2 em ilhotas de ratos.

Por fim, a inibição da expressão da PGC-1 α reverte tanto a superexpressão da UCP-2, quanto defeitos na secreção de insulina induzidos pelo frio. De fato, nossos resultados mostram que o bloqueio parcial da expressão da PGC-1 α ou UCP-2 resulta em aumento tanto na secreção de insulina basal quanto estimulada por glicose. Isso demonstra a importância dessas duas proteínas sobre a secreção de insulina e abre oportunidade para considerações quanto às funções dessas em diabetes mellitus. Sendo assim, na segunda parte da presente tese investigou-se a expressão da PGC-1 α em modelo experimental de diabetes mellitus tipo 2 e avaliou-se o papel da inibição de tal proteína sobre os parâmetros clínicos nesse modelo.

Até o momento, existem evidências que sugerem ser a PGC-1 α um co-fator transcricional chave na modulação da secreção da insulina. No entanto, em anos recentes,

questões foram levantadas sobre os possíveis papéis desta proteína em outros tecidos. Um desses estudos encontrou resultados importantes, mostrando que a PGC-1 α está presente em vários tecidos e tem muitas e diferentes funções, inclusive no controle da homeostase da glicose (para revisão PUIGSERVER e SPIEGELMAN, 2003). Neste contexto, a PGC-1 α está envolvida na regulação da gliconeogênese hepática (YOON et al., 2001; HERZIG et al., 2001) captação de glicose pelo músculo (MICHAEL et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2003), na modulação da ação da insulina no tecido adiposo branco (HAMMARSTEDT et al., 2003) e controle da secreção de insulina pela célula beta pancreática (YOON et al., 2003 e o presente estudo).

A PGC-1 α passou a ser um alvo terapêutico potencial no diabetes, obesidade e doenças relacionadas, uma vez que esta participa do controle transcricional de vários programas relacionados ao metabolismo da glicose e mobilização energética; dessa forma, a inibição da expressão dessa proteína poderia ser de interesse terapêutico. Para isso, utilizou a técnica do oligonucleotídeo antisense para modular a expressão da PGC-1 α *in vivo*. Essa técnica tem sido usada e demonstrou ser eficiente em vários estudos (SHAN et al., 2003; SLOOP et al., 2004; AMARAL et al., 2004; ARAUJO et al., 2005).

Inicialmente, confirmou-se a predisposição de camundongos Swiss ao desenvolvimento de diabetes. Segundo relatos do nosso laboratório (M.J. SAAD, dados não publicados) esses animais quando alimentados com dieta hiperlipídica desenvolvem obesidade, hiperinsulinemia, e diabetes. Enquanto que a linhagem controle (CBA) desenvolve obesidade, hiperinsulinemia, mas não diabetes mellitus. Isto é interessante, pois, assim como em humanos, as linhagens de camundongos avaliadas aqui dependem de uma combinação de fatores genéticos e ambientais para desenvolverem, ou não, o fenótipo

(SPEAKMAN, 2004). Desse modo, estabeleceu-se um modelo atrativo para os estudos desta complexa doença.

Em seguida, avaliou-se o efeito da dieta rica em lipídeos sobre a expressão da PGC-1 α em fígado e tecido adiposo de ambas linhagens. À três semanas de idade, os níveis de PGC-1 α são baixos em ambos tecidos de ambas linhagens avaliadas. Entretanto, após oito semanas de tratamento com dieta hiperlipídica, verificou-se que tanto a idade quanto o consumo de dieta promoveram aumento significativo na expressão de PGC-1 α no fígado e no tecido adiposo, porém, em maiores proporções nos camundongos Swiss. YOON et al. (2001) e HERZIG et al. (2001), verificaram, recentemente, que fígados de animais diabéticos e obesos apresentam maiores expressões de PGC-1 α comparados aos controles.

Através do tratamento de camundongos Swiss com uma dose diária de 1,0 nmol de antisense PGC-1 α , obteve-se uma quase completa inibição da expressão da PGC-1 α no fígado e no tecido adiposo, e após dezesseis dias observou completa reversão da hiperglicemia. Este efeito foi consequência de aumento moderado na produção de insulina, pois camundongos tratados com oligonucleotídeo antisense apresentaram maiores níveis de insulina basal ou estimulada por glicose e uma melhora na ação periférica da insulina, comprovado por aumento no desaparecimento da glicose sérica durante o ITT e aumento no consumo de glicose durante o clamp hiperinsulinêmico-euglicêmico. A melhora na ação da insulina em tecidos alvos foi posteriormente confirmada por aumento na fosforilação da AKT e fosforilação em tirosina do IR induzida por insulina, tanto no fígado quanto no tecido adiposo de camundongos tratados com antisense. É de interesse que a inibição da PGC-1 α foi acompanhada por um aumento na expressão da AKT no tecido adiposo, o qual, em base estoiquiométrica, pode mostrar que o efeito da inibição da PGC-1 α neste tecido

leva ao aumento na expressão e também na ativação funcional da AKT. De forma diferente, no fígado, nenhuma modulação da expressão da AKT pode ser observada, revelando que a inibição da PGC-1 α nesse tecido alterou apenas a ativação funcional dessa proteína. A partir da técnica de RNA interferência, KOO et al. (2004) observaram que um inibidor natural da AKT (TRB-3) é dependente da PGC-1 α . Isso demonstra que a PGC-1 α pode exercer papel direto sobre a fosforilação da proteína AKT, o que justificaria os achados do presente estudo, ou seja, inibição da PGC-1 α , inibe por sua vez a TRB-3, com conseqüente aumento da fosforilação da AKT. Porém, os mecanismos que levam ao aumento da expressão da AKT no tecido adiposo não são claros. Em adição, o aumento na fosforilação do receptor de insulina parece ser, pelo menos em parte, resultado da reversão do perfil lipídico do fígado.

Como a habilidade da PGC-1 α em inibir a secreção de insulina em ilhotas isoladas fora demonstrado na primeira parte da presente tese, não houve surpresa no fato da inibição da PGC-1 α corporal total promover aumento na secreção de insulina. Por outro lado, o efeito da inibição da PGC-1 α sobre a ação da insulina foi inesperado. Através de três métodos distintos (ITT, clamp hiperinsulinêmico-euglicêmico e avaliação da ativação molecular do IR e AKT estimulado por insulina no fígado e tecido adiposo) observou-se que o antisense PGC-1 α melhora a função da insulina. Como descrito acima, a PGC-1 α foi inicialmente identificada em tecido adiposo marrom e muitos dados demonstram que sua indução ativa programas que adaptam a célula à resposta do estímulo ambiental (PUIGSERVER et al., 1998). No entanto, a expressão da PGC-1 α em tecido adiposo branco é menos estudada, mas alguns dados indicam que sua expressão nesse tecido ativa um programa transcricional que induz biogênese mitocondrial e promove, nesse tecido,

função de tecido adiposo marrom (TIRABY et al., 2003). Finalmente, poucos estudos abordando os efeitos da PGC-1 α sobre a ação da insulina em tecido adiposo branco estão disponíveis. De acordo com esses trabalhos, há correlação direta entre a expressão da PGC-1 α e a ação da insulina (HAMMARSTEDT et al., 2003; YANG et al., 2003). Entretanto, nenhum destes estudos avaliou se a expressão da PGC-1 α no tecido adiposo branco desempenha função primária ou se esta é consequência da resistência à insulina. Neste contexto, COULTER et al. (2003) mostraram que o consumo de dieta hiperlipídica, a qual leva a resistência à insulina, promove regulação da expressão da PGC-1 α diferente em tecido adiposo branco e em marrom. Sendo assim, suspeita-se que a elevada expressão da PGC-1 α em tecido adiposo branco atende à demanda lipogênica e ocorre em paralelo com a instalação da resistência à insulina.

Em contraste com a informação limitada a respeito do papel da PGC-1 α no tecido adiposo branco, em anos recentes houve progresso na caracterização da função da PGC-1 α no fígado. Neste tecido, a indução da PGC-1 α participa na regulação tardia da gliconeogênese durante jejum prolongado (YOON et al., 2001; RHEE et al., 2003). Esta co-ativa fatores transcripcionais que induzem a expressão de proteínas gliconeogênicas; tais como a fosfoenolpiruvato quinase e a glicose 6-fosfatase (HERZIG et al., 2001; YOON et al., 2001). Para exercer esta função, a PGC-1 α depende da associação com o fator nuclear de hepatócito-4 α (HNF-4 α); na ausência do HNF-4 α , a PGC-1 α pode participar no controle da expressão de outros genes, mas não de genes gliconeogênicos (YOON et al., 2001; RHEE et al., 2003). Em adição, foi recentemente observado que a FOXO-1 (fator de transcrição da família das *forkhead*) interage com a PGC-1 α para regular a gliconeogênese e que esse processo é dependente da via de sinalização da insulina (PUIGSERVER et al.,

2003). Estes autores verificaram que, mediante inibição da FOXO-1, a PGC-1 α falha em ativar a transcrição de genes gliconeogênicos mesmo com altas doses de insulina.

Em paralelo ao seu envolvimento na via gliconeogênica, a PGC-1 α também desempenha função importante no mecanismo complexo que coordena estoque e oxidação de lipídeos no fígado (HERZIG et al., 2003). Durante o jejum, em paralelo ao aumento na expressão da PGC-1 α , o fator de transcrição CREB é induzido em resposta ao cortisol e glucagon (HERZIG et al., 2003). A indução de CREB impõe regulação negativa sobre a expressão do PPAR γ o que resulta em aumento na oxidação de lipídeos e reduzida lipogênese (HERZIG et al., 2003; GRAVILOVA et al., 2003; KOO et al., 2004). Nosso estudo demonstra, que sob dieta hiperlipídica, a expressão hepática de genes lipogênicos está aumentada significativamente, inclusive a expressão da PPAR γ . Quando a expressão da PGC-1 α é inibida, ocorre uma rápida reversão da esteatose hepática e isto é acompanhado por redução significativa da PPAR γ . De interesse especial é o achado que a inibição da PGC-1 α leva a redução marcante da expressão da enzima ácido graxo sintase (FAS). A FAS tem sua transcrição gênica regulada pela proteína ligadora -1c do elemento regulador de esterol (SREBP-1c). De fato, em estudo recente, OBERKOFER et al. (2004) demonstraram que a PGC-1 α induz a expressão da SREBP-1c e através desse mecanismo regula a expressão da FAS.

Outra enzima lipogênica que também é controlada transcricionalmente pela SREBP-1c é a acetil-CoA carboxilase (ACC). Redução na atividade da ACC leva ao aumento no conteúdo de malonil-CoA, este substrato por sua vez ativa alostericamente a atividade da carnitina palmitoil transferase -1 (CPT-1), o que resulta em oxidação mitocondrial aumentada (NICOT et al., 2004; KERNER et al., 2004). No presente estudo, animais

submetidos a dieta hiperlipídica apresentaram reduzida atividade da ACC e aumento na CPT-1. Em adição, os animais tratados com dieta hiperlipídica apresentam aumento na fosforilação da AMPK [Thr¹⁷²], possivelmente, induzida por altos níveis de leptina (STEINBERG et al., 2004) no modelo de obesidade apresentado. Em acréscimo, estudos têm demonstrado que a AMPK pode inibir a atividade da ACC (KUDO et al., 1996; KRAUSE et al., 2002). Sendo assim, tanto a SREBP-1c quanto AMPK podem ser os moduladores responsáveis por reduzir a atividade da ACC e conseqüentemente aumentar CPT-1 no modelo atual. Segundo LOUET et al. (2002) a PGC-1 α ativa diretamente o promotor da CPT-1.

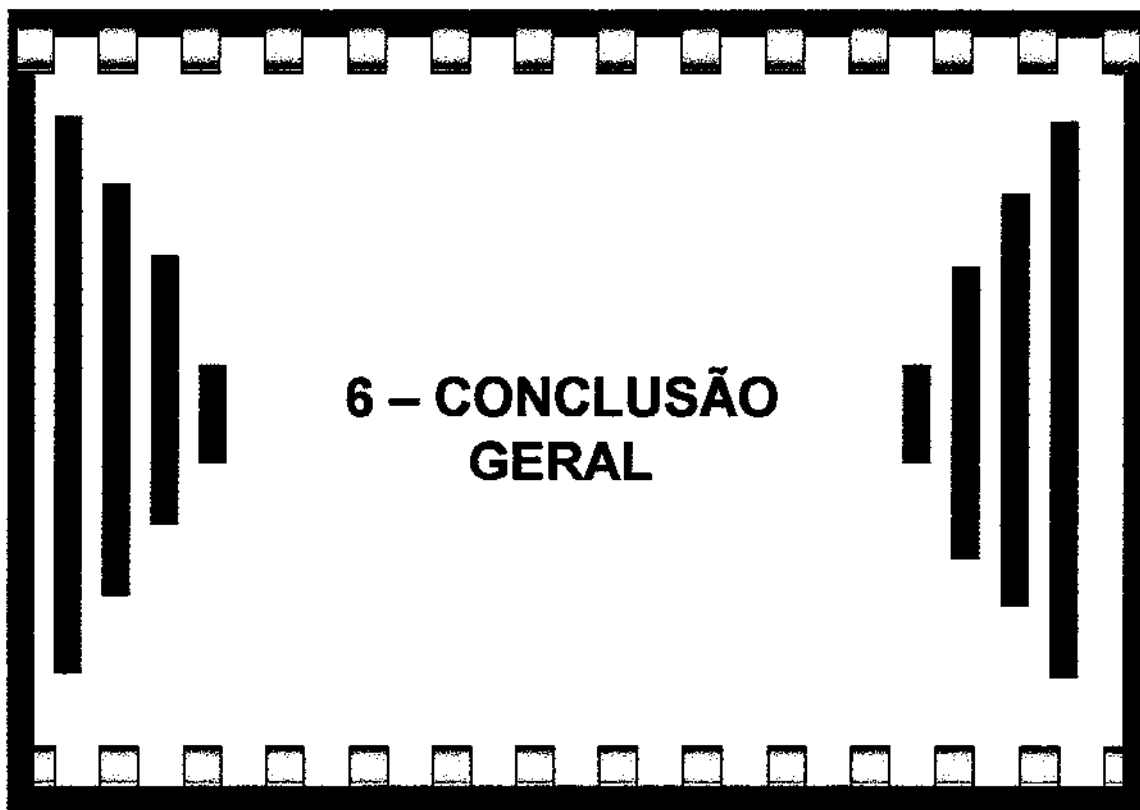
Acreditamos que, no presente estudo, a inibição da expressão da PGC-1 α leve a uma menor associação PGC-1 α /SREBP-1c e/ou reduzida fosforilação da AMPK, levando a um aumento na atividade da ACC com subsequente redução no acúmulo da malonil-CoA e inibição da CPT-1. Ainda, que a inibição da PGC-1 α reduz diretamente a expressão da CPT-1. Por fim, a redução na fosforilação da AMPK pode ser explicada pelo aumento na ativação da via clássica da insulina (RUTTER et al., 2003), uma vez que houve aumento na sensibilidade à insulina, comprovada por três distintos métodos, conforme já citado acima.

Em nosso estudo, apesar de não ter se aferido diretamente a produção hepática de glicose, verificou-se diminuição da ativação molecular da AKT e, vários estudos têm demonstrado a associação de esteatose hepática e resistência hepática à insulina (GUPTA et al., 2000; BROWNING e HORTON, 2004). Finalmente, o consumo de dieta hiperlipídica induz resistência hepática à insulina associado à reduzida fosforilação da AKT; dessa forma, a AKT é incapaz de fosforilar o fator de transcrição da família *forkhead* (FOXO-1). Por sua vez, a FOXO-1 em associação com a superexpressão de PGC-1 α , induz genes

gliconeogênicos, resultando em elevada produção hepática de glicose. Por outro lado, a superexpressão de PGC-1 α ativa o fator de transcrição SREBP-1c, este fator está envolvido na síntese de ácido graxo e, no caso do fígado, elevado acúmulo de lipídeos. No presente estudo, os animais tratados com dieta hiperlipídica apresentaram duas condições clínicas que aconteceram em paralelo; resistência hepática à insulina, com elevada produção de glicose e esteatose hepática. Neste sentido, a inibição da proteína que desempenha papel central nas duas condições, PGC-1 α , tem duplo efeito; primeiro por inibir proteínas conhecidas por seus efeitos lipogênicos, como a ACC, FAS e PPAR γ , e na sequência por restaurar a sensibilidade à insulina, com aumento na fosforilação da AKT e inibição direta ou indireta da interação FOXO-1/PGC-1 α /HNF-4 α , e conseqüentemente, redução da produção hepática de glicose.

Por fim, a segunda parte do estudo demonstra que a inibição da expressão da PGC-1 α reduz a lipogênese enquanto melhora os parâmetros moleculares da ação da insulina no fígado e tecido adiposo. O resultado final é a reversão do diabetes e da esteatose hepática induzidos por dieta.

Nossos resultados colocam a PGC-1 α numa posição central como controladora de vários fenômenos, tanto centrais (célula beta), quanto periféricos (fígado e tecido adiposo) envolvidos na fisiopatologia do diabetes mellitus tipo 2 e doenças relacionadas.



A partir dos resultados encontrados pode-se concluir que:

O estímulo simpático induzido pela exposição ao frio induz a expressão de PGC-1 α em ilhotas pancreáticas. A proteína PGC-1 α participa do controle da expressão de UCP-2 a qual desacopla a respiração mitocondrial resultando em reduzida relação ATP/ADP e subsequente redução da secreção de insulina.

A inibição da expressão da PGC-1 α reduz a lipogênese enquanto melhora os parâmetros moleculares da ação da insulina no fígado e tecido adiposo. O resultado final é a reversão do diabetes mellitus e da esteatose hepática.



AHREN, B. Autonomic regulation of islet hormone secretion – implications for health and disease. **Diabetologia**, 43: 393-410, 1990.

AMARAL, M.E.; CUNHA, D.A.; ANHE, G.F.; UENO, M.; CARNEIRO, E.M.; VELLOSO, L.A. et al. Participation of prolactin receptors and phosphatidylinositol 3-kinase and MAP kinase pathways in the increase in pancreatic islet mass and sensitivity to glucose during pregnancy. **J Endocrinol**, 183 (3): 469-76, 2004.

ANDERSEN, G.; GAEDE, P.H.; DRVSHOLM, T.; URHAMMER, S.A.; HANSEN, T.; PEDERSEN, O. A common Gly482Ser polymorphism of PGC-1 is associated with type 2 diabetes mellitus in two European populations (Abstract). **Diabetes** 51 (Suppl. 2): A 49, 2002.

ARAUJO, E.P.; DE SOUZA, C.T.; GASPARETTI, A.L.; UENO, M.; BOSCHERO, A.C.; SAAD, M.J. et al. Short-term in vivo inhibition of insulin receptor substrate-1 expression leads to insulin resistance, hyperinsulinemia, and increased adiposity. **Endocrinology**, 146 (3): 1428-37, 2005.

BERTHOUD, H.R.; FOX, E.A.; POWLEY, T.L. Localization of vagal preganglionic that stimulate insulin and glucagons secretion. **Am J Physiol**, 258: R160-8, 1990.

BING, C.; FRANSKISH, H.M.; PICKAVANGE, L.; WANG, Q.; HOPKINS, D.F.; STOCK, M.J. et al. Hyperphagia in cold-exposed rats is accompanied by decreased plasma leptin but unchanged hypothalamic NPY. **Am J Physiol**, 274 (1 Pt 2): R62-8, 1998.

BOSCHERO, A.C.; KAWAZU, S.; SENER, A.; HERCHUELZ, A.; MALAISSE, W.J. The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release: effects of valinomycin upon pancreatic islet function. **Arch Biochem Biophys**, 196 (1): 54-63, 1979.

BOSS, O.; SAMEC, S.; PAOLINI-GIACOBINO, A.; ROSSER, C.; DULLOO, A.; SEYDOUX, J. et al. Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. **FEBS Lett**, 408 (1): 39-42, 1997.

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

BROWN, J.E.; THOMAS, S.; DIGBY, J.E.; DUNMORE, S.J. Glucose induces and leptin decreases expression of uncoupling protein -2 mRNA in humans islets. **FEBS Lett**, 513: 189-92, 2002.

BROWNING, J.D.; HORTON, J.D. Molecular mediator of hepatic steatosis and liver injury. **J Clin Invest**, 114: 147-52, 2004.

CHAN, C.B.; MACDONALD, P.E.; SALEH, M.C.; JOHNS, D.C.; MARBAN, E.; WHEELER, M.B. Overexpression of uncoupling protein 2 inhibits glucose-stimulated insulin secretion from rats islets. **Diabetes**, 48: 1482-6, 1999.

CHAN, C.B.; DE LEO, D.; JOSEPH, J.W.; MCQUAID, T.S.; HA, X.F.; XU, F. et al. Increased uncoupling protein-2 levels in beta-cells are associated with impaired glucose-stimulated insulin secretion: mechanism of action. **Diabetes**, 50: 1302-10, 2001.

COULTER, A.A.; BEARDEN, C.M.; LIU, X.; KOZA, R.A.; KOZAK, L.P. Dietary fat interacts with QTLs controlling induction of PGC-1 alpha and UCP1 during conversion of white to brown fat **Physiol Genomics**, 14: 139-47, 2003.

DAITOKU, H.; YAMAGATA, K.; MATSUZAKI, H.; HATTA, M.; FUKAMIZU, A. Regulation of PGC-1 promoter activity by protein kinase B and the Forkhead transcription factor FKHR. **Diabetes**, 52: 642-9, 2003.

DeFRONZO, R.A. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. **Med Clin North Am**, 88 (4): 787-835, 2004.

DONATH, M.Y.; HALBAN, P.A. Decreased beta-cell mass in diabetes: significance, mechanisms and therapeutic implications. **Diabetologia**, 47 (3): 581-9, 2004.

EK, J.; ANDERSEN, G.; URHAMMER, S.A.; GAEDE, P.H.; DRIVSHOLM, T.; BORCH-JOHNSEN, K. et al. Mutation analysis of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 (PGC-1) and relationships of identified amino acid polymorphisms to type II diabetes mellitus. **Diabetologia**, 44: 2220-6, 2001.

ERECINSKA, M.; BRYLA, J.; MICHALIK, M.; MEGLASSON, M.D.; NELSON, D. Energy metabolism in islets of Langerhans. **Biochim Biophys Acta**, 1101: 273-95, 1992.

FREIRE, R.D.; CARDOSO, M.A.; SHINZATO, A.R.; FERREIRA, S.R. Nutritional status of Japanese-Brazilian subjects: comparison across gender and generation. **Br J Nutr**, 89: 705-13, 2003.

FILOZOF, C.; GONZALEZ, C.; SEREDAY, M.; MAZZA, C.; BRAGUINSKY, J. Obesity prevalence and trends in Latin-American countries. **Obes Rev**, 2: 99-106, 2001.

FLEURY, C.; NEVEROVA, S.; COLLINS, S.; RAIMBAULT, S.; CHAMPIGNY, O.; LEVI-MEYRUEIS, C. et al. Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. **Nat Genet**, 15: 269-72, 1997.

FLIER J.S. Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. **Cell**, 116 (2): 337-50, 2004.

GASPARETTI, A.L.; DE SOUZA, C.T.; PEREIRA-DA-SILVA, M.; OLIVEIRA, R.L.; SAAD, M.J.; CARNEIRO, E.M. et al. Cold exposure induces tissue-specific modulation of the insulin-signalling pathway in *rattus norvegicus*. **J Physiol**, 552, 149-62, 2003.

GILON, P.; HENQUIN, J.C. Mechanisms and physiological significance of the cholinergic control of pancreatic beta-cell function. **Endocr Rev**, 22: 565-604, 2001.

GRAVILOVA, O.; HALUZIK, M.; MATSUSUE, K.; CUTSON, J.J.; JOHNSON, L.; DIETZ, K.R. et al. Liver peroxisome proliferator-activated receptor gamma contributes to hepatic steatosis, triglyceride clearance, and regulation of body fat mass. **J Biol Chem**, 278: 34268-76, 2003.

GUPTA, G.; CASES, J.A.; SHE, L.; MA, X.H.; YANG, X.M.; HU, M. et al. Ability of insulin to modulate hepatic glucose production in aging rats is impaired by fat accumulation. **Am J Physiol**, 278: E985-91, 2000.

HAMMARSTEDT, A.; JANSSON, P.A.; WESSLAU, C.; YANG, X.; SMITH, U. Reduced expression of PGC-1 and insulin-signaling molecules in adipose tissue is associated with insulin resistance. **Biochem Biophys Res Commun**, 301: 578-82, 2003.

HEDESKOV, C.J. Mechanisms of glucose-induced insulin secretion. **Physiol Rev**, 60: 442-509, 1980.

HENQUIN, J.C.; MEISSNER, H.P. The ionic, electrical, and secretory effects of endogenous cyclic adenosine monophosphate in mouse pancreatic beta cells. **Endocrinology**, 115: 1125-34, 1984.

HERZIG, S.; LONG, F.; JHALA, U.S.; HEDRICK, S.; QUINN, R.; BAUER, A. et al. CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. **Nature**, 413: 179-83, 2001.

HERZIG, S.; HEDRICK, S.; MORANTTE, I.; KOO, S.H.; GALIMI, F.; MONTMINY, M. CREB controls hepatic lipid metabolism through nuclear hormone receptor PPAR-gamma. **Nature**, 26 :190- 3, 2003.

HONG, Y.; FINK, B.D.; DILLON, J.S.; SIVITZ, W.I. Effects of adenoviral overexpression of uncoupling protein -2 and -3 on mitochondrial respiration in insulinoma cells. **Endocrinology**, 142: 249-56, 2001.

HOO-PARIS, R.; JOURDAN, M.L.; WANG, L.C.; RAJOTE, R. Insulin secretion and substrate homeostasis in prolonged hypothermia in rats. **Am J Physiol**, 255 (6 Pt 2): R1035-40, 1998.

JOSEPH, J.W.; KOSHKIN, V.; ZHANG, C.Y.; WANG, J.; LOWELL, B.B.; CHAN, C.B. et al. Uncoupling protein 2 knockout mice have enhanced insulin secretory capacity after a high-fat diet. **Diabetes**, 51: 3211-9, 2002.

KELLEY G.G.; ZAWALICH, K.C.; ZAWALICH, W.S. Synergistic interaction of glucose and neurohumoral agonists to stimulate islet phosphoinositide hydrolysis. **Am J Physiol**, 269: E575-582, 1995.

KERNER, J.; DISTLER, A.M.; MINKLER, P.; PARLAND, W.; PETERMAN, S.M.; HOPPEL, C.L. Phosphorylation of rat liver mitochondrial carnitine palmitoyltransferase-I: effect on the kinetic properties of the enzyme. **J Biol Chem**, 279 (39): 41104-13, 2004.

KNUTTI, D.; KRESSLER, D.; KRALLI, A. Regulation of the transcriptional coactivator PGC-1 via MAPK-sensitive interaction with a repressor. **Proc Natl Acad Sci USA**, 98: 9713-8, 2000.

KNUTTI, K.; KRALLI, A. PGC-1, a versatile coactivator. **Trends Endocrinol Metab**, 12: 360-5, 2001.

KOO, S.H.; SATOH, H.; HERZIG, S.; LEE, C.H.; HEDRICK, S.; KULKARNI, R. et al. PGC-1 promotes insulin resistance in liver through PPAR-alpha-dependent induction of TRB-3. **Nat Med**, 10: 530-4, 2004.

KRAUSE, U.; BERTRAND, L.; HUE, L. Control of p70 ribosomal protein S6 kinase and acetyl-CoA carboxylase by AMP-activated protein kinase and protein phosphatases in isolated hepatocytes. **Eur J Biochem**, 269 (15): 3751-9, 2002.

KUDO, N.; GILLESPE, J.G.; KUNG, L.; WITTERS, L.A.; SCHULZ, R.; CLANACHAN, A.S. et al. Characterization of 5'AMP-activated protein kinase activity in the heart and its role in inhibiting acetyl-CoA carboxylase during reperfusion following ischemia. **Biochim Biophys Acta**, 1301 (1-2) :67-75, 1996.

LACY, P.E.; KOSTIANOVSKI, M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. **Diabetes**, 16: 35-9, 1967.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature (Lond)**, 227: 680-5, 1970.

LAMELOISE, N.; MUZZIN, P.; PRENTKI, M.; ASSIMACOPOULOS-JEANNET, F. Uncoupling protein 2: A possible link between fatty acid excess and impaired glucose-induced insulin secretion? **Diabetes**, 50: 803-9, 2001.

LI, L.X.; SKORPEN, F.; EGEBERG, K.; JORGENSEN, I.H.; GRILL, V. Induction of uncoupling protein 2 mRNA in beta-cells is stimulated by oxidation of fatty acids but not by nutrient oversupply. **Endocrinology**, 143: 1371-7, 2002.

LOUET, J.F.; HAYHURST, G.; GONZALES, F.J.; GIRARD, J.; DECAUX, J.F. The coactivator PGC-1 is involved in the regulation of the liver carnitine palmitoyltransferase I gene expression by cAMP in combination with HNF 4 alpha and cAMP – response element binding protein (CREB). **J Biol Chem**, 277 (41): 37991-8000, 2002.

MALAISSSE, W.J.; MALAISSSE-LAGAE, F. The role of cyclic AMP in insulin release. **Experientia Basel**, 40: 1068-75, 1984.

MALAISSSE, W.J.; GARCIA-MORALES, P.; DUFRANE, S.P.; SENER, A.; VALVERDE, I. Forskolin-induced activation of adenylate cyclase, cyclic AMP production and insulin in rat pancreatic islets. **Endocrinology**, 115: 2015-20, 1984.

MALAISSSE, W.J.; SENER, A.; LEVY, J.; HERCHUELZ, A. The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release: Qualitative and quantitative aspects of glycolysis in isolated islets. **Acta Diabetol Lat**, 13(5-6): 202-15, 1976.

MARTIN, B.C.; WARRAN, J.H.; KROLEWSKI, A.S.; BERGAMAN, R.N.; SOELDNER, J.S.; KAHN, C.R. Role of glucose and insulin resistance in development of type 2 diabetes mellitus: results of a 25-year follow-up study. **Lancet**, 340 (8825): 925-9, 1992.

MICHAEL, L.F.; WU, Z.; CHEATHAM, R.B.; PUIGSERVER, P.; ADELMANT, G.; LEHMAN, J.J. et al. Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1. **Proc Natl Acad Sci USA**, 98: 3820-5, 2001.

MINOKOSHI, Y.; ALQUIER, T.; FURUKAWA, N.; KIM, Y.B.; LEE, A.; XUE, B. et al. AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. **Nature**, 428 (6982): 569-74, 2004.

MULLER, Y.L.; BOGARDUS, C.; PEDERSEN, O.; BAIER, L. A Gly482Ser missense mutation in the peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 is associated with altered lipid oxidation and early insulin secretion in Pima Indians. **Diabetes**, 52 (3): 895-8, 2003.

NAKAKI, T.; ISHII, K.; KATO, R. Postsynaptic alpha-2 adrenergic receptors in isolated rat islets of Langerhans: inhibition of insulin release and cyclic 3':5'-adenosine monophosphate accumulation. **J Pharmacol Exp Ther**, 216: 607-612, 1981.

NAKAZAKI, M.; KAKEI, M.; ISHIRA, H.; KORIYAMA, N.; HASHIGUCHI, H.; ASO, K. et al. Association of upregulated activity of K(ATP) channels with impaired insulin secretion in UCP1-expressing insulinoma cells. **J Physiol**, 540: 781-9, 2002.

NEWGARD, C.B. While tinkering with the beta-cell...metabolic regulatory mechanisms and new therapeutic strategies: American Diabetes Association Lilly Lecture, 2001. **Diabetes**, 51: 3141-50, 2002.

NICHOLLS, D.G. The bioenergetics of brown adipose tissue mitochondria. **FEBS Lett**, 61 (2): 103-110, 1976.

NICOT, C.; NAPAL, L.; RELAT, J.; GONZALEZ, S.; LLEBARIA, A.; WOLDEGIORGS, G. et al. C75 activates malonyl-CoA sensitive and insensitive components of the CPT system. **Biochem Biophys Res Commun**, 325 (3): 660-4, 2004.

NIWA, T.; MATSUKAWA, Y.; SENDA, T.; NIMURA, Y.; HIDAKA, H.; NEKI, I. Acetylcholine activates intracellular movement of insulin granules in pancreatic beta-cells via inositol trisphosphate-dependent [correction of triphosphate-dependent] mobilization of intracellular Ca²⁺. **Diabetes**, 47: 1699-1706, 1998.

OBERKOFER, H.; SCHRAML, E.; KREMPLER, F.; PATSCH, W. Restoration of sterol regulatory element-binding protein-1c gene expression in HepG2 cells by peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator-1alpha. **Biochem J**, 381: 357-63, 2004.

OLIVEIRA, R.L.; UENO, M.; DE SOUZA, C.T.; PEREIRA-DA-SILVA, M.; GASPARETTI, A.L.; BEZERRA, R.M. et al. Cold-induced PGC-1 [alpha] expression modulates muscle glucose uptake through an insulin receptor/AKT-independent, AMPK-dependent pathway. **Am J Physiol**, 287: E686-95, 2004.

PEREIRA-DA-SILVA, M.; TORSONI, M.A.; NOURANI, H.V.; AUGUSTO, V.D.; DE SOUZA, C.T.; GASPARETTI, A.L. et al. Hypothalamic melanin-concentrating hormone is

induced by cold exposure and participates in the control of energy expenditure in rats. **Endocrinology**, 144: 4831-40, 2003.

PETERHOFF, M.; SIEG, A.; BREDE, M.; CHAO, C.M.; HEIN, L.; ULRICH, S. Inhibition of insulin secretion via distinct signaling pathways in alpha2-adrenoceptor knockout mice. **Eur J Endocrinol**, 149 (4): 343-50, 2003.

PICK, A.; CLARK, J.; KUBSTRUP, C.; LEVISETTI, M.; PUGH, W.; BONNER-WEIR, S. et al. Role of apoptosis in failure of beta-cell mass compensation for insulin resistance and beta-cell defects in the male Zucker diabetic fatty rat. **Diabetes**, 47 (3): 358-64, 1998.

PORTE, D. Jr.; WILLIAMS, R.H. Inhibition of insulin release by norepinephrine in man. **Science**, 152: 1248-50, 1996.

PUIGSERVER, P.; SPIEGELMAN, B.M. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. **Endocr Rev**, 24: 78-90, 2003.

PUIGSERVER, P.; RHEE, J.; DONOVAN, J.; WALKEY, C.J.; YOON, J.C.; ORIENTE, F. et al. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction. **Nature**, 423: 550-5, 2003.

PUIGSERVER, P.; WU, Z.; PARK, C.W.; GRAVES, R.; WRIGHT, W.; SPIEGELMAN, B.M. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. **Cell**, 92: 829-39, 1998.

RHEE, J.; INOUE, Y.; YOON, J.C.; PUIGSERVER, P.; FAN, M.; GONZALEZ, F.J. et al. Regulation of hepatic fasting response by PPARgamma coactivator-1alpha (PGC-1): requirement for hepatocyte nuclear factor 4alpha in gluconeogenesis. **Proc Natl Acad Sci USA**, 100: 4012-7, 2003.

RUTTER, G.A.; Da SILVA XAVIER, G.; LACLERC, J. Roles of 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) in mammalian glucose homeostasis. **Biochem J**, 375 (Pt 1): 1-16, 2003.

SALTIEL, A.R.; KAHN, C.R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, 414: 799-806, 2001.

SCHAUWEN, P.; HESSELINK, M. UCP2 and UCP3 in muscle controlling body metabolism. **J Exp Biol**, 205: 2275-85, 2002.

SCOTT, A.M.; ATWATER, I.; ROJAS, E. A method for the simultaneous measurement of insulin release and B cell membrane potential in single mouse islets of Langerhans. **Diabetologia**, 21: 470-5, 1981.

SHAN, Y.X.; YANG, T.L.; MESTRIL, R.; WANG, P.H. Hsp10 and Hsp60 suppress ubiquitination of insulin-like growth factor-1 receptor and augment insulin-like growth factor-1 receptor signaling in cardiac muscle: implications on decreased myocardial protection in diabetic cardiomyopathy. **J Biol Chem**, 278 (46): 45492-8, 2003.

SHARP, G.W.G. The adenylate cyclase-cyclic AMP system in islets of Langerhans and its role in the control of insulin release. **Diabetologia**, 16: 287-96, 1979.

SHARP, G.W. Mechanisms of inhibition of insulin release. **Am J Physiol**, 271: C1781-99, 1996.

SHEN, W.; SCEARCE, L.M.; BRESTELLI, J.E.; SUND, N.J.; KAESTNER, K.H. Foxa3 (hepatocyte nuclear factor 3gamma) is required for the regulation of hepatic GLUT2 expression and the maintenance of glucose homeostasis during a prolonged fast. **J Biol Chem**. 276 (46): 42812-7, 2001.

SLOOP, K.W.; CAO, J.X.; SIESKY, A.M.; ZHANG, H.Y.; BODENMILLER, D.M.; COX, A.L. et al. Hepatic and glucagon-like peptide-1-mediated reversal of diabetes by glucagon receptor antisense oligonucleotide inhibitors. **J Clin Invest**, 113 (11): 1571-81, 2004.

SPEAKMAN, J.R. Obesity: the integrated roles of environment and genetics. **J Nutr**, 134: 2090S-2105S, 2004.

SPIEGELMAN, B.M.; HENRICH, R. Biological control through regulated transcriptional coactivators. **Cell**, 119: 157-67, 2004.

SPIEGELMAN, B.M.; FLIER, J.S. Obesity and the regulation of energy balance. **Cell**, 104, 531-43, 2001.

STEINBERG, G.R.; SMITH, A.C.; VAN DENDEREN, B.J.; CHEN, Z.; MURTHY, S.; CMPBELL, D.J. AMP- activated protein kinase is not down- regulated in human skeletal muscle of obese females. **J Clin Endocrinol Metab**, 89 (9): 4575-80, 2004.

STRACK, A.M.; SEBASTIAN, R.J.; SCHARTRZ, M.W.; DALLMAN, M.F. Glucocorticoids and insulin: reciprocal signals for energy balance. **Am J Physiol**, 268, R142-9, 1995.

TCHEREPANOVA, I.; PUIGSERVER, P.; NORRIS, J.D.; SPIEGELMAN, B.M.; McDONNELL, D.P. Modulation of estrogen receptor- α transcriptional activity by the coactivator PGC-1. **J Biol Chem**, 275: 16302-8, 2000.

TIRABY, C.; TAVERNIER, G.; LEFORT, C.; LARROUY, D.; BOUILLAUD, F.; RICQUIER, D. Acquisition of brown fat cell features by human white adipocytes. **J Biol Chem**, 278 :33370-6, 2003.

TRINDER, P. Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogen chromogen. **J Clin Pathol**, 22: 158-61, 1969.

ULRICH, S.; WOLLHEIN, C.B. Islet cyclic AMP levels are not lowered during α 2-adrenergic inhibition of insulin release. Studies with epinephrine and forskolin. **J Biol Chem**, 259: 4111-5, 1984.

VEJA, R.B.; HUSS, J.M.; KELLY, D.P. The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor α in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. **Mol Cell Biol**, 20: 1868-76, 2000.

VERSPOHL, E.J.; HERMANN, K. Involvement of G proteins in the effect of carbachol and cholecystokinin in rat pancreatic islets. **Am J Physiol**, 271: E 65-72, 1996.

VILLARROYA, F.; BRUN, S.; GIRALT, M.; CAMARA, Y.; SOLANES, G.; IGLESIAS, R. Gene expression of leptin and uncoupling proteins: molecular end-points of fetal development. **Biochem Soc Trans**, 29 (Pt 2): 76-80, 2001.

WEIR, G.C.; LAYBUTT, D.R.; KANETO, H.; BONNER-WEIR, S.; SHARMA, A. Beta-cell adaptation and decompensation during the progression of diabetes. **Diabetes**, 50 Suppl 1: S154-9, 2001.

WIESLI, P.; SCHAFFLER, E.; SEIFERT, B.; SCHMID, C.; DONATH, M.Y. Islets secretory capacity determines glucose homeostasis in the face of insulin resistance. **Swiss Med Wkly**, 134 (37-38): 559-64, 2004.

WU, Z.; PUIGSERVER, P.; ANDERSSON, U.; ZHANG, C.; ADELMANT, G.; MOOHA, V. et al. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. **Cell**, 98: 115-24, 1999.

YAMASHITA, H.; SATO, Y.; MORI, N. Difference in induction of uncoupling protein genes in adipose tissues between young and old rats during cold exposure. **FEBS Lett**, 458 (2): 157-61, 1999.

YANG, X.; ENERBACK, S.; SMITH, U. Reduced expression of FOXC2 and brown adipogenic genes in human subjects with insulin resistance. **Obes Res**, 11: 1182-91, 2003.

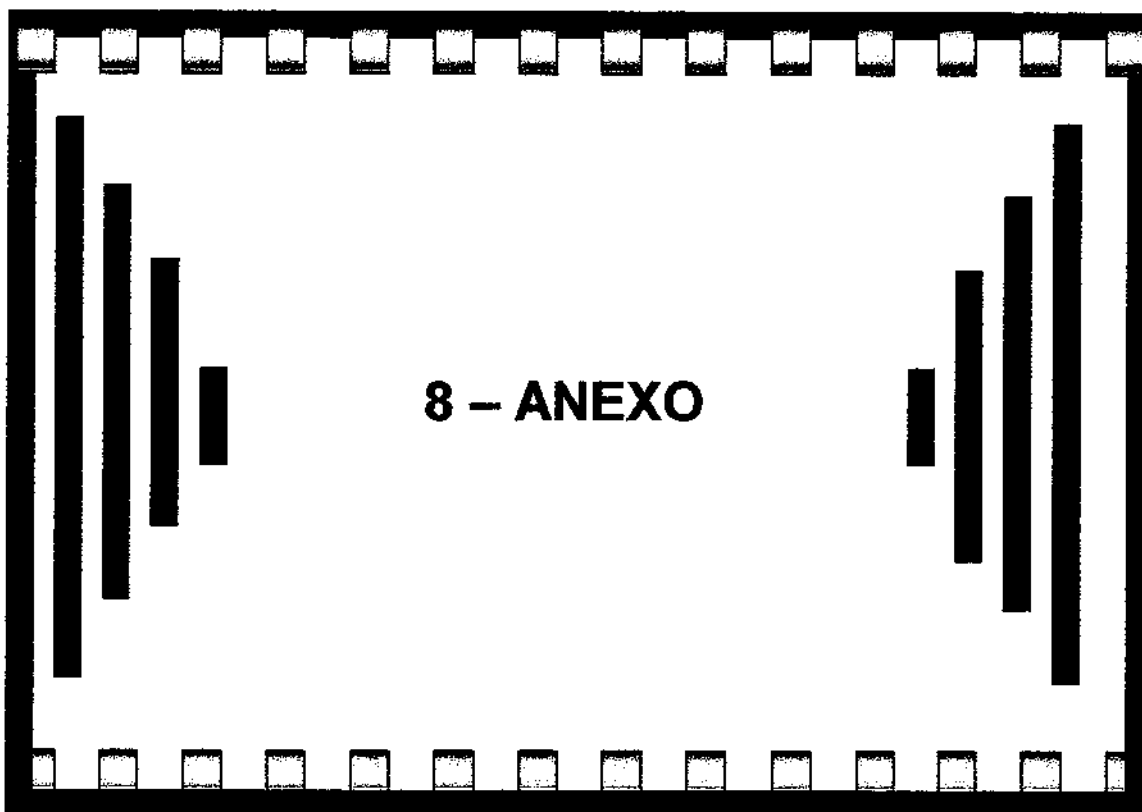
YOON, J.C.; PUIGSERVER, P.; CHEN, G.; DONOVAN, J.; WU, Z.; RHEE, J. Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. **Nature**, 413: 131-8, 2001.

YOON, J.C.; XU, G.; DEENEY, J.T.; YANG, S.N.; RHEE, J.; PUIGSERVER, P. et al. Suppression of beta cell energy metabolism and insulin release by PGC-1alpha. **Dev Cell**, 5: 73-83, 2003.

ZHANG, C.Y.; BAFTY, G.; PERRET, P.; KRAUSS, S.; PERONI, O.; GRUJIC, D. et al. Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, beta cell dysfunction, and type 2 diabetes. **Cell**, 105: 745-55, 2001.

ZHOU, Y.T.; SHIMABUKURO, M.; KOYAMA, K.; LEE, Y.; WANG, M.Y.; TRIEU, F. et al. Induction by leptin of uncoupling protein-2 and enzymes of fatty acid oxidation. **Proc Natl Acad Sci USA**, 94: 6386-90, 1997.

ZIMMET, P.; ALBERTI, K.G.; SHAW, J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. **Nature**, 414 (6865): 782-7, 2001.





Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 788-1, sobre "CO-ATIVADOR-1 ALFA DO RECEPTOR ATIVADO POR PROLIFERADOR DE PEROXISOMA (PCG-1a): UM CO-ATIVADOR DE TRANSCRIÇÃO GÊNICA E ENVOLVIDO NA SECREÇÃO E AÇÃO PERIFÉRICA DE INSULINA" sob a responsabilidade de Prof. Dr. Lício Augusto Velloso / Claudio Teodoro de Souza está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 09 de março de 2005.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 788-1, entitled "PROLIFERATOR PEROXISSOMAL RECEPTOR-ACTIVE GAMMA CO-ATIVATOR-1 ALPHA: A CO-ATIVATOR OF GENE TRANSCRIPTIONAL IS INVOLVED IN THE INSULIN PERIPHERAL ACTION SECRETION", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on March 9, 2005.

Campinas, 09 de março de 2005.

Profa. Dra. Liana Verinaud
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

Fátima Alonso
Secretária - CEEA/IB/UNICAMP