

Gabriela Albuquerque

Avaliação dos mecanismos de ação de um inibidor farmacológico da expressão da proteína Coativador 1 alfa do receptor ativado por proliferador do peroxisoma (PGC-1 α) para o tratamento de diabetes mellitus, resistência à insulina e síndrome metabólica

Campinas

2010

Gabriela Albuquerque

Avaliação dos mecanismos de ação de um inibidor farmacológico da expressão da proteína Coativador 1 alfa do receptor ativado por proliferador do peroxisoma (PGC-1 α) para o tratamento de diabetes mellitus, resistência à insulina e síndrome metabólica

Tese de doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Fisiopatologia Médica.

Orientador: Lício Augusto Velloso

Campinas

2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

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

AL15a Albuquerque, Gabriela
Avaliação dos mecanismos de ação de um inibidor farmacológico da expressão da proteína coativador 1 alfa do receptor ativado por proliferador do peroxisoma (PGC-1 α) para o tratamento de diabetes mellitus, resistência à insulina e síndrome metabólica / Gabriela Albuquerque. Campinas, SP : [s.n.], 2010.

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

1. Diabetes mellitus tipo 2. 2. Obesidade. 3. Esteatose hepática. I. Velloso, Lício Augusto. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : Mechanisms of drug action of an inhibitor of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha (PCG-1alpha) for the therapeutics of diabetes, insulin and metabolic syndrome

Keywords: • Type 2 Diabetes mellitus
• Obesity
• Fatty liver

Titulação: Doutor em Fisiopatologia Médica

Área de concentração: Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do Desenvolvimento

Banca examinadora:

Prof. Dr. Lício Augusto Velloso

Prof. Dr. Jazon Romilson de Souza Almeida

Profa. Dra. Silvana Auxiliadora Bordin da Silva

Profa. Dra. Luciane Carla Alberici

Profa. Dra. Maria Helena de Melo Lima

Data da defesa: 05-02-2010

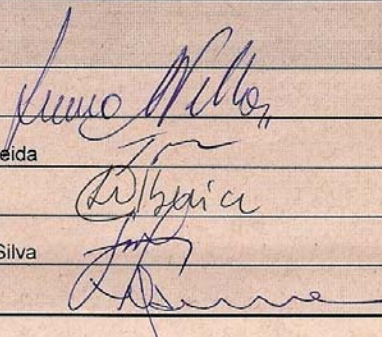
Banca examinadora da tese de Doutorado

Gabriela Girão Albuquerque

Orientador(a) : Prof(a). Dr(a). Lício Augusto Velloso

Membros:

1. Prof(a). Dr(a). Lício Augusto Velloso
2. Prof(a). Dr(a). Jazon Romilson de Souza Almeida
3. Prof(a). Dr(a). Luciane Carla Alberici
4. Prof(a). Dr(a). Silvana Auxiliadora Bordin da Silva
5. Prof(a). Dr(a). Maria Helena de Melo Lima



Curso de pós-graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 05/02/2010

Dedicatória

Dedico este trabalho:

Aos meus pais por terem acreditado em mim e por todo esforço que fizeram para possibilitar meus estudos;

Aos meus irmãos pela colaboração para que isso fosse possível;

Ao Kléber por todo apoio, ajuda, companheirismo e por ter me ajudado a direcionar meu caminho

Agradecimento Especial

Agradeço ao meu orientador, professor Lício Velloso, pela oportunidade de fazer parte do seu grupo e por ser um exemplo de cientista para mim e para todos que tiveram a felicidade de conhecê-lo. Agradeço também pelo incondicional apoio e confiança em mim depositada desde o momento em que aceitou ser meu orientador. Muito obrigada!

Agradecimentos

Amigos fazem a vida passar de maneira mais amena e agradável e durante esses quase quatro anos de estadia em Campinas, várias pessoas foram fundamentais neste sentido. Não irei cometer o erro de citá-las pois provavelmente esqueceria algum nome e isto seria imperdoável. Neste sentido, agradeço a todos os amigos feitos neste período dentro e fora do Laboratório de Sinalização Celular. Agradeço pelos bons momentos que passamos no laboratório e fora dele também, pela ajuda, discussões e por muitas risadas.

Agradeço ao professor Bazotte, que me orientou durante o mestrado, pela amizade e ajuda prestada durante todo o curso do meu doutorado. Muito obrigada!

Agradeço às minhas amigas de Maringá (que hoje estão espalhadas pelo Brasil) por me fazerem sentir que posso contar com elas para o que for preciso!

E por fim, agradeço à todos aqueles que de alguma forma participaram do desenvolvimento deste trabalho.

Sumário

Item	Página
Resumo	xiii
Abstract	xvi
1 – Introdução	18
1.1 - Epidemiologia do DM2	19
1.2 – Fisiopatologia do DM2	20
1.2.1 – Complicações macrovasculares	23
1.2.2 – Complicações microvasculares	24
1.3 – Associação entre diabetes mellitus, obesidade, dislipidemia, hipertensão e esteatose hepática	25
1.4 – Prevenção e tratamento do diabetes mellitus	27
1.4.1 – Tratamento farmacológico	29
1.4.2 – Estiluladores da secreção de insulina	29
1.4.3 – Incretinomiméticos	31

1.4.4 – Potencializadores da ação da insulina	32
1.4.5 – Novo alvo terapêutico para o tratamento do DM2	34
2 – Objetivos	40
2.1 - Objetivos gerais	41
2.2 - Objetivos específicos	41
3 - Materiais e Métodos	42
3.1 – Animais Experimentais	43
3.2 – Construção de Oligonucleotídeos (sense e antisense) PGC-1 α	45
3.3 – Isolamento de ilhotas e secreção estática de insulina	45
3.4 – Teste de biodisponibilidade de PGC1 α AS	46
3.5 – Perfusão de fígado <i>in situ</i>	46
3.6 – Clamp euglicêmico-hiperinsulinêmico	47
3.7 – Teste de tolerância à glicose	48

3.8 – Real Time-PCR	48
3.9 – Western Blot	49
3.10 – Histologia	50
3.11 – Dosagens bioquímicas	50
3.12 – Dosagens triglicérides no fígado	50
3.13 – Análise estatística	51
4 – Resultados	52
5 – Discussão Geral	82
6 – Conclusão	92
7 – Referências Bibliográficas	94

Lista de Abreviaturas

Siglas

ACC	Acetil-CoA caboxilase
Akt	Proteína serina quinase
ALT	Alanina aminotransferase
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
ANOVA	Análise de variância
AS	Antisense
AST	Aspartato aminotransferase
CCL ₄	Tetracloreto de carbono
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
DM2	Diabetes Mellitus Tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FAS	Ácido graxo sintase
FOXO	Fator de transcrição <i>forkhead</i> 1
GAPD	Desidrogenase de gliceraldeído-3-fosfato
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
mRNA	RNA mensageiro
NAFLD	Doença hepática gordurosa não alcoólica
NASH	Esteato-hepatite não alcoólica
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase

PGC-1 α	Coativador 1 alfa do receptor α ativado por proliferador de peroxissoma
PGC-1 α AS	Antisense de PGC-1 α
PMSF	Fluoreto de fenilmetil sulfonila
RI	Resistência à insulina
RNA	Ácido ribonucléico
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SREPP1c	Proteína 1c de ligação ao elemento srebp
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
TRIS	Metano hidroximetilamina

Resumo

A prevalência global de diabetes mellitus do tipo 2 vem aumentando rapidamente em paralelo ao aumento do número de casos de obesidade. Entretanto, os métodos terapêuticos empregados para esta doença permanecem insatisfatórios. Existem drogas potencializadoras das ações da insulina e fármacos que estimulam a secreção de insulina, no entanto nenhum medicamento atualmente disponível é capaz de corrigir simultaneamente todas as disfunções envolvidas na gênese do diabetes mellitus tipo 2, além disso, a maior parte destes, perde a eficácia depois de alguns anos de evolução da doença. Dessa forma os desafios para as novas drogas sensibilizadoras e estimuladoras da secreção de insulina será oferecer uma eficácia equivalente às drogas disponíveis, com menor número de efeitos colaterais e ação mais estável. Estudos recentes têm revelado que o coativador de transcrição gênica PGC-1 α está associado com a regulação da gliconeogênese hepática e secreção de insulina. Sendo a proteína PGC-1 α uma importante co-ativadora de fatores de transcrição, e visto que sua inibição parcial provoca uma melhora geral no quadro de DM2, decidimos investigar os efeitos da inibição de PGC-1 α em modelos animais de obesidade e DM2. Os resultados mostraram que a inibição de PGC-1 α , através de um oligonucleotídeo antisense (PGC-1 α AS), em animais obesos e diabéticos provoca aumento na secreção de insulina em cultura e *in vivo* e reduz os níveis glicêmicos sem provocar hipoglicemia. Além disso, há

aumento no consumo de glicose, medido por clamp euglicêmico-hiperinsulinêmico e redução da produção hepática de glicose. Ainda, a inibição da PGC-1 α causou reversão da esteatose hepática induzida por dieta e pelo uso de etanol. Isso foi acompanhado pelo aumento da fosforilação e ativação da enzima Akt e pela fosforilação/inativação do fator de transcrição FOXO1 promovendo melhora da ação molecular da insulina no fígado. Assim, concluímos que a inibição da expressão de PGC-1 α pode ser um método terapêutico de interesse para o tratamento de diabetes mellitus do tipo 2 e condições metabólicas afins.

Abstract

Abstract

Type 2 diabetes mellitus is one of the most prevalent and threatening diseases in modern societies. Nevertheless, the therapeutic approaches currently used are insufficient to promote adequate metabolic control of the disease. There are a number of drugs that increase insulin secretion and also drugs that enhance insulin action. However, no compound currently available is capable of simultaneously correcting insulin secretion and action defects present in diabetes. Recent data has provided evidence for the role of the co-activator of gene transcription, PGC-1 α , on the control of insulin secretion and hepatic glucose production. Therefore, we have decided to evaluate the effects of an antisense oligonucleotide compound designed to inhibit PGC-1 α expression, on the control of diabetes mellitus in distinct animal models. Our results show that the inhibition of PGC-1 α increases insulin secretion in diabetic and obese animals without leading to hypoglycemia. In addition, the compound increased glucose action in peripheral tissues, improved glucose clearance during an euglycemic-hyperinsulinemic clamp and reduced hepatic glucose production. Finally, the inhibition of PGC-1 α expression improved hepatic steatosis induced by ethanol and high-fat diet, which was accompanied by increased insulin signal transduction through the Akt/FOXO1 signaling pathway. We conclude that the inhibition of PGC-1 α may be a potentially useful alternative for the treatment of type 2 diabetes mellitus and associated metabolic dysfunctions.

1. Introdução

Diabetes mellitus do tipo 2 (DM2) é uma doença multifatorial caracterizada pela instalação de hiperglicemia em decorrência do progressivo declínio da função das células beta do pâncreas, e da instalação de resistência à ação da insulina [1-2]. A resistência à insulina foi considerada durante muito tempo como o principal fator determinante para o desenvolvimento da doença [3]; entretanto, muitos indivíduos com resistência à insulina não desenvolvem DM2. Em tais indivíduos as células beta são capazes de aumentar a produção de insulina para compensar o aumento na demanda devido a uma resposta reduzida nos tecidos periféricos [4]. Glicemia de jejum alterada e tolerância à glicose diminuída, muitas vezes consideradas como um estado pré-diabético, também aumentam o risco de desenvolver DM2. Nestes indivíduos, a inabilidade das células beta em suprir a demanda metabólica de insulina é o fator determinante para a instalação do DM2.

Epidemiologia do DM2

Em função do aumento na sua incidência, o DM2 passou a ser considerado um dos maiores problemas de saúde pública em todo o mundo, sendo tratado como um fenômeno de proporções epidêmicas. Há poucos anos, o conceito de “epidemia de diabetes” era restrito aos Estados Unidos enquanto as outras partes do mundo não eram consideradas tão ameaçadas. Entretanto, nas últimas duas décadas o quadro se alterou, e hoje, nenhuma região do planeta pode se considerar livre do risco de apresentar elevada prevalência de diabetes [4].

No mundo, a prevalência global de diabetes em adultos com 20 anos ou mais era de 4,0% em 1995 e projeções indicam um aumento para 5,4% em 2030, sendo ligeiramente superior nos países desenvolvidos quando comparado aos países em desenvolvimento. Expresso em número de pacientes, a evolução esperada do diabetes é mais impressionante ainda. O número total de doentes adultos com DM2 deve aumentar em todo o mundo, de 135 para 300 milhões entre 1995 e 2030, principalmente devido a um enorme aumento de 171% nos países em desenvolvimento, de 84 para 228 milhões, enquanto deve aumentar aproximadamente 41% nos países desenvolvidos, de 41 para 72 milhões [4].

Em 2030, mais de 75% dos pacientes diabéticos no mundo irão morar em países em desenvolvimento, comparado com 62% em 1995. Além disso, essas projeções calculadas por especialistas da Organização Mundial de Saúde estão provavelmente subestimadas, uma vez que são baseadas somente na evolução demográfica esperada e não levam em conta a evolução da obesidade das próximas décadas. Portanto, a realidade do diabetes em 2030 pode ser muito superior a tais valores [4].

Fisiopatologia do DM2

Como dito acima, o DM2 decorre da falha progressiva das células beta pancreáticas (e, portanto, do déficit progressivo de secreção de insulina), na presença de resistência à insulina (RI). Acredita-se que a combinação de RI e hiperinsulinemia crônica levam a uma série de alterações metabólicas deletérias, provocando eventualmente, a hiperglicemia e DM2 [2]. Até há pouco tempo, DM2 era

atribuído exclusivamente ao desenvolvimento e agravamento da RI. Entretanto, o reduzido metabolismo da glicose devido ao sedentarismo, o aumento da disponibilidade de glicose, devido ao excesso de alimentos ingeridos, e a redução progressiva no armazenamento de glicose em tecidos sensíveis a insulina agravam os níveis glicêmicos levando ao DM2 [5].

Uma série de dados clínicos consideram a RI como um importante fator etiológico no DM2: (i) DM2 e resistência à insulina são bastante relacionadas, mais de 80% dos indivíduos com DM2 também apresentam resistência à insulina [6]; RI é comum também em indivíduos obesos que ainda não desenvolveram o DM2 [7], dessa forma, a RI pode proporcionar a ligação fisiopatológica entre a massa corporal crescente e aumento da glicemia; (ii) RI parece preceder a disfunção das células beta na patogênese do DM2 [6]; (iii) RI parece acelerar ou predispor à disfunção das células beta através de um mecanismo de exaustão de célula beta, ou seja, a aumentada demanda de secreção, devido à resistência dos tecidos periféricos à sinalização da insulina, resulta em contínua hiperestimulação da célula beta e eventual falha [8]. Embora o DM2 seja correlacionado à RI, um fato estranho (considerando que a RI seja realmente um dos fenômenos determinantes) é a ausência de correlação inversa entre RI e DM2. As taxas de prevalência de RI em diversas populações são muitas vezes muito maiores que as de DM2, e claramente, a grande maioria de indivíduos com RI não irá desenvolver a doença [9].

Por outro lado, diversas evidências obtidas recentemente sugerem que a disfunção das células beta pode ser responsável pela RI. Por exemplo, a perda da primeira fase da liberação de insulina, uma disfunção secretória da célula beta

característica do DM2, está associada com o desenvolvimento da RI [9]. Considerar a RI como a causadora do DM2 muitas vezes parece contra intuitivo uma vez que, como dito acima, muitos indivíduos com RI não desenvolvem a doença [9]. Estudos que procuram distinguir cuidadosamente as contribuições de RI e do déficit de secreção de insulina para o desenvolvimento de DM2, sugerem que a RI não é uma condição necessária nem suficiente para o desenvolvimento da doença. Dentro desta visão, embora não seja a causa primária do DM2, a RI permanece como alvo central das abordagens terapêuticas pois é, sem dúvida, um fator de risco para aterosclerose e doenças cardiovasculares e, se não tratada, promove hiperglicemia e um ambiente glicotóxico para as células beta em indivíduos suscetíveis [10].

A glicotoxicidade é um dos principais fatores que predispõem à disfunção das células beta. A hiperglicemia crônica pode provocar falência das células beta sem um aumento compensatório na taxa de proliferação destas, resultando em deficiência na secreção de insulina. No pâncreas endócrino, elevações modestas nos níveis de glicose acima dos valores normais provocam alterações deletérias na função, massa e fenótipo das células beta [11]. A hiperglicemia crônica pode levar a várias alterações, dentre elas; a redução dos transportadores de glicose localizados nas células beta (GLUT-2), a redução da quantidade de transportadores GLUT-4 nos tecido musculares esqueléticos, a redução da capacidade de cada transportador carrear glicose, e o aumento da glicação de algumas proteínas e/ou enzimas envolvidas no metabolismo da glicose, como a glicoquinase, que age como "sensor de glicose" nestas células [12]. A progressiva deterioração da resposta das células beta exacerba o ambiente

glicotóxico, o que leva a uma piora na resposta à insulina gerando um ciclo vicioso. A fase aguda de resposta da insulina é perdida; um número de respostas a processos celulares são ativados, indicando um aumento no estresse celular, além de haver maior regulação de genes apoptóticos [11]. Lipotoxicidade associada com elevados níveis de ácidos graxos livres, comumente observada em pacientes obesos, resistentes a insulina e com DM2, tem sido associada à diminuição da síntese de insulina e aumento do estresse metabólico em células beta [13].

Complicações macrovasculares

O DM2 foi a sétima causa de morte apresentada nos atestados de óbito dos Estados Unidos em 2006, e o risco de mortalidade é duas vezes maior entre pessoas com diabetes do que entre aquelas que não apresentam a doença. A mortalidade por diabetes está relacionada principalmente à doença cardiovascular. A doença cardíaca e o acidente vascular cerebral são responsáveis por 65% das mortes de indivíduos com diabetes. Um aumento nas complicações macrovasculares (por exemplo, a doença arterial coronariana e a doença arterial periférica) é muito observado entre os pacientes com DM2 [14]. Evidências clínicas sugerem que para o DM2 a doença arterial coronariana é equivalente ao infarto do miocárdio em indivíduos não diabéticos [14]. Esta observação foi recentemente apoiada por um estudo publicado em 2009 que envolveu 3,3 milhões de indivíduos. Os participantes com DM2 tinham um risco elevado de mortalidade por doença cardiovascular em comparação com pacientes não diabéticos que tiveram um infarto do miocárdio prévio, e um risco significativamente maior de todas as causas de morte do que

pacientes não diabéticos com infarto do miocárdio prévio ($P < 0,001$) [15]. O risco de desenvolver doença cardiovascular é quatro vezes superior, e eventos cardiovasculares ocorrem cerca de 15 anos antes para pacientes com diabetes em comparação com indivíduos não diabéticos [16]. Além disso, diabetes e hipertensão estão associados com um aumento de 7,5 vezes na mortalidade por doenças cardiovasculares [17]. Deve-se notar ainda que hipertensão e DM2 são condições clínicas comumente associadas, de tal forma que aproximadamente 75% dos adultos com diabetes tem hipertensão ou fazem uso de medicamentos anti-hipertensivos. Resultados de um estudo prospectivo com 12.550 adultos não diabéticos (intervalo de idade entre 45-64 anos) mostrou que a probabilidade de desenvolver o DM2 nos participantes que eram hipertensos foi quase 2,5 vezes maior do que nos indivíduos sem hipertensão [18].

Complicações microvasculares

As complicações tardias do DM2 incluem as complicações microvasculares. As principais complicações microvasculares, retinopatia e nefropatia são as causas mais importantes de cegueira e do estágio final da doença renal na Europa. Diferentes fatores de risco tais como a duração do diabetes, pressão arterial e controle de lipídios tem sido consistentemente correlacionados com ambas complicações microvasculares do diabetes. Apesar dos esforços para correlacionar os dois principais tipos de complicações microvasculares do DM2, retinopatia e nefropatia, a relação entre elas ainda não foi claramente descrita. Mais estudos prospectivos são necessários para que se avance na definição dos

mecanismos exatos de como essas doenças microvasculares se correlacionam e para que se possam desenvolver métodos preditivos para tais complicações, o que nos permitirá identificar os pacientes em risco, resultando num impacto positivo sobre a qualidade e expectativa de vida dos pacientes [19].

Associação entre diabetes mellitus, obesidade, dislipidemia, hipertensão e esteatose hepática

Estima-se que mais de um bilhão de pessoas em todo o mundo estejam acima do peso ideal, sendo que mais de 300 milhões das quais são clinicamente obesas. Nos Estados Unidos, mais de 60% dos adultos estão com sobrepeso ou obesos e o número de crianças e adolescentes obesos está aumentando dramaticamente. Dada a sua elevada e crescente prevalência, a obesidade atingiu os níveis comparáveis aos de uma pandemia. Infelizmente, a maioria dos sistemas de saúde são baseados no tratamento de doenças causadas por agentes específicos, após a sua manifestação. Entretanto, fica claro que para que se obtenham resultados satisfatórios com obesidade e diabetes serão necessárias as implementações de abordagens profiláticas, que resultem na progressiva redução da incidência, e por conseguinte, na prevalência das doenças. No entanto, nem os governos nem as seguradoras privadas têm implementado ações que enfoquem de forma efetiva tais abordagens. A obesidade é o maior fator de risco para o DM2, não surpreende, portanto, que o aumento da prevalência da obesidade seja acompanhado por um aumento equivalente do número de pessoas com DM2 [20].

A esteatose hepática e a esteato-hepatite são extremamente prevalentes em indivíduos obesos [21]. A esteato-hepatite não alcoólica (*non-alcoholic steatohepatitis* – NASH) faz parte de um espectro de doenças não relacionadas ao alcoolismo que levam ao acúmulo de gordura no fígado (*non-alcoholic fatty liver disease* – NAFLD), sendo caracterizada por esteatose, inflamação hepática e lesão das células do fígado [22]. A perpetuação da inflamação e a lesão irreversível das células do fígado parecem ser os principais eventos que discriminam a esteato-hepatite não alcoólica da esteatose e de outras formas de NAFLD [23]. A resistência à insulina no fígado faz com que haja uma inibição da beta-oxidação dos ácidos graxos e redução da exportação de lipídios, levando ao acúmulo de triglicérides pelos hepatócitos, ou seja, favorecendo o desenvolvimento de esteatose hepática [24]. Se o quadro inflamatório e de resistência à insulina se perpetuarem, ocorrerá a progressão para esteato-hepatite, podendo ainda evoluir para cirrose e carcinoma hepatocelular.

Síndrome metabólica (SM) é um conjunto definido de anomalias cardio-metabólicas que aumenta o risco de um indivíduo para desenvolver doença arterial coronariana (DAC) e doença cardiovascular (DCV). Os componentes chave da SM são intolerância à glicose ou diabetes, obesidade, hipertensão e dislipidemia, especificamente hipertrigliceridemia e baixos níveis de lipoproteína de alta densidade [20].

No mundo ocidental a prevalência da síndrome metabólica na população adulta está se aproximando de um quarto, e é provocada em parte pelo consumo de dietas ricas em calorias e pelo sedentarismo. A síndrome metabólica é

também associada ao distúrbio da homeostase da glicose, ou seja, intolerância à glicose, que é indicativa de insensibilidade à insulina. Tal distúrbio pode ser associado com altos níveis de insulina no sangue - um mecanismo de compensação. Com a progressão da síndrome, há aumento dos níveis de glicose no sangue e diabetes [25].

A síndrome metabólica foi reconhecida como um fator de risco para doença cardiovascular, e está associada à aterosclerose. Esta síndrome também aumenta o risco de acidente vascular cerebral, câncer, artrite e, certamente, para DM2. Mudanças no estilo de vida são a primeira linha de defesa no tratamento da síndrome metabólica, seguida de intervenção farmacológica [25].

Prevenção e tratamento do diabetes mellitus

A perda de peso é um dos objetivos mais importantes no tratamento de pacientes com DM2. Há numerosos estudos que examinam a relação entre o tipo de dieta e a incidência de DM2. O excesso de ingestão calórica e a obesidade predizem o desenvolvimento de diabetes. Estudos de prevenção têm demonstrado que as intervenções do estilo de vida, incluindo modesta redução de peso e atividade física, resultam em uma redução drástica na incidência de diabetes. O Programa de Prevenção do Diabetes demonstrou que pacientes que foram mantidos em um intensivo programa de intervenção no estilo de vida por 3,5 anos apresentaram uma redução de 58% na incidência de diabetes [26].

A redução no risco de DM2 também está associada com dietas ricas em cereais integrais, fibras de cereais e magnésio. A dieta é claramente um fator

importante na prevenção do diabetes, mas pouco se sabe sobre o seu papel no tratamento do DM2 [26].

O controle glicêmico é um alvo fundamental no controle do DM2. O estudo “The United Kingdom Prospective Diabetes Study” (UKPDS) demonstrou que uma diminuição de 1% na hemoglobina A1c (HbA1c) em pacientes com DM2 resultou em uma redução de 21% em qualquer fator relacionado ao diabetes: 21% para mortalidade relacionada com o diabetes, 14% por infarto do miocárdio, e 37% para as complicações microvasculares. Embora o UKPDS tenha realizado controle glicêmico através de medicação, dieta e redução de peso também podem melhorar o controle glicêmico [26].

Não há evidências que sugerem que uma determinada estratégia nutricional é claramente a melhor, e as estratégias nutricionais no controle do diabetes não estão destinadas a ser iguais para todas as abordagens. A estratégia nutricional mais bem sucedida é aquela em que o paciente possa se adaptar e acompanhar a longo prazo [26].

Além do controle alimentar, a prática de atividade física é uma forte aliada na prevenção e tratamento do DM2. Exercício físico aumenta a captação de glicose no músculo esquelético e diversos estudos mostraram que existe forte associação entre a prática de atividade física e a redução do processo inflamatório decorrente da obesidade [27]. Estes dados sugerem ainda que o exercício físico promove melhora da tolerância à glicose e diminuição na resistência à insulina. Portanto, a melhor alternativa é trabalhar com pacientes de forma a seguir uma

estratégia que possa funcionar da melhor forma possível para cada um, levando em conta as preferências alimentares individuais e suas possibilidades físicas.

Tratamento farmacológico

Uma alimentação equilibrada, redução de peso e atividade física são os pontos chave para o tratamento do DM2, mas a obtenção do controle glicêmico ótimo, que é essencial para a prevenção de complicações relacionadas ao diabetes, muitas vezes requer o uso de fármacos com ação antidiabética. Nenhum fármaco atualmente disponível é capaz de corrigir todas as anomalias envolvidas na patogênese do DM2, além disso, a maior parte destes, perde a eficácia depois de alguns anos de evolução da doença [28]. A combinação de terapias e até mesmo a introdução de insulina exógena também raramente conseguem manter o controle dos níveis sanguíneos da glicose e acabam expondo o paciente aos efeitos colaterais, especialmente hipoglicemia e ganho de peso. Isso explica a intensa busca por novos compostos que resultem numa melhor função das células beta e numa resposta mais eficaz à insulina nos tecidos periféricos, além de amenizar os efeitos colaterais provocados pelas drogas disponíveis.

Estimuladores de secreção de insulina

Sulfoniluréias

As sulfoniluréias são a mais antiga classe de antidiabéticos orais e tem dominado o mercado por muitos anos. As sulfoniluréias são hipoglicemiantes orais comumente prescritos para DM2 por estimularem a liberação de insulina pelo

pâncreas. Estes medicamentos são classificados em primeira geração (por exemplo, clorpropamida, tolbutamida) e segunda geração (por exemplo, glibenclamida, glipizida, glimepirida, e gliclazida). Sulfoniluréias de primeira geração são raramente utilizadas atualmente, devido à alta incidência de reações adversas. A segunda geração de drogas possui um perfil mais seguro e são mais potentes do que os agentes de primeira geração [29]. Sulfoniluréias atuam sobre o receptor de sulfoniluréia, um canal de potássio dependente da adenosina trifosfato, estimulando a despolarização das células beta pancreáticas. Isso leva ao fechamento dos canais de potássio, um efeito que é fisiologicamente induzido pelo aumento da razão ATP / ADP resultantes do metabolismo da glicose na célula beta. A redução do efluxo de K^+ despolariza a membrana da célula beta, resultando em uma abertura dos canais de Ca^{++} dependentes de voltagem. O aumento na concentração de Ca^{++} intracelular provoca a exocitose dos grânulos de insulina. Sulfoniluréias também inibem a depuração hepática da insulina. Sulfoniluréias são absorvidas pelo trato gastrointestinal rapidamente, e aparecem no sangue no prazo de 15 minutos após a ingestão, mas têm um tempo de ação prolongado. Sulfoniluréias são metabolizadas principalmente no fígado e os metabólitos são excretados por via renal. As concentrações plasmáticas máximas de sulfoniluréias de segunda geração ocorrerem dentro de 2 a 4 horas após a ingestão e a duração da ação é de 12 a 24 horas [29]. A hipoglicemia é o maior efeito adverso das sulfoniluréias.

Metiglinidas

As características farmacocinéticas das metiglinidas incluem um pico de concentração e tempo de eliminação rápidos após a absorção oral. Isso explica o

fato de a droga ter um efeito mais pronunciado sobre os níveis de glicose pós - prandial e um menor efeito na glicemia de jejum em comparação com as sulfoniluréias [30]. Por causa de sua eliminação quase completamente biliar, repaglinida pode ser utilizada em doentes com insuficiência renal. O mecanismo de ação da repaglinida é semelhante ao das sulfoniluréias, mas a droga tem dois sítios de ligação, um no receptor SUR-1 e outro diretamente sobre Kir 6.2 [31]. O efeito da repaglinida sobre a secreção de insulina parece ser mais fortemente dependente de glicose do que a glibenclamida [32] e o risco de hipoglicemia apresenta pouca ou nenhuma diferença em comparação com as sulfoniluréias [33].

Incretinomiméticos

A busca de terapias novas e eficazes para o DM2 levou à identificação de um novo alvo terapêutico, os hormônios incretinas, que têm a função de mediar a homeostase da glicose através de efeitos sobre a secreção de insulina e glucagon agindo sobre as células beta e alfa pancreáticas respectivamente [34]. GLP1 (glucagon-like peptide-1) e GIP (glucose-dependent insulintropic polypeptide) são hormônios secretados por células enteroendócrinas do intestino em resposta à ingestão de nutrientes. Estes hormônios incretinas, assim chamados porque eles aumentam a secreção de insulina, são reguladores chave da secreção de hormônios das ilhotas pancreáticas, modulando assim a homeostase de glicose. Além disso GLP-1 diminui a secreção de glucagon [34].

Estudos demonstrando que a atividade das incretinas está comprometida no DM2 levaram a investigações de novas modalidades terapêuticas

baseadas na capacidade de regular ou reproduzir a ação das incretinas. Tais compostos podem ser incretinomiméticos, análogos do GLP-1 (isto é, agonistas dos receptores GLP-1), como a exenatida, um análogo de GLP-1 de longa duração, e inibidores da dipeptidil peptidase-IV (DPP-IV), uma enzima ubíqua que rapidamente inativa tanto o GLP-1 quanto o GIP, aumenta os níveis ativos desses hormônios e, com isso, melhora a função das ilhotas e o controle da glicemia no DM2 [34].

Inibidores de DPP-IV (Gliptinas)

Terapias que aumentam as concentrações circulantes de insulina revelaram benefícios no tratamento do DM2. Os inibidores de dipeptidil peptidase (DPP)-IV são uma nova e promissora abordagem para o DM2 que funcionam, pelo menos em parte, como estimuladores indiretos da secreção de insulina. Comprovações clínicas da eficácia dos inibidores da DPP-IV foram obtidas em estudos com ratos deficientes em DPP-IV, que são saudáveis, férteis e tem a função metabólica parcialmente restaurada. A eficácia dos inibidores da DPP-IV é mediada principalmente através da estabilização das incretinas GIP e GLP-1, que tem um papel claro na secreção de insulina dependente de glicose. A infusão contínua e subcrônica (6 semanas) de GLP-1 resultou em profunda e significativa diminuição na glicemia de jejum e HbA1c (1,3%). GLP-1 é rapidamente hidrolisado in vivo gerando um produto inativo, a amida GLP-1, e várias evidências indicam que a DPP-IV é primariamente responsável por esta inativação [35].

Potencializadores da ação da insulina

Biguanidas

Metformina é recomendada como a primeira opção de terapia farmacológica na maioria dos pacientes com DM2. O principal efeito da metformina é a redução da produção hepática de glicose, e em menor extensão melhora a sensibilidade periférica à insulina. No entanto, apesar de cinco décadas de uso clínico, o mecanismo (ou mecanismos) de ação da droga em nível molecular e celular permanece virtualmente desconhecido [36].

Metformina reduz HbA 1c de forma semelhante as sulfoniluréias. Hipoglicemia é rara na ausência de associação com sulfoniluréias, insulina ou glinidas. Sabor metálico e os efeitos colaterais digestivos, particularmente desconforto abdominal, anorexia e diarreia são os eventos adversos mais freqüentemente observados e levam à descontinuação do uso em aproximadamente 5% dos pacientes. Esses efeitos são dose-dependentes e podem ser parcialmente evitados pelo progressivo aumento da dose. Comprometimento da absorção de cobalamina foram relatados, mas raramente leva a anemia franca. Outros efeitos adversos como colestase ou manifestações alérgicas imunes são muito raras. A acidose láctica é o mais grave efeito adverso da terapia com metformina, embora seja muito mais raro (1/30.000 doentes por ano) do que havia sido relatado com fenformina no passado [36]. A superprodução de ácido láctico, provavelmente resulta da ativação do metabolismo não-oxidativo da glicose pelas biguanidas.

Glitazonas

Tiazolidinedionas (TZDs), ou glitazonas, representam uma geração de drogas anti-diabéticas relativamente novas. Elas melhoram a resistência à insulina, uma das anomalias-chave envolvidas na patogênese do DM2, ativando o receptor gama ativado por proliferador de peroxissomo (PPAR-gama), levando a alterações metabólicas fundamentais no tecido adiposo. Rosiglitazona e pioglitazona tem se mostrado eficazes em monoterapia, assim como em terapias de combinação com metformina ou sulfoniluréias, e até mesmo na combinação das três drogas. Elas são geralmente bem toleradas, mas podem provocar retenção de líquidos. A insuficiência cardíaca é uma contra-indicação para o uso de TZDs, assim como administração concomitante de insulina. Além de seu efeito sobre o controle glicêmico, TZDs agem em diversos fatores de risco cardiovascular e podem proteger as células beta pancreáticas da apoptose. O efeito de proteção cardiovascular das TZDs foi recentemente demonstrado com os resultados do “gPROactive Study” e a preservação a longo prazo da função das células beta está atualmente sob fortes investigações [37].

Novo alvo terapêutico para o tratamento do DM2

PGC-1alfa

Apesar da vasta gama de fármacos anti-diabetogênicos, os desafios para as novas drogas sensibilizadoras e estimuladoras da secreção de insulina será oferecer uma eficácia equivalente às drogas disponíveis, com menos efeitos colaterais e maior durabilidade de ação [38].

Dessa forma, passou-se a investigar mecanismos moleculares que estivessem relacionados com o desenvolvimento do DM2, como por exemplo proteínas que controlam a expressão de genes chave da doença [38].

PGC-1alfa (co-ativador 1 alfa do receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma) é uma proteína que apresenta funções tecido específicas e controla diferentes processos celulares como a gliconeogênese e oxidação de ácidos graxos no fígado; biogênese mitocondrial, fosforilação oxidativa e termogênese no tecido adiposo marrom; oxidação de glicose e ácido graxos, captação de glicose, biogênese mitocondrial e fosforilação oxidativa no músculo esquelético [38]. Em razão de PGC-1alfa modular a expressão de genes envolvidos em uma ampla variedade de processos biológicos, logo tornou-se um alvo promissor para o tratamento do DM2.

PGC-1alfa é uma proteína composta por 795 aminoácidos, inicialmente descrita em tecido adiposo marrom e músculo esquelético, através de um sistema duplo híbrido em levedura [39]. Como um coativador de transcrição gênica, o PGC-1alfa possui vários sítios funcionais que permitem sua interação física com fatores de transcrição como PPAR γ , PPAR α , fator de respiração nuclear (NRF), proteína de ligação ao CREB (CBP), fator nuclear de hepatócitos 4 alfa (HNF-4alfa), fator de transcrição *forkhead* 1 (FOXO1), coativador do receptor de esteróides 1 (SRC-1), e fator potencializador de miócitos 2 (MEF-2). Estudos recentes têm relacionado o PGC-1alfa ao controle da captação da glicose e a ação da insulina em fígado e músculo [39-40]. Além disso, dois estudos clínicos revelaram que mutações no gene do PGC-1alfa podem estar relacionadas à resistência à insulina e diabetes [41-42]

O gene *PGC-1alfa* pertence a uma família de co-ativadores da transcrição gênica. Esta família inclui o *pgc-1beta* [43-44] e o *pgc-1 related coactivator* [45]. Genes co-ativadores codificam proteínas ou complexos protéicos, os quais regulam a taxa de transcrição de genes alvo ao interagir com fatores de transcrição [46]. Um co-ativador pode interagir com múltiplos fatores de transcrição, assim como um fator de transcrição com múltiplos co-ativadores [47]. Estudos a respeito da proteína PGC-1alfa identificaram genes alvo que apresentam expressão aumentada devido à ação desta proteína co-ativadora ou devido ao seu recrutamento a esses genes por fatores de transcrição [48].

A proteína PGC-1alfa foi inicialmente identificada como um co-ativador de receptores nucleares que participa no controle da termogênese, respondendo a oscilações do ambiente [49]. Estudos recentes têm revelado ações desta proteína não apenas na termogênese [50], mas também na participação da regulação da gliconeogênese hepática [51] e na regulação da secreção de insulina [52].

PGC-1alfa é um coativador da transcrição gênica que apresenta funções tecido específicas. Análises das funções de PGC-1alfa no tecido adiposo marrom sugerem que uma função essencial de PGC-1alfa é a estimulação do número de mitocôndrias e o metabolismo oxidativo. PGC-1alfa é fortemente expresso no tecido adiposo marrom, coração, fígado, músculo esquelético, rim e cérebro, os quais são tecidos altamente oxidativos. Assim, quando ectopicamente expresso no músculo ou em adipócitos, PGC-1alfa promove aumento no DNA mitocondrial, bem como do grande conjunto de genes nucleares e mitocondriais. Além de sua forte indução da função mitocondrial, a proteína PGC-1alfa modula

outras funções tecido-específicas. Por exemplo, PGC-1alfa é um potente regulador da gliconeogênese e integra múltiplos aspectos da resposta ao jejum no fígado, incluindo a biossíntese do grupo heme. A gliconeogênese é diretamente regulada pela PGC-1alfa através da indução da fosfoenol piruvato carboxiquinase (PEPCK) e da glicose-6 fosfatase e pelo aumento do fluxo do ciclo do ácido tricarboxílico. No músculo esquelético, PGC-1alfa promove a captação de glicose e coordenadamente induz a expressão de genes específicos das fibras musculares esqueléticas tipo I e II. PGC-1alfa induz a expressão de UCP-1 em tecido adiposo marrom regulando assim a termogênese adaptativa [53].

Estudos recentes em modelos animais e em humanos associam a sinalização alterada de PGC-1alfa a intolerância à glicose, resistência à insulina e diabetes. A atividade de PGC-1alfa é bastante aumentada no fígado de indivíduos com DM2 assim como no jejum, potencialmente aumentando a produção hepática de glicose e levando à hiperglicemia. Além disso, PGC-1alfa pode promover resistência à insulina diretamente pela indução de TRB-3, um inibidor da sinalização da Akt, uma importante proteína na via de sinalização da insulina. O mecanismo preciso envolvido no cross-talk regulatório entre a sinalização da insulina e a atividade de PGC-1alfa no estado diabético representa uma área de investigação bastante ativa [38].

Nas células beta pancreáticas, as taxas de síntese de ATP mitocondrial são associadas à secreção de insulina através de canais de K^+ sensíveis a ATP, que controlam a liberação de insulina. Estudos recentes mostraram que a proteína desacopladora mitocondrial 2 (UCP-2) pode participar do controle fisiológico da

secreção de insulina modulando a eficiência mitocondrial e assim, a síntese de ATP [54]. Além disso, a superexpressão de UCP2 em ilhotas pancreáticas leva a falhas na secreção de insulina devido a mecanismos relacionados com etapas dependentes de Ca^{2+} . [55]. O controle da expressão de UCP2 é pouco conhecido, no entanto, estudos recentes mostraram que PGC-1alfa desempenha importante papel nesta regulação [52]. PGC-1alfa também é ativado nas células beta em diversos modelos animais de obesidade e DM2 e a superexpressão de PGC-1alfa impede a despolarização da membrana estimulada por glicose e, conseqüentemente, a secreção de insulina em ilhotas cultivadas [38].

Estudos realizados com animais geneticamente modificados, que não expressam PGC-1alfa, mostraram que estes animais foram protegidos contra resistência à insulina causada pela dieta hiperlipídica [56]. Evidências indicam que a indução da expressão de PGC-1alfa é um evento regulatório crítico, que leva à ativação de vias do metabolismo energético que aumentam a produção de ATP a fim de manter um equilíbrio homeostático do fluxo de energia. Levando-se em consideração a importância dos desarranjos no metabolismo hepático de lipídeos, muito comuns em doenças como NASH e doenças hepáticas relacionadas ao álcool, as vias de regulação de PGC-1alfa representam novos alvos potenciais de terapia para doenças hepáticas [38].

Estudos publicados por nosso grupo revelaram que a inibição parcial da expressão da proteína PGC-1alfa através do uso de um oligonucleotídeo antisense, promove a reversão do diabetes mellitus e da esteatose hepática em camundongos tratados com dieta hiperlipídica. O tratamento com o antisense para PGC-1alfa

promoveu redução dos níveis de glicose e aumento dos níveis de insulina durante o teste de tolerância à glicose, aumento do ritmo de decaimento da glicose durante o teste de tolerância à insulina e aumento do ritmo de consumo de glicose durante o clamp euglicêmico-hiperinsulinêmico. Além disso, a inibição de PGC-1 α promoveu aumento da expressão de IR em fígado e tecido adiposo, e aumento da expressão de Akt em tecido adiposo. O tratamento resultou ainda em aumento da fosforilação em tirosina induzido por insulina do IR em ambos os tecidos e aumento da fosforilação em serina induzido por insulina da Akt em ambos os tecidos. Desta forma, a inibição da PGC-1 α obtida através do tratamento com o antisense para PGC-1 α exerce importante efeito sobre mecanismos moleculares de ação da insulina, favorecendo a atividade deste hormônio em tecidos-alvo [50]

Estudos recentes revelam que em indivíduos primariamente insulino-resistentes, somente uma falha da célula beta pancreática em atender à demanda crescente de insulina na periferia deverá permitir o desenvolvimento do DM2. Portanto, mecanismos farmacológicos que levem a um contínuo ajuste da produção de insulina em situações clínicas nas quais há maior demanda, deverão ser úteis na terapêutica de diabetes mellitus [57]

Sendo a proteína PGC-1 α uma importante co-ativadora de fatores de transcrição, e visto que sua inibição parcial provoca uma melhora geral no quadro de DM2, decidimos investigar os efeitos da inibição de PGC-1 α em modelos animais de obesidade e DM2.

2. Objetivos

Objetivos gerais

Avaliar a propriedade de um composto inibidor da expressão de PGC-1 α quanto a sua capacidade de promover o controle dos níveis de glicose sanguínea em modelos animais de obesidade e diabetes mellitus

Objetivos específicos

Avaliar o efeito do composto inibidor da expressão de PGC-1 α quanto a sua ação no controle de:

- Secreção de insulina
- Ação periférica da insulina
- Esteato-hepatite não alcoólica
- Esteato-hepatite alcoólica

Realizar uma avaliação preliminar sobre a potencial toxicidade do composto

3. Materiais e Métodos

Animais experimentais

Para a realização dos experimentos foram utilizadas quatro diferentes linhagens de animais. Todos foram mantidos em ambiente silencioso, com temperatura controlada, em ciclo de 12 horas de período diurno (das 07:00 às 19:00 horas) e 12 horas de período noturno (das 19:00 às 07:00 horas) mantidos artificialmente.

Ratos machos Wistar com três semanas de idade foram provenientes do Centro de Bioterismo (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas. Estes animais receberam água e ração Purina “*ad libitum*” até atingirem 200g de peso e então foram subdivididos em dois grupos. O primeiro grupo foi mantido sempre em ração Purina e utilizados em alguns experimentos de secreção e ação da insulina, nos quais os animais foram randomicamente divididos para tratamento com PGC-1 α AS ou salina; o segundo grupo passou a ser alimentado com uma dieta líquida (tabela 1) contendo 6,4% do volume de etanol. Após 9 semanas sendo alimentados com essa dieta os animais apresentavam um quadro de esteatose e então foram randomicamente divididos sendo que um grupo recebeu salina e o outro recebeu PGC-1 α AS, ambos por via intraperitoneal.

Neste estudo também foram utilizados camundongos machos Swiss, ob/ob e db/db adquiridos com três semanas de idade. Estes animais foram originalmente importados do Laboratório Jackson e atualmente as linhagens estão estabelecidas no Centro de Bioterismo (CEMIB) da Universidade Estadual de

Campinas. Os camundongos Swiss foram tratados com uma dieta contendo alta proporção de gordura saturada (Tabela 2). Após oito semanas de tratamento com esta dieta os animais desenvolveram diabetes e então foram divididos em dois grupos e tratados com salina ou PGC-1 α AS via intraperitoneal ou via oral, uma vez por dia. Os camundongos ob/ob e db/db tornam-se diabéticos por não produzirem leptina e por não apresentarem o receptor para leptina, respectivamente.

Em todos os experimentos foram seguidas as recomendações do Comitê de Ética em Pesquisa Animal.

Tabela 1. Composição da dieta Lieber-DeCarli

Ingredientes	g/litro de dieta
Caseína	41.4
L-cistina	0.5
DL-metionina	0.3
Óleo de milho	8.5
Azeite de oliva	28.4
Óleo de girassol	2.7
Maltodextrina	25.6
Celulose	10.0
Mistura mineral	8.75
Mistura vitamínica	2.5
Bitartarato de colina	0.53
Goma xantana	3.0
Total	132.18

Acrescentar etanol e completar com água o volume para 1 litro.

Tabela 2. Composição de macronutrientes da dietas

Dieta Controle (Comercial)*			Dieta Hiperlipídica [#]	
Componentes	g/ 100 g	Kcal %	g/ 100 g	Kcal %
Proteínas	20	80	20	80
Carboidratos	62	248	45	180
Lipídios	4	36	35	315
Kcal/ 100 g		364		575

* Comercial, Nuvilab[®]

Modificada para hiperlipídica, contendo 35% de lipídios

Construção dos Oligonucleotídeos (sense e antisense) PGC-1alfa

O programa utilizado para desenhar a sequência do oligonucleotídeo foi o *Gene Runner*, V. 3.05. No banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), foi obtida a sequência dos pares de bases do PGC-1alfa. A sequência escolhida foi testada revelando a capacidade de inibir até 60% da expressão protéica e será aqui denominada PGC1 α AS. A sequência está protegida por patente. Os *primers* foram produzidos pela Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, USA).

O composto foi diluído em tampão TE 10% e salina foi utilizada como veículo para a administração nos animais.

Isolamento de ilhotas e secreção estática de insulina

As ilhotas pancreáticas foram extraídas através do método de digestão com collagenase como descrito previamente [58-59]. Após a extração, as ilhotas foram incubadas em meio de cultura RPMI 2.8 mmol/L de glicose na presença ou não de PGC1 α AS durante 12 horas. Após esta incubação as ilhotas foram lavadas para retirada do excesso de meio de cultura e então pré-incubadas por 45 minutos a 37°C em tampão Krebs-bicarbonato. A solução foi então substituída por tampão contendo glicose 2.8 mmol/L, arginina 30 mmol/L, leucina 30 mmol/L, potássio 30 mmol/L ou glicose 11 mmol/L, e as ilhotas foram incubadas por mais uma hora. O

conteúdo de insulina presente no tampão ao final do período de incubação foi determinado por radioimunoensaio (RIA).

Teste de biodisponibilidade de PGC1 α AS

Para tentar compreender a dinâmica de distribuição de PGC1 α AS, o oligonucleotídio antisense para PGC-1 α foi sintetizado contendo uma base marcada com fluoresceína para que sua distribuição pudesse ser avaliada por fluorometria. Ratos Wistar foram tratados com uma dose única de 2,0 nmol do composto por via intraperitoneal por 24 horas e após esse tempo fragmentos de tecidos foram retirados e preparados para análise fluorimétrica.

Perfusão de fígado *in situ*

O sistema de perfusão do fígado é composto por reservatórios para o líquido de perfusão, uma bomba peristáltica e um oxigenador de membrana, acoplados a um banho-maria com bomba de circulação externa de água aquecida e um cilindro com mistura carbogênica ($O_2/CO_2=95/5\%$). O líquido de perfusão (tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato – tampão KH) é impulsionado pela bomba peristáltica em direção ao oxigenador. Neste local se processam as trocas gasosas. O O_2 e o CO_2 contidos na atmosfera carbogênica ($95\%O_2 / 5\% O_2$), por troca passiva, passam para o líquido de perfusão que circula no interior dos tubos de borracha silicone. A fina espessura da parede destes tubos, seu pequeno diâmetro e o seu comprimento total (grande área de secção transversa) favorecem as trocas.

Para a perfusão do fígado os animais, previamente anestesiados, foram fixados em mesa cirúrgica e a veia porta canulada sob baixo fluxo, aproximadamente 10 mL/minuto e, imediatamente após a canulação, os vasos abdominais abaixo do fígado foram seccionados havendo completo escoamento do sangue deste órgão. Para que a passagem do líquido de perfusão ficasse restrito ao fígado, a veia cava inferior, acima do diafragma foi ocluída, enquanto a veia cava inferior (porção infra-hepática) foi canulada para a coleta do líquido efluente.

Após os 20 minutos iniciais de perfusão para a estabilização do consumo de oxigênio, amostras do perfusado foram coletadas em intervalos de 5 minutos para a determinação de parâmetros bioquímicos. Durante este período a perfusão do fígado foi realizada do seguinte modo: 10 minutos com o tampão KH e 40 minutos com o tampão KH contendo o substrato neoglicogênico L-glutamina 5mM.

Ao final do experimento o fígado foi retirado e pesado para que a produção de glicose por grama de fígado ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) fosse quantificada. A expressão dos resultados em relação ao peso do órgão permite comparações de experimentos nos quais foram empregados fígados com diferentes pesos.

Clamp euglicêmico-hiperinsulinêmico

Após 12 horas de jejum os camundongos Swiss tratados com PGC1 α AS foram submetidos ao clamp euglicêmico-hiperinsulinêmico. Os animais foram anestesiados com um mix de ketamina (100mg) e diazepam (0,07mg) (0,2 ml/100 g de peso corpóreo) e um cateter de polietileno foi inserido na artéria femoral para a infusão de insulina e glicose. Um segundo cateter de polivinil foi inserido na

veia femoral para as coletas de sangue e o animal foi mantido em uma superfície aquecida (37°C) durante a realização do experimento. Na primeira fase do estudo (30 min), uma dose de insulina foi infundida em uma taxa de $3,6 \text{ mU kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ para alcançar o estado estacionário das concentrações de insulina plasmática. Após o equilíbrio da glicose, a infusão de insulina foi mantida por 2 h em uma taxa constante, sendo a infusão de glicose ajustada para manter a concentração de glicose no soro aproximadamente 6,6 mmol/L.

Teste de Tolerância à Glicose (GTT).

Ao final do período experimental de 5 dias de tratamento com PGC1 α AS foi realizado um teste de tolerância à glicose. Após um jejum overnight, os camundongos foram anestesiados e feita uma coleta de sangue (tempo 0), a seguir, foi administrada via intraperitoneal uma solução com 20% de glicose (2,0 g/kg de peso corpóreo). Amostras de sangue foram coletadas da cauda nos tempos de 30, 60, 90 e 120 min para a determinação de glicose.

Real Time – PCR

A extração de RNA total do fragmento de fígado foi feito segundo método do reagente Trizol (Invitrogen Corporation, CA, USA). Para a produção do cDNA, foi utilizado o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A concentração ótima de cDNA e *primers*, bem como a eficiência máxima de amplificação foram obtidos através da construção de uma curva padrão a partir do logaritmo da concentração das amostras pelo Ct

[*Threshold Cycle*: ciclo em que cada curva de amplificação atravessa o limiar de detecção (*Threshold*), o qual é definido arbitrariamente]. Nessa curva, foram obtidos os valores da inclinação (*slope*) da curva e da confiabilidade das réplicas (R2). Dessa forma, a eficiência do um sistema foi calculada através da fórmula: $E = 10^{(-1/slope)} - 1$. Para a placa de validação dos genes, foram feitas triplicatas de uma amostra de cDNA em 7 concentrações diferentes (diluições seriadas de 5x). Os *primers* foram adquiridos pela Applied Biosystems. Para o gene PGC-1alfa foi enviada uma sequência de mRNA para a empresa, sendo que esta construiu um par de *primers* e sonda específico para este gene. A região em que foram construídos os *primers* e sonda específicos para o gene PGC-1alfa foi 913 – 1933pb da sequência NM_031347 - NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Utilizamos também o *primer* para a PEPCK Rn 01529014_m1 e como controle endógeno da reação utilizamos o gene GAPD Part number 4352338E. Os valores da expressão gênica relativa foram obtidos pela análise dos resultados no programa *7500 System SDS Software* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Western Blot

Fragmentos de tecidos dos animais foram extraídos e submetidos à homogeneização em 1,0 ml de tampão de extração de proteínas [1% Triton-X 100, 100 mmol/l Tris-HCl (pH 7.4), 100 mmol/l pirofosfato de sódio, 100 mmol/l fluoreto de sódio, 10 mmol/l EDTA, 10 mmol/l ortovanadato de sódio, 2,0 mmol/l PMSF, 0,2 mg/ml aprotinina] à 4°C. Os fragmentos celulares foram centrifugados por 30 minutos; 11.000 rpm; 4° C, para remoção do material insolúvel e o sobrenadante foi

utilizado para o ensaio. A determinação do conteúdo de proteínas totais foi realizada pelo método de biureto e a leitura foi feita em espectrofotômetro, com comprimento de onda de 540 nanômetros.

O ensaio de imunoblotting foi realizado conforme descrito previamente [60]. O extrato protéico obtido de cada tecido foi separado por SDS-PAGE, transferido para membranas de nitrocelulose e blotados com anti-PGC1alfa e anti-PEPCK.

Histologia

Fragmentos do fígado de aproximadamente 1,0 cm³, foram retirados e colocados em um frasco contendo formol a 10%, por 24 horas para adequada fixação. Posteriormente, esses fragmentos foram processados com álcool em crescentes concentrações (70%, 80%, 95% e 100%), xilol, e parafina e inclusos em blocos de parafina que foram seccionados em cortes de 4,0 µm e fixados em lâminas de microscopia. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (HE).

Dosagens Bioquímicas

Para as dosagens plasmáticas de colesterol, triglicérides, AST, ALT e fosfatase alcalina foram utilizados os kits para análises bioquímicas da empresa Labtest.

Dosagem de triglicérides no fígado

O conteúdo total de triglicérides no fígado foi extraído pelo método de Bligh and Dyer [61] e quantificado com o uso do reagente para triglicérides (Labtest).

Análise estatística

Os dados foram expressos como média $\pm$ EPM para o número de animais e de amostras (n) indicados. A análise estatística foi realizada pelo teste *t* de Student ou ANOVA. Valores com $p < 0,05$ foram considerados significativamente diferentes.

4. Resultados

Fase 1. Avaliação do efeito do composto oligonucleotídico PGC1 α AS sobre a secreção de insulina

Item 1

Avaliação da secreção de insulina por ilhotas pancreáticas isoladas. Para tal, foram preparadas ilhotas pancreáticas de camundongos Swiss com obesidade e diabetes induzidos por dieta hiperlipídica. As ilhotas foram isoladas pelo método da collagenase e mantidas em cultura de curta duração em câmara de cultura à 37°C na presença de PGC-1 α AS nas concentrações de 0,5; 2,0 e 4,0 nmol e então estimuladas com glicose 16,7mM. A concentração de insulina foi determinada por radioimunoensaio. O uso de PGC-1 α AS provocou um aumento na secreção de insulina quando as quantidades utilizadas foram de 2,0 e 4,0 nmol (Figura 1).

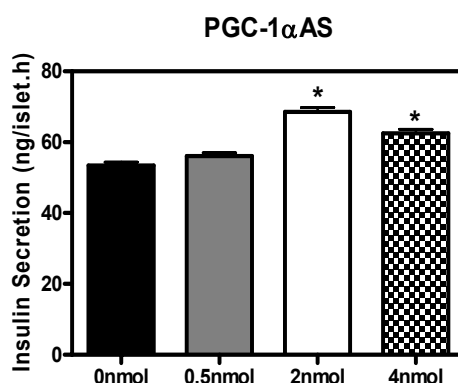


Figura 1. Estudo da secreção estática de insulina em camundongos Swiss não submetidos a tratamento prévio. Um grupo de 5 ilhotas foi mantido em cultura durante 12 horas com PGC-1 α AS nas concentrações de 0,5; 2,0 e 4,0 nmol e então foram estimuladas com glicose 16,7mM. A secreção de insulina foi dosada por radioimunoensaio. * $p < 0,05$ vs. 0nmol. Em todos os experimentos $n = 5$.

Item 2

Avaliação da secreção de insulina *in vivo*. O efeito do composto sobre a secreção de insulina em animais vivos foi avaliado através da determinação da área sob a curva da concentração sanguínea de insulina durante um teste oral de tolerância à glicose. Para tal, ratos Wistar, não obesos e não diabéticos e camundongos Swiss, ob/ob e db/db, todos obesos e diabéticos, foram tratados por vinte dias por via parenteral com o composto de acordo com as doses apresentadas na Tabela 3. Ao final do período, os animais receberam glicose por via oral e amostras de sangue foram colhidas nos tempos apresentados na Tabela 3 para dosagem de insulina. Em ratos Wistar não obesos e não diabéticos o uso de PGC-1 α AS não provoca alterações na secreção de insulina. No entanto, o uso de 2,0 e 4,0 nmol provocou aumento na secreção de insulina nos 3 modelos animais de obesidade e diabetes utilizados.

Tabela 3. Avaliação da secreção de insulina *in vivo* durante GTT. Médias gerais

Modelo animal	Tempo (m) -10	Tempo (m) 0	Tempo (m) 10	Tempo (m) 20	Tempo (m) 40
Wistar (0 nmol)	1,8 $\pm$ 0,2	1,7 $\pm$ 0,2	4,2 $\pm$ 0,5	7,2 $\pm$ 1,2	4,8 $\pm$ 1,0
Wistar (0,5 nmol)	1,9 $\pm$ 0,3	1,7 $\pm$ 0,3	4,0 $\pm$ 0,5	7,1 $\pm$ 1,0	5,2 $\pm$ 1,3
Wistar (2 nmol)	2,0 $\pm$ 0,4	1,8 $\pm$ 0,5	4,8 $\pm$ 0,4	7,7 $\pm$ 1,3	5,8 $\pm$ 0,9
Wistar (4 nmol)	1,8 $\pm$ 0,3	1,6 $\pm$ 0,2	4,6 $\pm$ 0,6	7,8 $\pm$ 0,9	6,1 $\pm$ 1,5
Swiss (0 nmol)	3,3 $\pm$ 1,2	3,4 $\pm$ 1,0	6,2 $\pm$ 0,5	7,3 $\pm$ 1,0	4,9 $\pm$ 0,6
Swiss (0,5 nmol)	3,1 $\pm$ 0,9	3,7 $\pm$ 0,9	6,8 $\pm$ 0,9	9,1 $\pm$ 1,6	5,6 $\pm$ 1,7
Swiss (2 nmol)	3,4 $\pm$ 0,6	3,2 $\pm$ 0,6	7,3 $\pm$ 1,1	<u>10,4$\pm$1,5</u>	<u>6,4$\pm$0,9</u>
Swiss (4 nmol)	3,2 $\pm$ 0,7	3,3 $\pm$ 0,5	<u>7,5$\pm$0,7</u>	<u>11,0$\pm$1,7</u>	<u>6,9$\pm$1,0</u>
obob (0 nmol)	6,5 $\pm$ 1,0	6,0 $\pm$ 1,1	8,2 $\pm$ 0,9	8,8 $\pm$ 1,2	6,0 $\pm$ 0,7
obob (0,5 nmol)	6,4 $\pm$ 0,9	6,7 $\pm$ 0,9	8,8 $\pm$ 0,9	10,1 $\pm$ 1,3	5,8 $\pm$ 1,3
obob (2 nmol)	6,7 $\pm$ 1,1	6,2 $\pm$ 0,7	9,3 $\pm$ 1,4	<u>11,4$\pm$1,3</u>	6,6 $\pm$ 0,9
obob (4 nmol)	6,6 $\pm$ 0,9	6,3 $\pm$ 0,8	<u>10,5$\pm$0,8</u>	<u>13,1$\pm$1,3</u>	7,1 $\pm$ 1,2
dbdb (0 nmol)	2,3 $\pm$ 0,2	3,1 $\pm$ 0,5	4,2 $\pm$ 0,5	6,3 $\pm$ 1,3	4,4 $\pm$ 0,4
dbdb (0,5 nmol)	3,1 $\pm$ 0,4	3,2 $\pm$ 0,5	<u>10,8$\pm$1,9</u>	<u>11,0$\pm$1,3</u>	4,6 $\pm$ 1,0
dbdb (2 nmol)	2,4 $\pm$ 0,4	3,0 $\pm$ 0,4	<u>10,9$\pm$1,1</u>	<u>11,4$\pm$1,2</u>	<u>8,4$\pm$0,7</u>
dbdb (4 nmol)	2,2 $\pm$ 0,3	2,3 $\pm$ 0,5	<u>11,5$\pm$1,7</u>	<u>13,1$\pm$1,6</u>	<u>7,9$\pm$1,0</u>

Resultados em ng/ml (plasma). Sublinhado p<0,05 vs. dose 0 nmol do mesmo tempo. N=5.

Item 3

Mecanismos envolvidos no controle da secreção de insulina pelo bloqueio da expressão de PGC-1 α . Para avaliar os mecanismos envolvidos no controle exercido pelo composto oligonucleotídico antisense PGC-1 α sobre a secreção de insulina, ilhotas pancreáticas isoladas foram tratadas com glicose, arginina, leucina e potássio na presença ou não do composto. A secreção de insulina é modulada por tais compostos por mecanismos diferentes de tal forma que, ocorrendo modificação do padrão secretório na presença de PGC-1 α AS nos ofereceria pistas a respeito do mecanismo envolvido.

Como apresentado na Figura 2, o uso de PGC-1 α AS não provoca alterações na secreção de insulina independentemente do estímulo recebido.

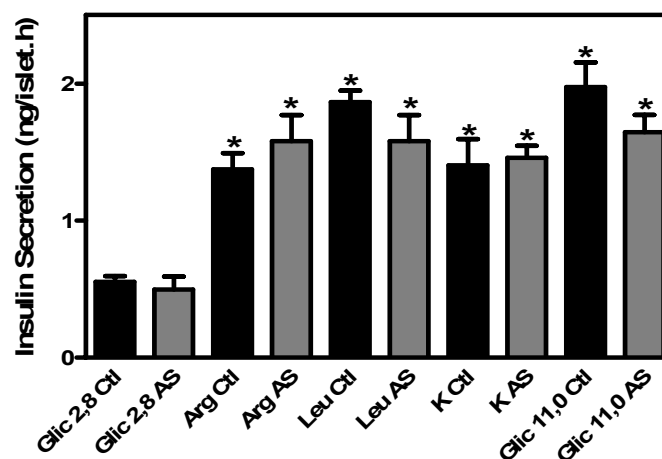


Figura 2. Secreção de insulina em ilhotas de ratos Wistar não submetidos a tratamento prévio. As ilhotas pancreáticas desses animais foram extraídas e incubadas em meio de cultura por 12 horas na presença ou não de 2nmol PGC-1 α /AS e então estimuladas com glicose, potássio e os aminoácidos leucina e arginina. A insulina foi dosada pelo método de radioimunoensaio. *p<0,05 vs. gli 2,8 ctl e gli 2,8 AS. Em todos os experimentos n = 12.

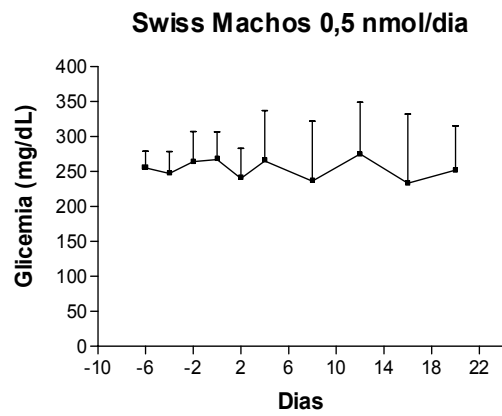
Conclusões parciais relativas à Fase 1 - O composto oligonucleotídico antisense PGC-1 α aumenta a secreção de insulina tanto em ilhotas pancreáticas isoladas como em animais vivos apenas nas situações nas quais o quadro de diabetes mellitus está instalado. Em ilhotas de animais não diabéticos e mesmo em animais vivos não diabéticos o composto não apresenta efeito estimulador sobre a secreção de insulina.

Fase 2. Avaliação do efeito do composto oligonucleotídico antisense PGC-1 α sobre a ação da insulina em tecidos periféricos

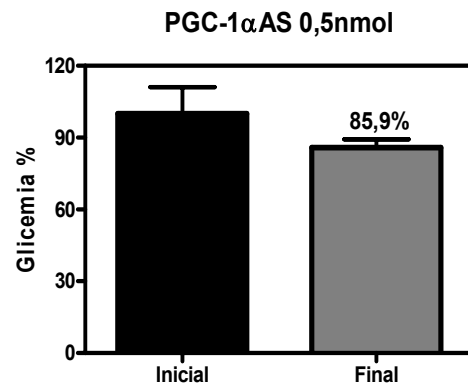
Item 1

Efeito do composto utilizado por via parenteral (ip) sobre a concentração sanguínea de glicose. Camundongos Swiss, ob/ob e db/db, obesos e diabéticos, foram tratados com o composto por via parenteral, por 0 a 20 dias de acordo com as doses apresentadas nas respectivas figuras. O uso de 0,5 nmol/dia de PGC-1 α /AS não provocou alteração na glicemia destes animais (Figuras 3 - 5 a, b), entretanto 2,0 nmol e 4,0 nmol/dia provocaram redução da glicemia de aproximadamente 50% em camundongos Swiss (Figura 3 c, d, f, g) e camundongos ob/ob (Figura 4 c, d, f, g). Em camundongos db/db observou-se que mesmo com 1,0 nmol/dia de PGC-1 α /AS houve grande redução da glicemia (Figura 5 c, d). A queda na glicemia torna-se acentuada após quatro dias de tratamento em camundongos ob/ob e Swiss. Ocorreu um padrão de resposta dose e tempo dependente.

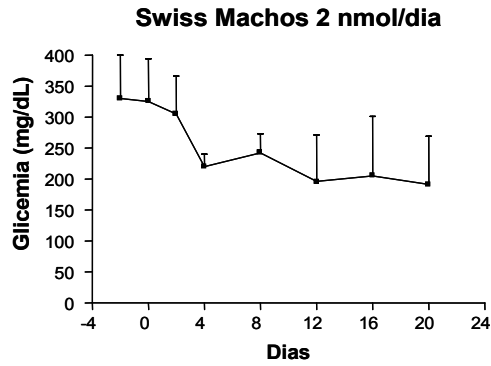
a.



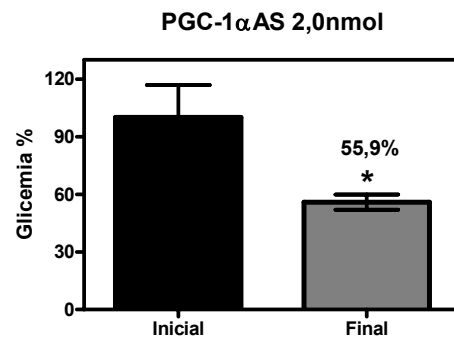
b.



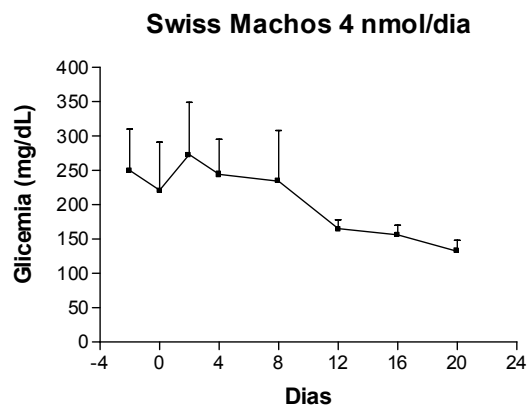
c.



d.



e.



f.

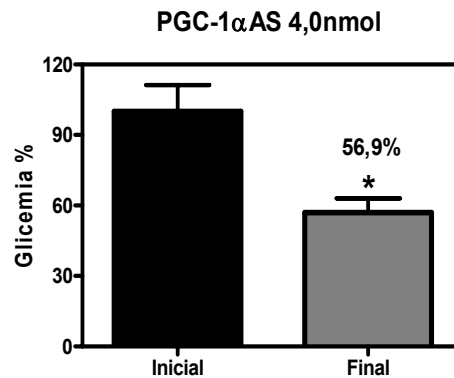
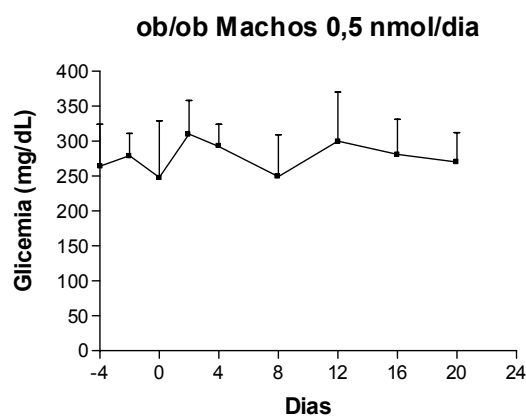
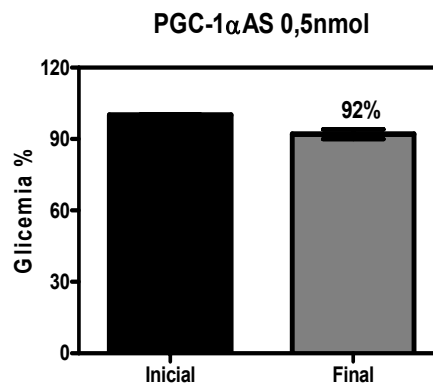


Figura 3. Análise do efeito de doses crescentes de PGC-1αAS sobre a glicemia de camundongos Swiss machos com obesidade e diabetes induzidos por dieta rica em lípidos. O tratamento com PGC-1αAS foi iniciado quando estes animais atingiram glicemia igual ou superior a 250mg/dl. Os camundongos receberam injeções intraperitoneais diárias de 0,5nmol de PGC-1αAS (a, b) durante 20 dias. Depois passaram por um período de recuperação de 20 dias e o tratamento com PGC-1αAS foi reiniciado com 2nmol (c, d) e posteriormente com 4nmol (e, f). As porcentagens de redução da glicemia referentes às doses utilizadas também estão graficamente apresentadas (b, d, f). * $p < 0,05$ vs. tempo 0 do mesmo tratamento. Em todos os experimentos $n = 5$.

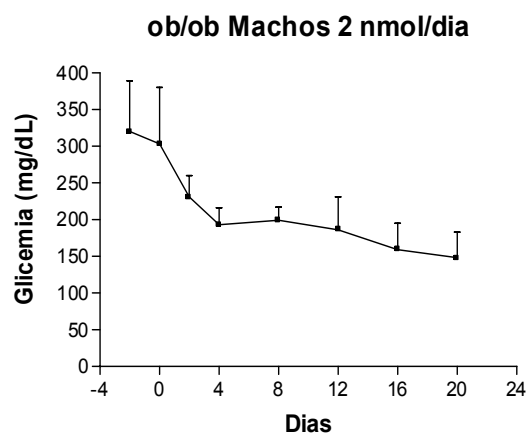
a.



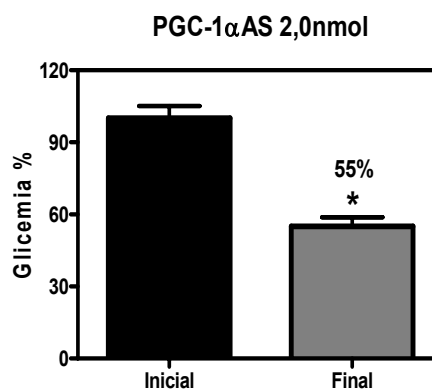
b.



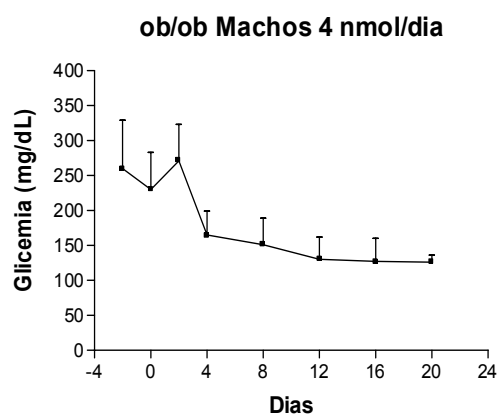
c.



d.



e.



f.

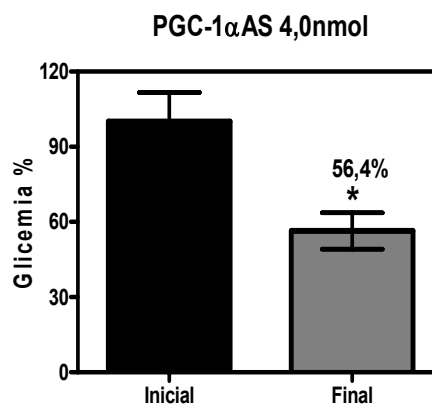
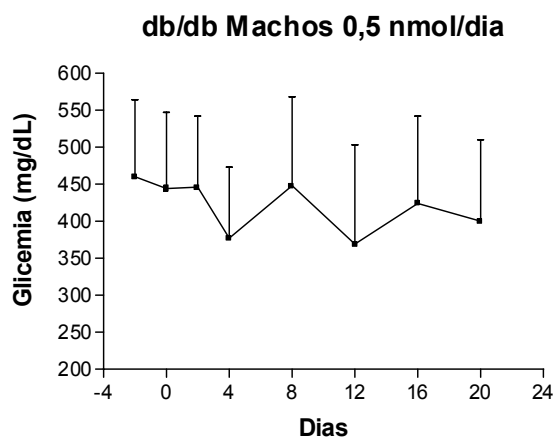
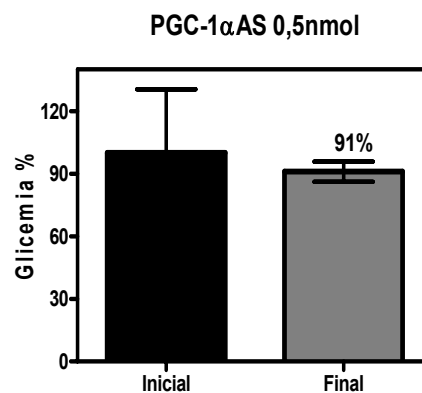


Figura 4. Análise do efeito de doses crescentes de PGC-1αAS sobre a glicemia de camundongos ob/ob machos com obesidade e diabetes. O tratamento com PGC-1αAS foi iniciado quando estes animais atingiram glicemia igual ou superior a 250mg/dl. Os camundongos receberam injeções intraperitoneais diárias de 0,5nmol de PGC-1αAS (a, b) durante 20 dias. Depois passaram por um período de recuperação de 20 dias e o tratamento com PGC-1αAS foi reiniciado com 2nmol (c, d) e posteriormente com 4nmol (e, f). As porcentagens de redução da glicemia referentes às doses utilizadas também estão graficamente apresentadas (b, d, f). * $p < 0,05$ vs. tempo 0 do mesmo tratamento. Em todos os experimentos $n = 5$.

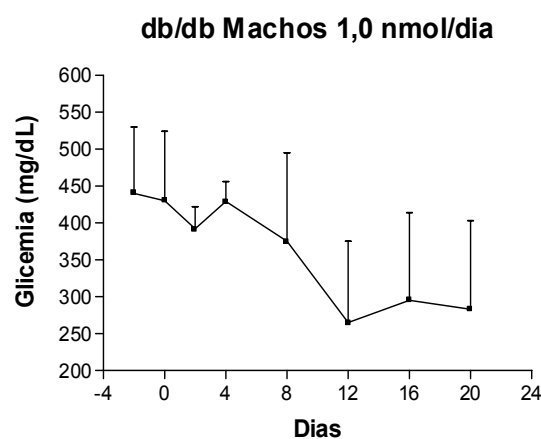
a.



b.



c.



d.

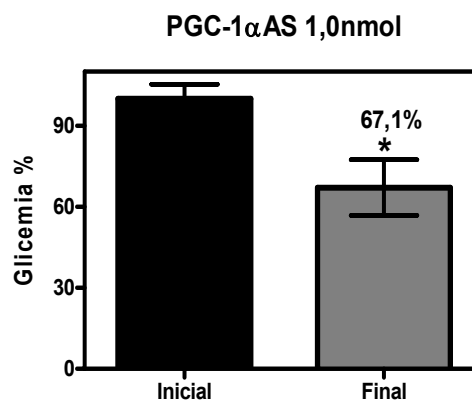


Figura 5. Análise do efeito de doses crescentes de PGC-1 α /AS sobre a glicemia de camundongos *db/db* machos com obesidade e diabetes. O tratamento com PGC-1 α /AS foi iniciado quando os animais atingiram glicemia igual ou superior a 250mg/dl. Os camundongos receberam injeções intraperitoneais diárias de 0,5nmol (a, b) de PGC-1 α /AS durante 20 dias. Depois passaram por um período de recuperação de 20 dias e o tratamento com PGC-1 α /AS foi reiniciado com 1nmol/dia (c, d). As porcentagens de redução da glicemia referentes às doses utilizadas também estão graficamente apresentadas (b, d). * $p < 0,05$ vs. tempo 0 do mesmo tratamento. Em todos os experimentos $n = 5$.

Item 2

Efeito de uso prolongado do composto administrado por vias parenteral e enteral. Camundongos Swiss, obesos e diabéticos foram tratados com 2,0 nmol/dia do composto, por 40 dias. A avaliação da concentração de glicose sanguínea foi realizada a cada 5 dias. Os resultados apresentados nas figuras 6 e 7 mostram que uso de PGC-1 α AS por 40 dias provoca redução da glicemia de forma semelhante ao tratamento de 20 dias, fazendo com que os níveis de glicose sanguínea fiquem normais ou próximos dos níveis normais.

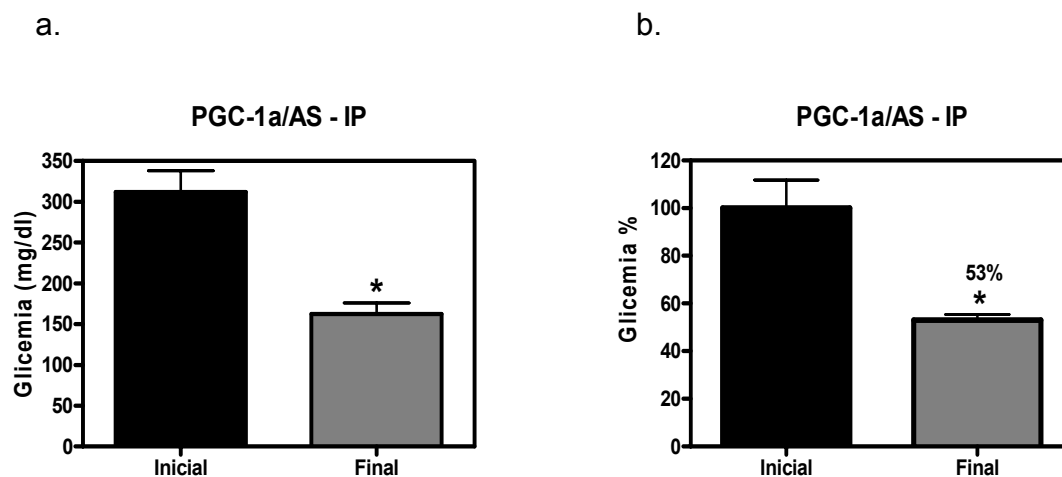


Figura 6. Efeito do uso de 2nmol de PGC-1 α AS, via intraperitoneal durante 40 dias, sobre a glicemia de camundongos Swiss machos com obesidade e diabetes induzidos por dieta rica em lípidos (a). O tratamento com PGC-1 α AS foi iniciado quando estes animais atingiram glicemia igual ou superior a 250mg/dl. Os camundongos receberam injeções intraperitoneais diárias de 2nmol de PGC-1 α AS durante 40 dias sendo a glicemia dosada periodicamente. A porcentagem de redução da glicemia também está graficamente apresentada (b). * $p < 0,05$ vs. glicemia inicial. Em todos os experimentos $n = 5$.

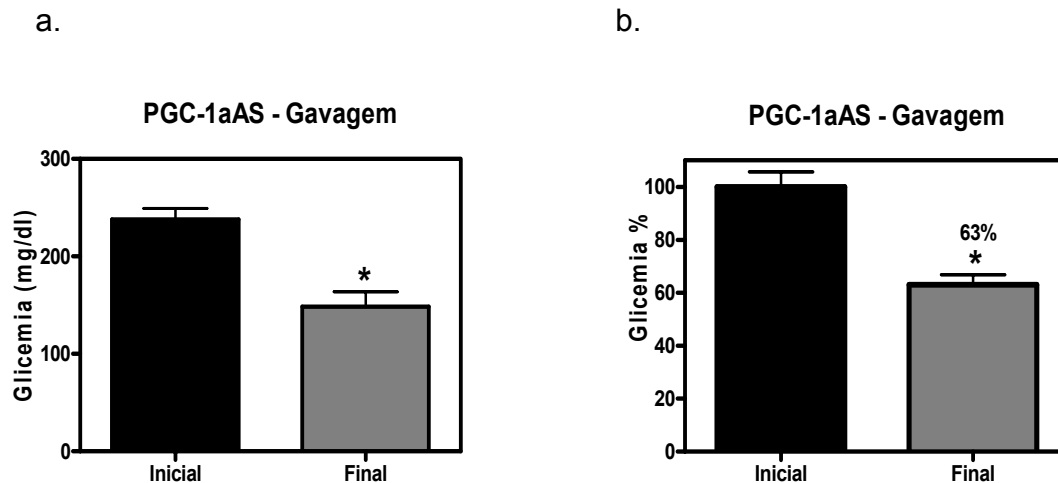


Figura 7. Efeito do uso de 2nmol de PGC-1αAS, via oral durante 40 dias, sobre a glicemia de camundongos Swiss machos com obesidade e diabetes induzidos por dieta rica em lipídeos (a). O tratamento com PGC-1αAS foi iniciado quando estes animais atingiram glicemia igual ou superior a 250mg/dl. Os camundongos foram tratados diariamente com 2nmol de PGC-1αAS durante 40 dias sendo a glicemia dosada periodicamente. A porcentagem de redução da glicemia também está graficamente apresentada (b). * $p < 0,05$ vs. glicemia inicial. Em todos os experimentos $n = 5$.

O tratamento por período prolongado não resultou em qualquer alteração clínica geral dos camundongos. Não houve mortalidade e o comportamento alimentar, a variação de peso a movimentação e outros aspectos comportamentais gerais foram preservados.

Item 3

Clamp euglicêmico-hiperinsulinêmico em animais tratados com o composto. Ao final de cinco dias de tratamento com o composto, os animais foram submetidos a um clamp euglicêmico-hiperinsulinêmico. Para tal, os animais receberam infusão venosa contínua de insulina em dose suficiente para induzir hipoglicemia. Pela veia femoral foi infundida glicose em quantidade suficiente para manter o nível sanguíneo de glicose em 100 mg/dL. O consumo de glicose necessário para manter tal nível de

glicemia durante 1 h de procedimento, é utilizado em calculo que reflete a sensibilidade corporal à insulina. Durante o clamp euglicêmico-hiperinsulinêmico ocorreu um aumento na taxa de consumo de glicose nos animais tratados com PGC-1 α AS (figura 8).

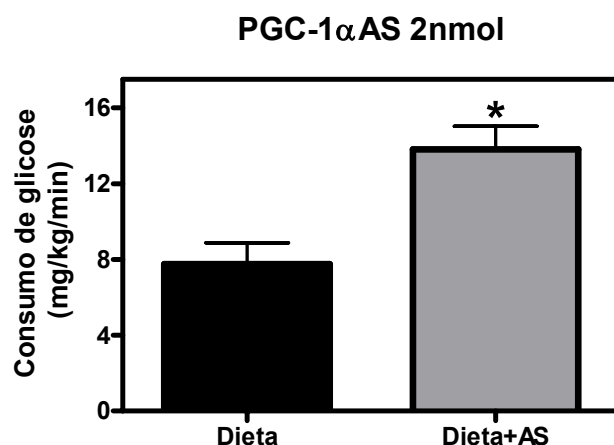


Figura 8. Para o clamp euglicêmico-hiperinsulinêmico um grupo de oito animais foi tratado com 2nmol de PGC-1 α AS e o consumo de glicose ($\text{mg kg}^{-1} \text{min}^{-1}$) foi medido. * $p < 0,05$ vs. Dieta. N=8.

Conclusões relativas à Fase 2 – O uso prolongado do composto tanto por via entereal como parenteral teve resultados semelhantes ao uso por período mais curto. Não foram observados sinais de toxicidade ou modificações comportamentais nos animais tratados com o composto por período prolongado. O clamp euglicêmico-hiperinsulinêmico, método de referência para determinação da sensibilidade à insulina in vivo, confirmou a eficácia do composto.

Fase 3. Avaliação do efeito do Composto oligonucleotídico antisense PGC-1 α sobre a gliconeogênese hepática

Item 1

O efeito de PGC-1 α AS sobre a produção hepática de glicose foi avaliado. Para tal, camundongos Swiss obesos, diabéticos e tratados com PGC-1 α /AS foram submetidos a um processo de perfusão hepática sendo avaliada a produção de glicose estimulada por L-Glutamina. O tratamento com PGC-1 α /AS provocou uma diminuição na produção hepática de glicose quando estimulada por L-Glutamina (Figura 9).

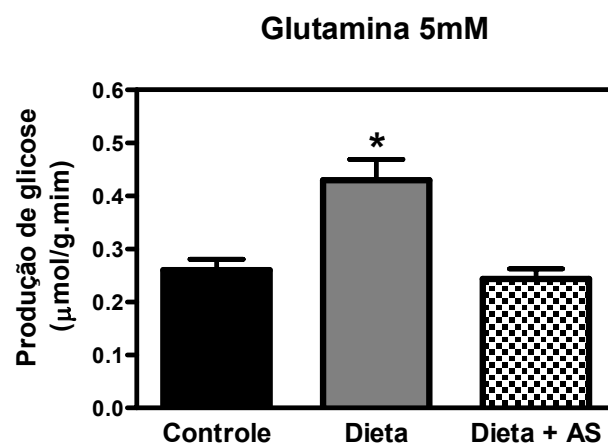


Figura 9. Avaliação da produção de glicose através de perfusão de fígado. L-Glutamina 5mM foi infundido no intervalo entre 10 e 40 minutos. Camundongos Swiss com obesidade e diabetes induzidos por dieta rica em lípidos foram submetidos a jejum de 12 horas. Os animais foram tratados por 5 dias com injeções intraperitoneais de 2nmol de PGC-1 α /AS. * $p < 0,05$ vs. dieta. N=8

Item 2

Avaliação do mecanismo envolvido na redução da produção hepática de glicose pelo composto oligonucleotídeo antisense PGC-1 α . Como o composto reduziu a produção de glicose hepática quando o fígado foi perfundido com L-Glutamina, decidimos avaliar o efeito da inibição da PGC-1 α sobre a expressão da enzima PEPCCK, principal enzima envolvida no processo de gliconeogênese. Para tal, camundongos

Swiss obesos e diabéticos foram tratados por cinco dias com injeções intraperitoneais de 2,0 nmol de PGC-1 α /AS. O fígado foi obtido para preparo do extrato protéico e do mRNA e PEPCK foi avaliada por western blot e real-time PCR. A Figura 10 mostra que o uso de PGC-1 α /AS provoca redução no conteúdo protéico e na expressão do mRNA de PEPCK.

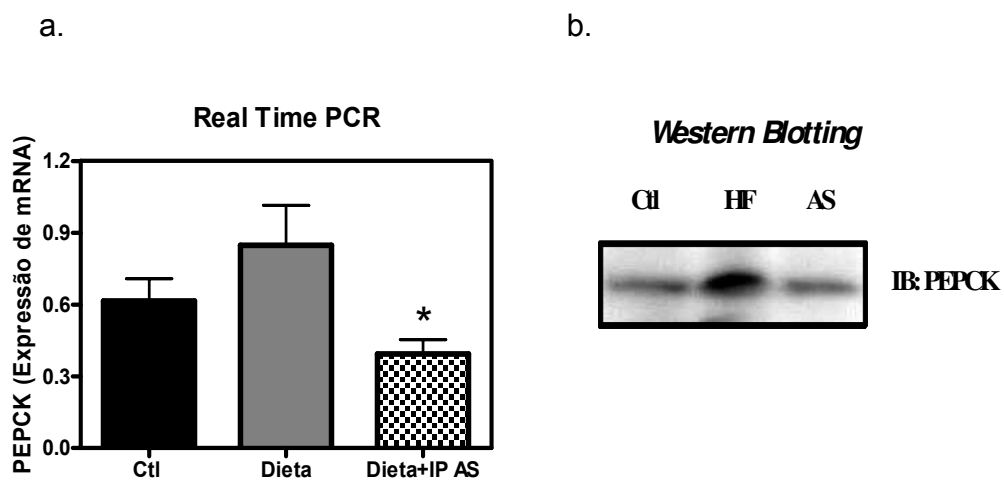


Figura 10. Expressão hepática de PEPCK. Camundongos Swiss com obesidade e diabetes induzidos por dieta rica em lípidos foram tratados por 5 dias com injeções intraperitoneais diárias de 2nmol de PGC-1 α /AS. O conteúdo proteico (a) e a expressão do mRNA de PEPCK (b) foram avaliados. HF=dieta hiperlipídica. *p<0,05 vs. dieta. N=8.

Conclusões relativas à Fase 3 – O composto oligonucleotídeo antisense PGC-1 α reduz significativamente a produção hepática de glicose gerada por um substrato que depende de enzimas mitocondriais para sua metabolização. Tal fato já representa vantagem sobre as tiazolidinodionas (rosiglitazona) que não possui qualquer efeito sobre esse mecanismo indutor de hiperglicemia. O efeito do composto aqui relatado depende, pelo menos em parte de sua ação sobre a expressão da enzima PEPCK.

Fase 4. Avaliação do efeito do composto oligonucleotídico antisense PGC-1 α sobre a esteatose hepática induzida por alimento

Nesta Fase do projeto foram avaliados os efeitos do composto oligonucleotídeo antisense PGC-1 α sobre a esteatose hepática apresentada por modelos animais alimentados por longo tempo com dieta hiperlipídica.

Item 1

Na primeira etapa desta fase, camundongos Swiss com obesidade e diabetes induzidos por dieta hiperlipídica ofertada durante 10 semanas foram tratados por 20 dias com o composto oligonucleotídeo antisense PGC-1 α por via parenteral e ao final do período, fragmentos dos fígado foram obtidos para análise. Macroscopicamente havia clara diferença no volume e coloração do órgão. Enquanto todos os animais que não foram tratados com PGC-1 α AS (tratados apenas com salina) apresentavam fígado volumoso e com coloração amarelada, os camundongos tratados com o composto tinham fígado de tamanho próximo ao normal e com coloração avermelhada. A análise histológica revelou reversão completa da esteatose nos animais tratados com o composto (Figura 11). Tal reversão foi ainda acompanhada da melhora da ação molecular da insulina caracterizada por sua capacidade de induzir a fosforilação e ativação da enzima Akt e pela fosforilação/inativação do fator de transcrição FOXO1 (Figura 12).

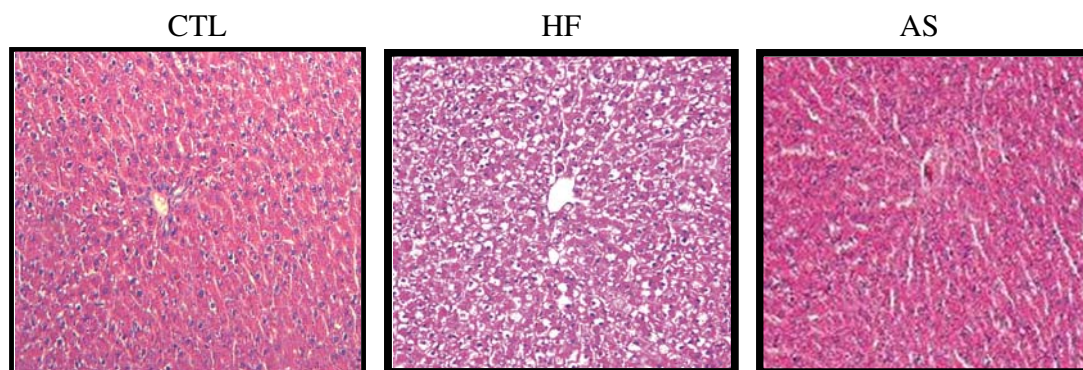


Figura 11. Avaliação histológica (HE) do efeito do tratamento com o composto oligonucleotídeo antisense PGC-1 α sobre a esteatose hepática induzida por dieta. Camundongo Swiss dieta padrão (CTL), dieta hiperlipídica (HF) e dieta hiperlipídica + PGC-1 α /AS (AS) (figura representativa de n = 5). Coloração Hematoxilina Eosina.

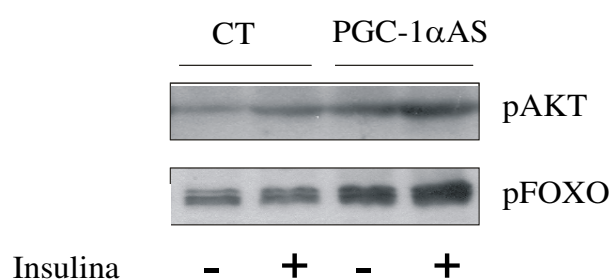


Figura 12. Avaliação do efeito do tratamento com o composto oligonucleotídeo antisense PGC-1 α sobre a fosforilação da akt e da FOXO1 em fígado de camundongos obesos tratados com salina (CT) ou com o composto PGC-1 α AS (n = 5).

Item 2

Como complemento da avaliação dos efeitos do composto sobre o fígado determinamos as concentrações sanguíneas das enzimas hepáticas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) em camundongos Swiss tratados por 40 dias com o composto na dose de 2nmol/dia tanto por via parenteral

como por via oral. Como pode ser notado na Figura 13 o composto não alterou a concentração das enzimas independentemente da via de administração.

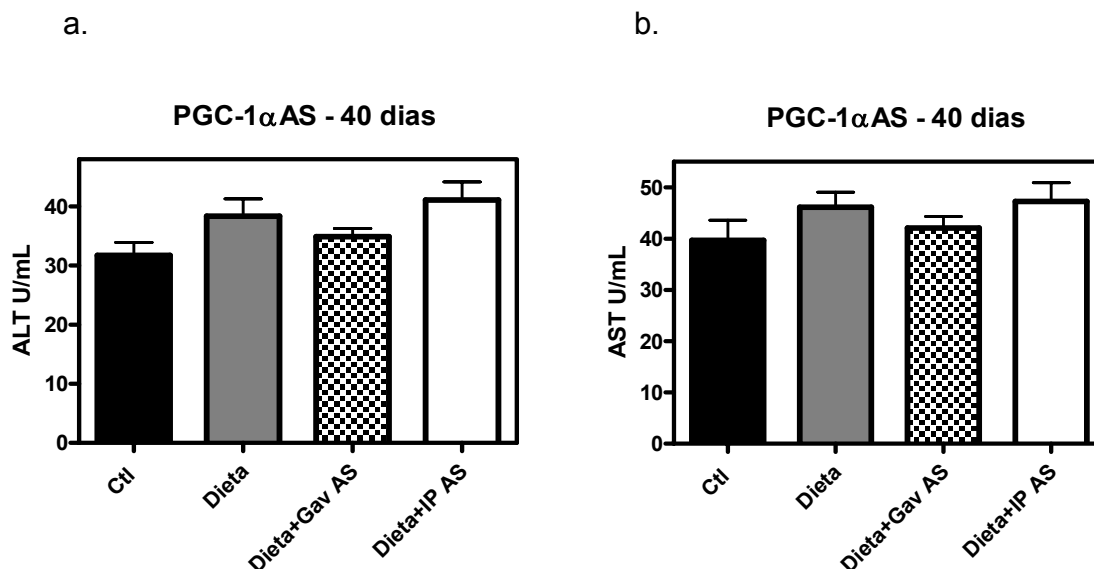


Figura 13. Avaliação das concentrações sanguíneas das enzimas ALT (a) e AST (b) em camundongos Swiss tratados com PGC-1 α AS durante 40 dias via oral (Dieta+Gav AS) e via intraperitoneal (Dieta+IP AS). Em todos os experimentos n = 8.

Item 3

Os efeitos do composto foram ainda analisados através da determinação da concentração sanguínea de colesterol total e triglicérides. Para tal, camundongos Swiss foram tratados por 40 dias com o composto na dose de 2,0 nmol/dia tanto por via parenteral como por via oral. Como pode ser notado na Figura 14 PGC-1 α AS provocou uma redução nos níveis plasmáticos tanto de colesterol como de triglicérides em ambas formas de administração.

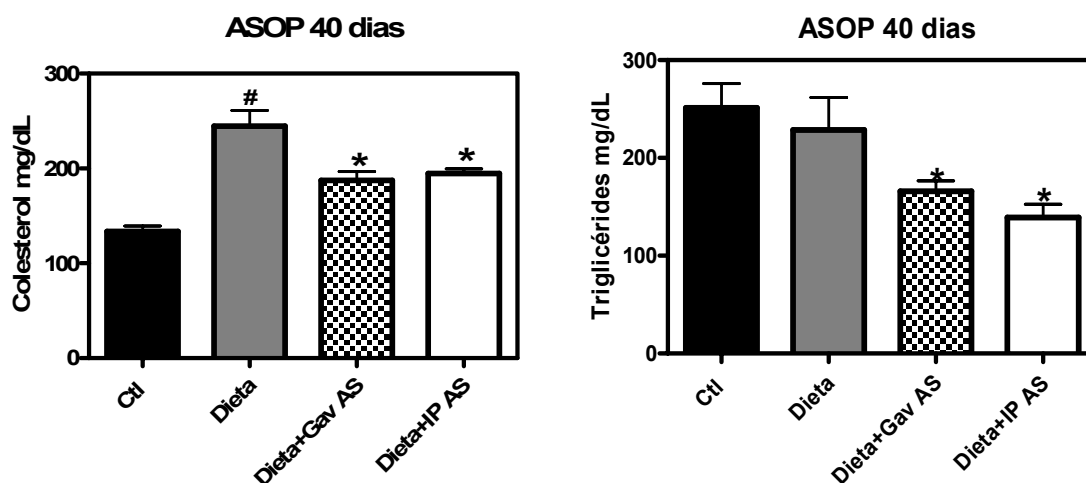


Figura 14. Determinação da concentração sanguínea de colesterol total e triglicérides em camundongos Swiss tratados com PGC-1 α AS durante 40 dias via oral (Dieta+Gav AS) e via intraperitoneal (Dieta+IP AS). * $p < 0,05$ vs. Ctl e Dieta. [#] $p < 0,05$ vs. Ctl. Em todos os experimentos $n = 8$.

Conclusões relativas à Fase 4 – O composto reverte a esteatose hepática em modelo animal de esteatose induzida por dieta. No período avaliado não há alteração dos níveis sanguíneos das enzimas hepáticas AST e ALT refletindo a estabilidade funcional do fígado. Entretanto há uma redução nas concentrações sanguíneas de colesterol total e triglicérides.

Fase 5. Avaliação do efeito do composto oligonucleotídico antisense PGC-1 α sobre a esteatose e cirrose hepáticas induzidas por álcool e outros agentes tóxicos

Como parte dos estudos que visam avaliar a reversibilidade da lesão hepática pelo composto PGC1 α AS, implantamos dois protocolos destinados a induzir esteato-

hepatite tóxica nos modelos animais. O primeiro protocolo utiliza tetracloreto de carbono (CCL_4) e fenobarbital e o segundo protocolo utiliza uma dieta líquida contendo álcool.

Item 1

Para indução da esteato-hepatite tóxica grave, ratos Wistar de 30 dias foram tratados por quatro semanas com fenobarbital (0,4 g/L diluído na água de beber) *ad libitum*. Ao final da segunda semana de tratamento, iniciou-se injeção ip de tetracloreto de carbono (100%) na dose de 0,15 mL/Kg, aplicado duas vezes por semana. Ao final do período de quatro semanas os animais já apresentam lesão hepática moderada/avançada, conforme apresentado na Figura 15.

Nota-se presença de infiltrado linfóide nas regiões perivasculares e grande desorganização do parênquima hepático.

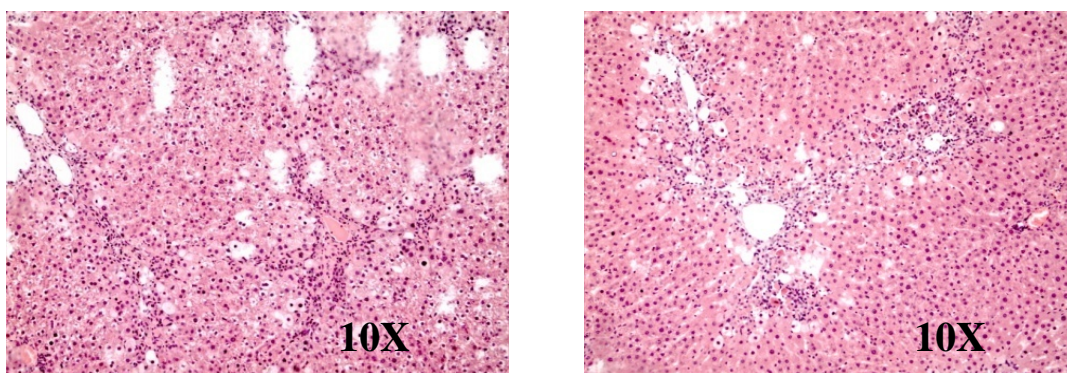


Figura 15. As figuras acima são ilustrativas de fígados de 5 animais tratados com tetracloreto de carbono de acordo com o protocolo acima. Coloração Hematoxilina Eosina.

Apesar do grande dano histológico do fígado causado pelo tratamento com tetracloreto de carbono, a expressão hepática de PGC1- α não se modificou com relação ao controle (Tabela 4), sugerindo que o mecanismo de lesão nessa condição experimental, difere daquela vista na esteato-hepatite induzida por dieta rica em gordura.

Tabela 4. Expressão de PGC1 α , determinado por real-time PCR. Médias gerais.

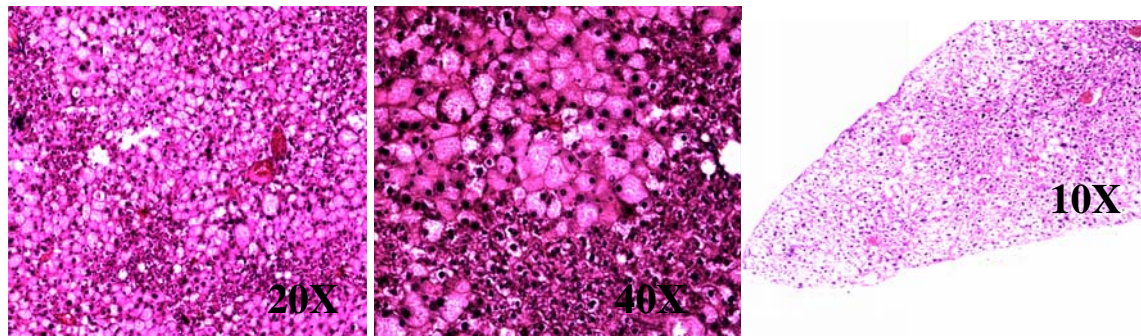
Modelo animal	PGC1 α
Wistar (0 nmol)	0,91 $\pm$ 0,02
Wistar CCL ₄	0,91 $\pm$ 0,04
Wistar CCL ₄ +PGC1 (2,0 nmol)	<u>0,4$\pm$0,04</u>

Resultado em unidades arbitrárias, representativas da quantidade de mRNA de PGC1 α nas amostras analisadas. Sublinhado p<0,05 vs. 0nmol e vs. CCL₄. N = 5.

Item 2

Efeito do tratamento com o composto sobre a lesão hepática causada por tetracloreto de carbono. Amostras representativas de cortes histológicos obtidos de fígados de ratos Wistar tratados com tetracloreto de carbono e submetidos ou não ao tratamento com PGC-1 α AS por 20 dias (Figura 16). De acordo com os resultados histológicos não observou-se modificação importante do padrão de dano hepático induzido pelo CCl₄.

CCL₄



CCL₄+PGC1 α AS (2nmol)

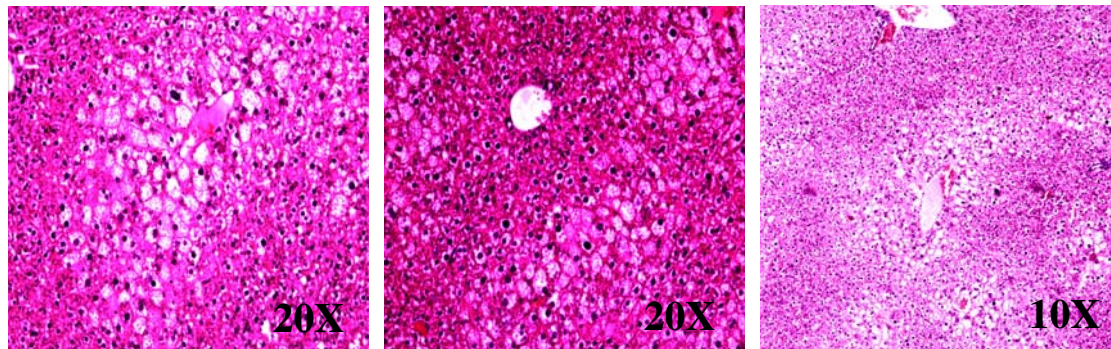


Figura 16. Os cortes apresentados acima são representativos de fígados de um grupo de 7 animais de cada grupo. Após o período de 4 semanas de indução de dano hepático os animais foram tratados com 2nmol de PGC1 α AS por 20 dias (CCL₄+PGC1 α AS). Coloração Hematoxilina Eosina.

Item 3

Para a indução de esteatose alcoólica ratos Wistar de 200g foram alimentados com uma dieta líquida contendo 6,4% de etanol. Após 9 semanas sendo alimentados com essa dieta os animais já apresentavam grande acúmulo de gordura no fígado sendo estabelecido um quadro avançado de esteatose hepática.

Nota-se a presença de grande quantidade de gotículas de gordura no parênquima hepático (figura 17).

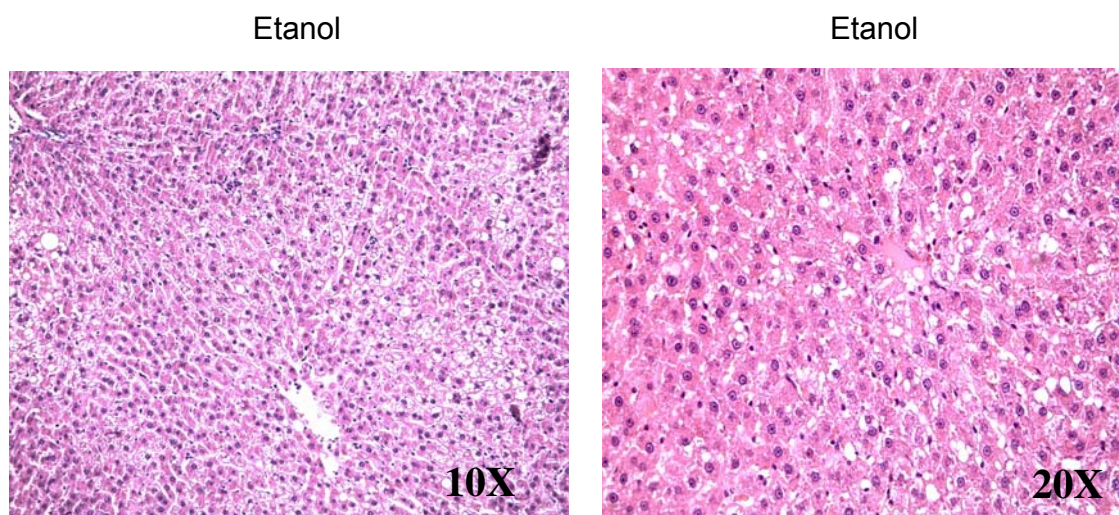


Figura 17. As figuras acima são ilustrativas de fígados de 10 animais tratados com dieta contendo etanol de acordo com o protocolo acima. Coloração Hematoxilina Eosina

Item 4

Efeito do tratamento com o composto PGC-1 α AS sobre a lesão hepática causada por dieta contendo etanol. As amostras representativas de cortes histológicos obtidos de fígados de ratos Wistar tratados com etanol e submetidos ou não ao tratamento com PGC-1 α AS por 2 semanas estão apresentadas na Figura 18.

Nota-se que o uso de PGC-1 α AS provoca reversão total no quadro de esteatose alcoólica.

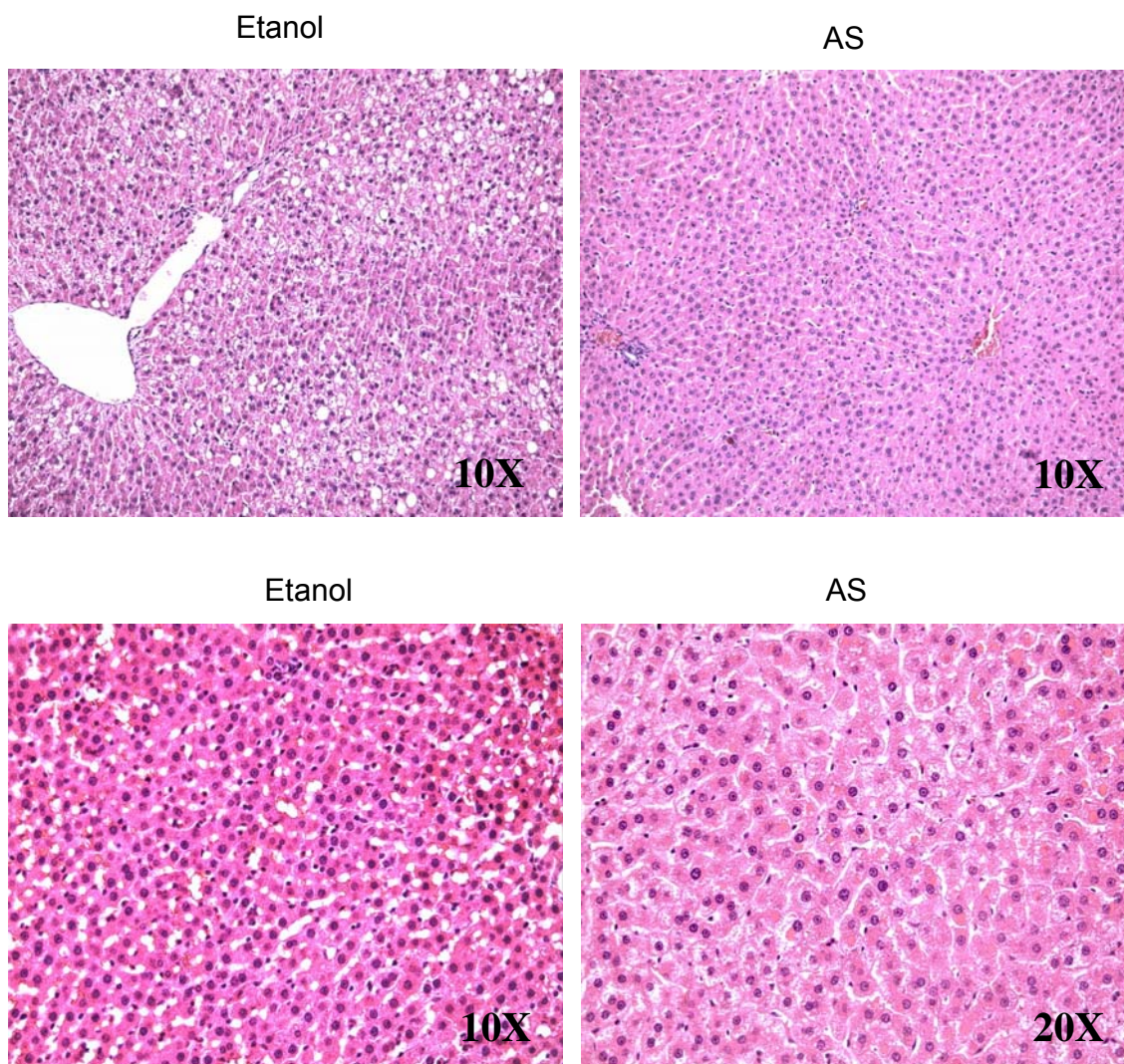


Figura 18. As figuras acima são ilustrativas de fígados de 10 animais tratados com dieta contendo etanol de acordo com o protocolo acima. Após 9 semanas de indução alcoólica da esteatose os animais foram tratados com PGC-1 α AS por 2 semanas (AS). Coloração Hematoxilina Eosina.

Item 5

Determinação do conteúdo protéico e de mRNA de PGC-1 α em ratos Wistar alimentados com dieta contendo etanol. Um fragmento de fígado foi extraído para preparo do extrato proteico e do mRNA e PGC-1 α foi avaliada por western blot e real-time PCR. A Figura 19 mostra que a administração da dieta contendo etanol provoca aumento no conteúdo proteico e na expressão do mRNA de PGC-1 α .

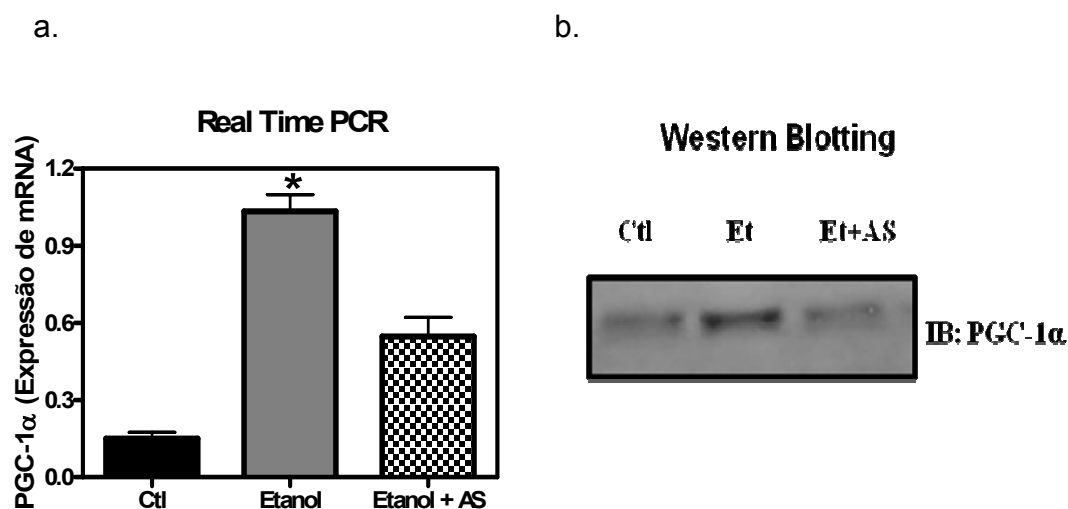
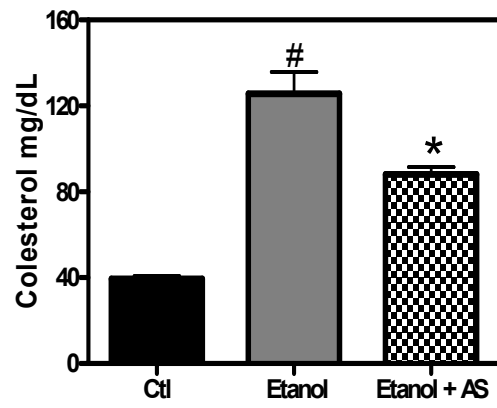


Figura 19. Expressão hepática de PGC-1 α em ratos Wistar alimentados com dieta contendo etanol. Após 9 semanas de indução de esteatose alcoólica os animais foram tratados por 2 semanas com injeções intraperitoneais diárias de 2nmol de PGC-1 α /AS. O conteúdo proteico (a) e a expressão do mRNA de PGC-1 α (b) foram avaliados. Et=etanol. * $p < 0,05$ vs. Ctl e etanol+AS. N=8

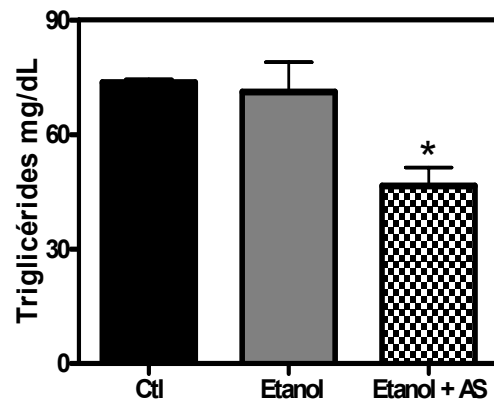
Item 6

Avaliação de parâmetros bioquímicos. As concentrações plasmáticas de colesterol total (Figura 20a), triglicérides (Figura 20b), AST (Figura 20c), ALT (Figura 20d) e fosfatase alcalina (Figura 20e) foram analisadas em ratos Wistar submetidos ao protocolo de indução de esteatose alcoólica. O conteúdo total de triglicérides presente no fígado também foi medido (Figura 20f). Após 9 semanas de dieta os animais foram tratados com PGC-1 α AS durante 2 semanas. Após este período foram colhidas amostras de sangue e fragmentos de fígado para a realização das dosagens bioquímicas. Os resultados das análises mostraram que PGC-1 α AS provocou alterações apenas nas concentrações plasmáticas de colesterol e triglicérides e também no conteúdo total de triglicérides do fígado. Não houve alteração nas concentrações das enzimas hepáticas AST, ALT e fosfatase alcalina.

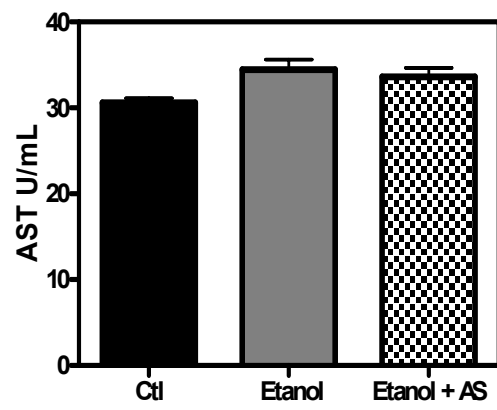
a.



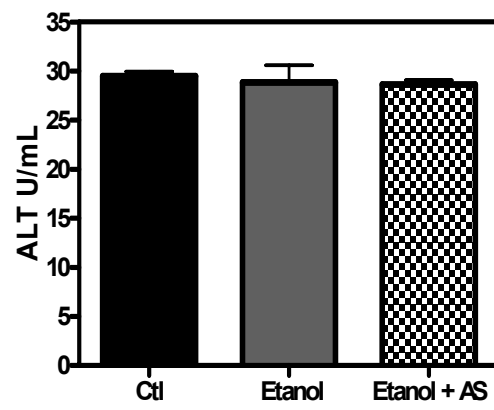
b.



c.



d.



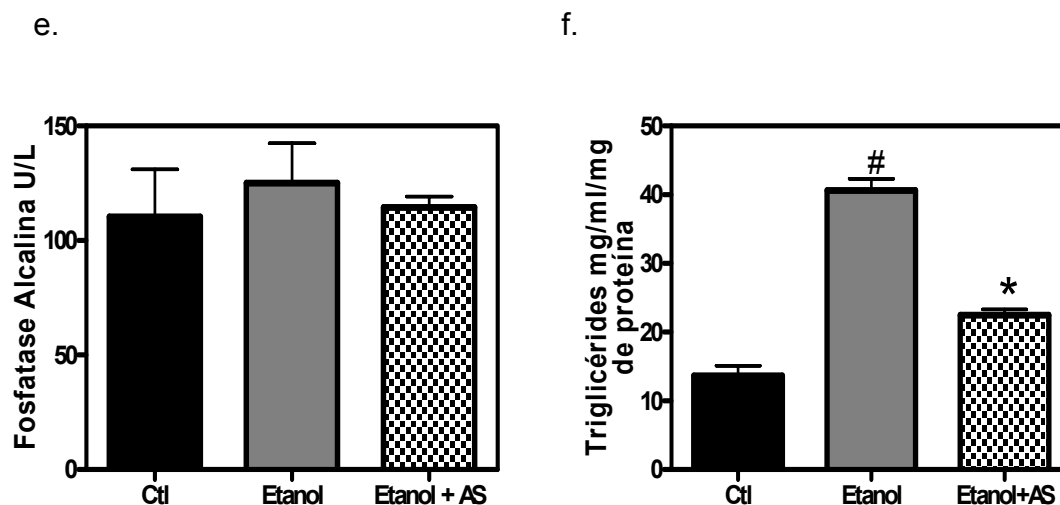


Figura 20. Determinação da concentração sanguínea de colesterol total (a), triglicérides (b), AST (c), ALT (d), fosfatase alcalina (e) e triglicérides hepático (f) em em ratos Wistar alimentados com dieta contendo etanol. Os animais foram tratados com PGC-1 α AS durante 2 semanas (Etanol+AS). * $p < 0,05$ vs. Ctl e etanol. [#] $p < 0,05$ vs. Ctl e etanol+AS. Em todos os experimentos $n = 10$.

Conclusões relativas à Fase 5 – O tratamento com PGC-1 α AS durante 20 dias não reverte o dano hepático causado pelo tratamento com tetracloreto de carbono. Nota-se apenas uma aparente melhora morfológica discreta nos fígados dos animais tratados com o composto, nos quais se observa menor infiltrado inflamatório e discreta redução no depósito de gordura, sugerindo que a inibição da expressão de PGC-1 α nesse modelo de lesão hepática não resulta em melhora funcional. Entretanto, o uso de PGC1 α AS provoca reversão da esteatose hepática provocada pela ingestão de etanol. No período avaliado não há alteração dos níveis sanguíneos das enzimas hepáticas AST, ALT e fosfatase alcalina refletindo a estabilidade funcional do fígado. No entanto há uma redução nas concentrações sanguíneas de colesterol e triglicérides e no conteúdo total de triglicérides hepático.

Fase 6. Estudos de toxicologia e distribuição tecidual do composto

Para tais experimentos o composto oligonucleotídico antisense PGC-1 α foi sintetizado contendo uma base marcada com fluoresceína para que sua distribuição pudesse ser avaliada por fluorometria. Ratos Wistar foram tratados com uma dose única de 2,0 nmol do composto por via oral ou por via intraperitoneal após tempos apresentados Figuras 21 -25 . Os órgãos assinalados nas respectivas figuras foram retirados e preparados para análise fluorimétrica. Um grupo de animais foi tratado por via ip e os órgãos retirados apenas após 6 h do tratamento. A figura 26 apresenta a distribuição de PGC-1 α AS mostrando apenas os pontos de maior concentração do composto em cada um dos tecidos analisados.

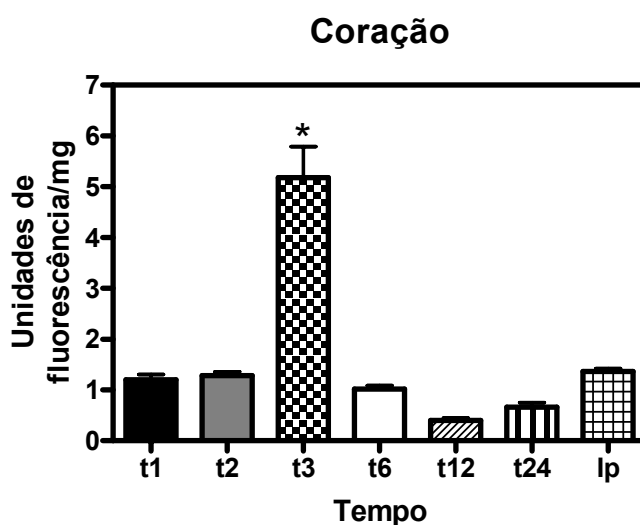


Figura 21. Determinação da presença do composto oligonucleotídico antisense PGC-1 α em coração de ratos tratados com o composto marcado por fluorescência por via oral (1 a 24 h) ou por via ip (6 h). * $p < 0,05$ vs. demais tempos de tratamento. N = 5.

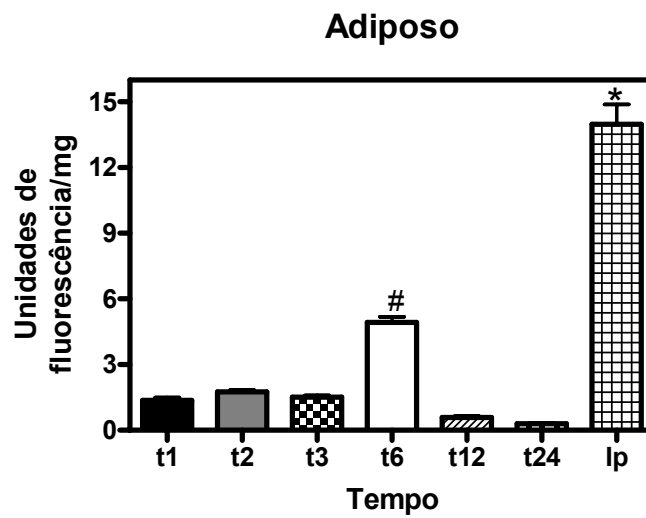


Figura 22. Determinação da presença do composto oligonucleotídico antisense PGC-1 α em tecido adiposo de ratos tratados com o composto marcado por fluorescência por via oral (1 a 24 h) ou por via ip (6 h). * $p < 0,05$ vs. demais tempos de tratamento. N = 5.

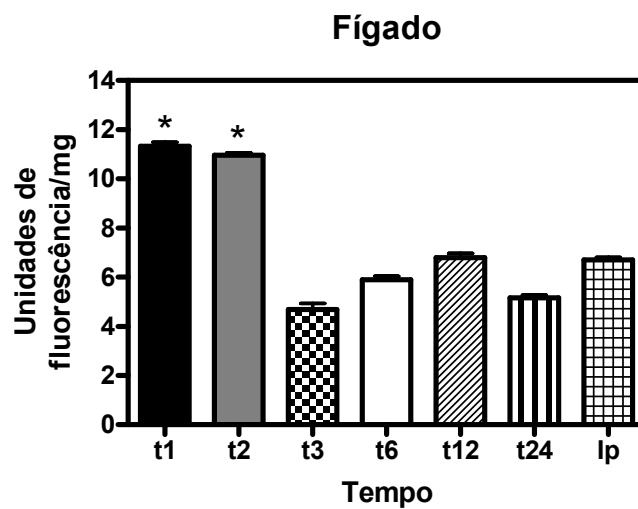


Figura 23. Determinação da presença do composto oligonucleotídico antisense PGC-1 α em fígado de ratos tratados com o composto marcado por fluorescência por via oral (1 a 24 h) ou por via ip (6 h). * $p < 0,05$ vs. demais tempos de tratamento. N = 5.

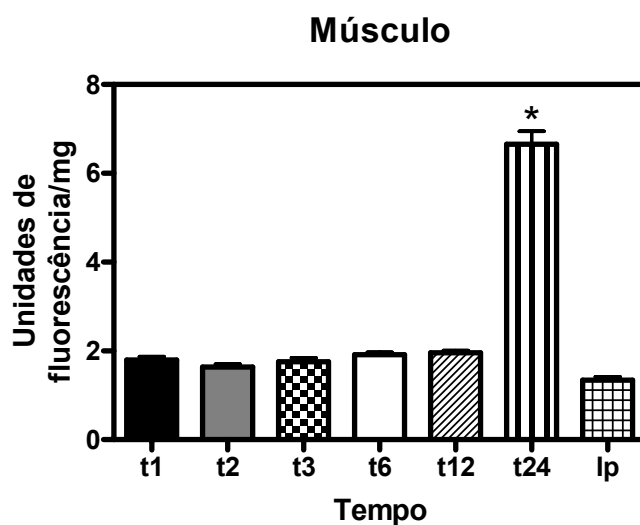


Figura 24. Determinação da presença do composto oligonucleotídico antisense PGC-1 α em músculo de ratos tratados com o composto marcado por fluorescência por via oral (1 a 24 h) ou por via ip (6 h). *p<0,05 vs. demais tempos de tratamento. N = 5.

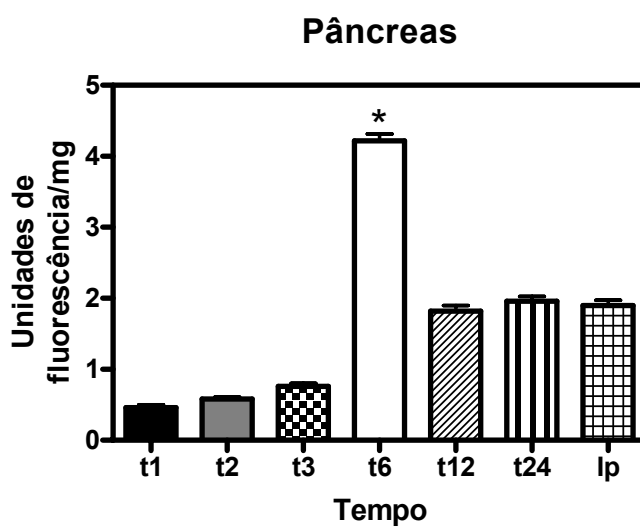


Figura 25. Determinação da presença do composto oligonucleotídico antisense PGC-1 α em pâncreas de ratos tratados com o composto marcado por fluorescência por via oral (1 a 24 h) ou por via ip (6 h). *p<0,05 vs. demais tempos de tratamento. N = 5.

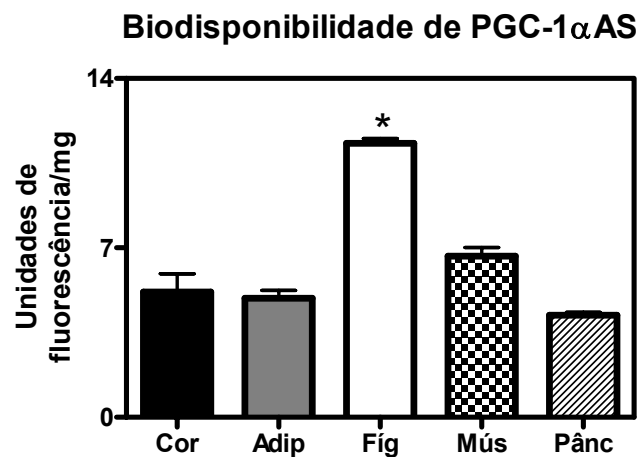


Figura 26. Gráfico representativo da distribuição de PGC-1 α AS mostrando apenas os pontos de maior concentração do composto em cada um dos tecidos analisados. * $p < 0,05$ vs. demais tecidos. N = 5.

Conclusões relativas à Fase 6 – Os resultados das análises fluorimétricas mostram que a distribuição de PGC-1 α AS no tecido adiposo e pâncreas, quando administrado por via oral, atingiu maior pico de concentração após 6 horas da administração. Para coração e fígado o pico de maior concentração ocorreu pouco tempo após a administração sendo de 3 horas para o coração e apenas 1 hora para o fígado. No entanto, para o tecido muscular o maior pico de concentração ocorreu mais tardiamente sendo 24 horas após a administração.

5 – Discussão Geral

Estudos recentes em modelos animais e em humanos tem associado a sinalização alterada de PGC-1 α à intolerância à glicose, resistência à insulina e diabetes. No entanto, o papel de PGC-1 α como um fator protetor ou mediador da progressão da doença não é clara, especialmente porque seus efeitos sobre a sensibilidade à insulina e tolerância à glicose variam entre os tecidos [38].

PGC-1 α foi inicialmente identificada como um coativador de receptores nucleares que participa no controle da termogênese respondendo diretamente às oscilações térmicas ambientais. No entanto, passou-se a investigar as possíveis funções desempenhadas por esta proteína em tecidos não tradicionalmente envolvidos com a termogênese. Alguns desses estudos têm fornecido pistas importantes a respeito do papel de PGC-1 α sobre o controle da homeostase da glicose. Neste contexto, PGC-1 α vem sendo associada à regulação da gliconeogênese hepática, produção de insulina pelas células beta pancreáticas, controle de captação de glicose pelo músculo e modulação da sinalização da insulina no tecido adiposo. Como participante do controle transcricional de diversos programas relacionados ao metabolismo da glicose e mobilização de energia, PGC-1 α tornou-se um potencial alvo para a terapêutica do diabetes, obesidade e doenças relacionadas [50]. Dessa forma, foi empregado neste estudo um oligonucleotídeo antisense para PGC-1 α com o objetivo de avaliar os efeitos da inibição da expressão

de PGC-1 α no organismo como um todo, e em alguns parâmetros clínicos do diabetes tipo 2 induzido por dieta ou por disfunções gênicas.

Na primeira fase do estudo, foi avaliado o efeito da inibição de PGC-1 α sobre a secreção de insulina em animais que apresentavam obesidade e diabetes tipo 2 e em animais normais, ou seja, não obesos e não diabéticos. O fino ajuste da taxa de secreção de insulina é um requisito importante para evitar grandes variações na concentração de glicose no sangue [62].

A inibição da expressão de PGC-1 α restaura parcialmente a capacidade das células beta de secretar insulina [50]. Além disso, a indução adenoviral de PGC-1 α em ilhotas pancreáticas reduz a secreção de insulina [63]. Por fim, em diversos modelos animais de diabetes a expressão de PGC-1 α está aumentada, coincidindo com a supressão de proteínas envolvidas no metabolismo das células beta e produção de ATP [50].

Em concordância com estes dados, nossos resultados mostraram que em modelos animais de obesidade e diabetes tipo 2 como camundongos Swiss alimentados com dieta hiperlipídica e camundongos ob/ob e db/db, o uso de PGC-1 α AS provoca um aumento na secreção de insulina tanto em ilhotas pancreáticas isoladas (Figura 1) como em animais vivos (Tabela 3). Isto não ocorre em animais normais, não obesos e não diabéticos, mesmo quando a secreção de insulina é estimulada por diferentes compostos como arginina, leucina, potássio e altas concentrações de glicose (Figura 2). O efeito do aumento da secreção de insulina só ocorre em animais nos quais o quadro de diabetes mellitus está instalado.

A próxima etapa do estudo foi avaliar o efeito do composto oligonucleotídeo antisense PGC-1 α sobre a ação da insulina em tecidos periféricos. Inicialmente os animais foram tratados com PGC-1 α AS durante 20 dias e com esse tempo de tratamento houve redução da glicemia dos animais diabéticos para valores próximos de 50% (Figuras 3, 4 e 5). As doses de 2,0 e 4,0 nmol reverteram o quadro de hiperglicemia tornando os animais normoglicêmicos sem provocar hipoglicemia. Foi então avaliado se o uso prolongado do composto por 40 dias seria capaz de manter o mesmo efeito sem provocar uma redução ainda maior da glicemia. Os resultados mostraram que além de manter o mesmo efeito observado com 20 dias de tratamento, o uso de PGC-1 α AS por via oral durante 40 dias apresentou efeito muito semelhante ao observado no tratamento via ip (Figuras 6 e 7) . Uma vez que a via de administração oral de fármacos é a mais adequada para terapêutica humana, este resultado foi considerado de grande relevância no estudo do composto. Em adição a este resultado, muitos estudos tem comprovado a eficácia da administração oral de oligonucleotídeos antisense [64-66]

O consumo de glicose através de clamp euglicêmico-hiperinsulinêmico também foi avaliado e mostrou que o uso de PGC-1 α AS em camundongos Swiss diabéticos provocou um aumento no consumo de glicose em relação aos animais diabéticos não tratados com o composto (Figura 8). O próximo passo foi avaliar quais mecanismos estariam envolvidos nessa melhora do quadro geral de diabetes.

Durante um período de jejum, a indução da produção hepática de glicose e oxidação dos ácidos graxos é essencial para sustentar o equilíbrio energético. A produção e oxidação de glicose e ácidos graxos pelo fígado são

controladas através de uma complexa rede de reguladores transcricionais. Dentre eles, o coativador de transcrição PGC-1 α desempenha importante função no metabolismo da glicose hepática e sistêmica e também no metabolismo lipídico [67].

Em pacientes que apresentam diabetes tipo 2, a produção hepática de glicose é o fator predominante responsável pelos elevados níveis de glicose plasmática principalmente nos períodos de jejum [68]. O papel crítico da insulina em suprimir a gliconeogênese é refletida pelo fato de que a excessiva produção hepática de glicose é uma característica do diabetes não tratado. O aumento da produção de glicose hepática é o principal responsável pela hiperglicemia de jejum no diabetes e é um componente importante da hiperglicemia pós-prandial [39].

A maioria das enzimas que participam de diversas vias envolvidas na homeostase da glicose e lipídios são controladas em nível transcricional. Nos últimos anos, PGC-1 α foi identificado como principal regulador da transcrição de muitas enzimas e vias metabólicas. A propriedade de controle transcricional de PGC-1 α é alvo de sinais hormonais e nutricionais e é regulada positivamente por glucagon e negativamente pela insulina. Esta regulação leva a alterações na expressão de genes envolvidos no metabolismo de glicose e lipídios [67].

Das drogas atualmente em uso para o tratamento do diabetes tipo 2 somente a metformina tem certo efeito no controle da gliconeogênese [69]. Entretanto, alguns comorbimentos clínicos, como principalmente a insuficiência renal e a indução de acidose láctica, inviabilizam o uso dessa substância em alguns pacientes. O desenvolvimento de um fármaco que tenha efeito benéfico sobre o

controle da gliconeogênese e que possa ser utilizado com segurança em pacientes com nefropatia é, portanto, de grande interesse clínico.

Assim, o efeito do composto oligonucleotídico antisense PGC-1 α sobre a produção hepática de glicose foi avaliado. O aminoácido L-Glutamina foi utilizado como precursor gliconeogênico sendo que a produção hepática de glicose nos animais que receberam o composto foi 50% menor do que aqueles que não receberam o tratamento (Figura 9). Além disso, foi encontrada redução do conteúdo protéico e menor expressão do mRNA de PEPCK, principal enzima envolvida com o processo de gliconeogênese (Figura 10). Dessa forma, O efeito do composto aqui relatado depende, pelo menos em parte de sua ação sobre a expressão da enzima PEPCK.

Diversos estudos relatam que L-Glutamina é um importante precursor gliconeogênico [70-73] e que a ação de hormônios contrarreguladores (glucagon, glicocorticóides), devido a falhas na secreção e na sinalização da insulina no diabetes tipo 2, provoca um aumento na expressão da enzima glutaminase. A enzima glutaminase viabiliza a entrada de glutamina no Ciclo de Krebs através de sua conversão a glutamato. O glutamato é deslocado do Ciclo de Krebs e entra na via gliconeogênica em um passo anterior à ação da enzima PEPCK atuando como um precursor da produção de glicose [70, 72].

Estudos mostraram que em paralelo ao envolvimento em processos gliconeogênicos, PGC-1 α também desempenha importantes funções nos complexos mecanismos que coordenam o armazenamento e oxidação de lipídios no fígado [50].

A doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD) vem se tornando a forma mais comum de doença hepática relacionada ao aumento da incidência de obesidade. NAFLD representa o constituinte hepático da síndrome metabólica e indivíduos resistentes à insulina apresentam elevada lipogênese e acúmulo de gordura no fígado [74].

O acúmulo macrovesicular de gordura acompanhado pelo elevado estresse oxidativo dentro do hepatócito, seguido de inflamação e resistência à insulina são os principais mecanismos conhecidos, que provocam graves lesões no fígado levando à esteato hepatite não alcoólica [75].

Em populações de países desenvolvidos e em desenvolvimento que adotaram um modelo ocidental de dieta, a esteatose hepática induzida pelo alimento é o principal precursor da esteato hepatite não alcoólica e um dos mais importantes fatores de risco para cirrose hepática. Uma pesquisa recente demonstrou que, em roedores, a ingestão de dieta contendo alto teor de gorduras promove o desenvolvimento de esteatose hepática independentemente do consumo de calorias [76].

Até o momento, nenhum medicamento em uso clínico apresenta a propriedade de reverter a esteatose hepática. As principais estratégias utilizadas para tentar melhorar as lesões provocadas pelo acúmulo de gordura no fígado são a perda de peso, um regime alimentar saudável e exercício físico [75].

Entretanto, foi apresentado neste estudo que camundongos Swiss que apresentavam esteatose hepática induzida por dieta hiperlipídica tiveram reversão do acúmulo de gordura no fígado após tratamento com PGC-1 α AS (Figura 11). Isso foi

acompanhado por melhora da ação molecular da insulina caracterizada por sua capacidade de induzir a fosforilação e ativação da enzima Akt e pela fosforilação/inativação do fator de transcrição FOXO1 (Figura 12). Estudos mostraram que PGC-1 α induz a expressão da proteína 1c ligadora do elemento regulador de esteróis (SREBP1c) e através deste mecanismo regula a expressão de enzimas lipogênicas como FAS e ACC. Desta forma, a inibição de PGC-1 α promove a menor expressão destas enzimas [50].

O desenvolvimento de modelos animais que reproduzam adequadamente as lesões hepáticas induzidas por diferentes drogas, incluindo álcool, em humanos, é tópico de grande controvérsia.

Tetracloreto de carbono (CCL₄) é um agente químico altamente tóxico usado como solvente industrial. CCL₄ é amplamente utilizado para induzir esteatose hepática e para estudar os efeitos de agentes protetores, especialmente antioxidantes [77]. CCL₄ foi banido dos Estados Unidos em 1970 por causa da sua hepatotoxicidade. CCL₄ aumenta em 195% a concentração de triglicerídeos hepáticos dentro de 3 horas após a administração em ratos. Dessa forma, uma característica distinta da toxicidade de CCL₄ é o rápido acúmulo de triglicérides no fígado devido a falhas em seu mecanismo secretório [78].

Como parte dos estudos que visam avaliar a reversibilidade da lesão hepática pelo composto PGC-1 α AS, foram implantados dois protocolos destinados a induzir esteato-hepatite tóxica nos modelos animais. O uso de PGC-1 α AS não causa melhora nos danos causados pelo tratamento com tetracloreto de carbono (Figura 16). Além disso, a lesão hepática provocada por tetracloreto de carbono não causa

alterações na expressão de PGC-1 α (Tabela 4) sugerindo que os mecanismos moleculares envolvidos nessa lesão sejam diferentes dos que ocorrem na esteatose induzida por dieta hiperlipídica, uma vez que nesse modelo observa-se grande aumento na expressão de PGC-1 α .

O abuso crônico de álcool é um importante fator causador de morbidade e mortalidade no mundo todo. O dano hepático devido à crônica intoxicação por álcool, surge inicialmente pelo acúmulo de lipídios no fígado e com a exposição permanente essa condição de esteatose pode evoluir para um estágio inflamatório que leva à fribrinogênese e finalmente à cirrose hepática. O consumo de álcool, seja agudo ou crônico, leva a esteatose hepática em pelo menos 80% dos indivíduos que ingerem álcool [79].

Os mecanismos que levam à esteatose alcoólica e ao agravamento da doença são complexos e não completamente bem entendidos. Dentre os mecanismos que levam à esteatose alcoólica estão as alterações no estado redox. O metabolismo do álcool no fígado utiliza NAD⁺ como coenzima da reação que produz acetaldeído e NADH⁺. Essa mudança no estado redox provoca um aumento na disponibilidade de substratos para a síntese de ácidos graxos. O aumento da produção de NADH⁺ também altera a β -oxidação mitocondrial de ácidos graxos, diminuindo a taxa de oxidação lipídica [80].

Outra possível alternativa ou mecanismo adicional pelo qual o etanol pode induzir esteatose é através da indução de citocinas como TNF α . TNF α aumenta a liberação de ácidos graxos, isso aumenta a lipogênese nos hepatócitos e inibe a β -oxidação de ácidos graxos. O desenvolvimento da esteatose pelo consumo crônico

de álcool também está ligado à duas vias de sinalização que levam ao aumento da lipogênese no fígado: inibição da AMPK e ativação de SREBP-1 [79].

Neste estudo a indução alcólica da esteatose foi feita através de uma dieta líquida contendo etanol na proporção de 6,4% do volume total. Neste protocolo, o uso de PGC-1 α AS reverte os danos causados pelo etanol (Figura 18) além de causar grande diminuição no conteúdo total de triglicérides presente no fígado (Figura 20f). Além do mais, o uso de etanol promove aumento na expressão de PGC-1 α (Figura 19) sugerindo forte relação com o mecanismo de indução de esteatose causada por dieta hiperlipídica.

Por fim, os testes de distribuição tecidual de PGC-1 α AS mostraram que o fígado é o único órgão que apresenta o maior pico de concentração de PGC-1 α AS apenas 1 hora após sua administração (Figura 23). Além disso, o fígado foi o órgão que apresentou a maior concentração do composto entre todos os tecidos analisados (Figura 26).

6 – Conclusões

Conclusões

Em modelos animais de obesidade, DM2 e disfunção hepática induzida pelo álcool, a expressão de PGC-1 α está aumentada. A inibição parcial de sua expressão utilizando-se um composto oligonucleotídico antisense reverte a hiperglicemia por promover simultaneamente o aumento da secreção de insulina e a melhora da sinalização periférica da insulina. Como parte da ação periférica do composto, deve-se destacar a redução da produção hepática de glicose. Ainda, em modelo animal de esteatohepatite alcoólica, observou-se reversão parcial do quadro com a utilização do composto.

A inibição parcial de PGC-1 α surge como abordagem terapêutica potencialmente útil para o tratamento de DM2 e outras disfunções metabólicas afins, além de se constituir em uma abordagem com potencial terapêutico para a disfunção hepática induzida por álcool.

6-Referências

- [1] Aronoff, S. L.; Berkowitz, K.; Shreiner, B.; Want, L. Glucose metabolism and regulation: beyond insulin and glucagon. *Diabetes Spectrum* **17**:183-190; 2004.
- [2] DeFronzo, R. A. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Med Clin North Am* **88**:787-835, ix; 2004.
- [3] Leahy, J. L. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Arch Med Res* **36**:197-209; 2005.
- [4] Virally, M.; Blicke, J. F.; Girard, J.; Halimi, S.; Simon, D.; Guillausseau, P. J. Type 2 diabetes mellitus: epidemiology, pathophysiology, unmet needs and therapeutical perspectives. *Diabetes Metab* **33**:231-244; 2007.
- [5] Donath, M. Y.; Halban, P. A. Decreased beta-cell mass in diabetes: significance, mechanisms and therapeutic implications. *Diabetologia* **47**:581-589; 2004.
- [6] Gerich, J. E. Is insulin resistance the principal cause of type 2 diabetes? *Diabetes Obes Metab* **1**:257-263; 1999.
- [7] Balkau, B.; Charles, M. A.; Drivsholm, T.; Borch-Johnsen, K.; Wareham, N.; Yudkin, J. S.; Morris, R.; Zavaroni, I.; van Dam, R.; Feskens, E.; Gabriel, R.; Diet, M.; Nilsson, P.; Hedblad, B. Frequency of the WHO metabolic syndrome in European cohorts, and an alternative definition of an insulin resistance syndrome. *Diabetes Metab* **28**:364-376; 2002.
- [8] Kahn, S. E. Clinical review 135: The importance of beta-cell failure in the development and progression of type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* **86**:4047-4058; 2001.
- [9] Weyer, C.; Bogardus, C.; Mott, D. M.; Pratley, R. E. The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J Clin Invest* **104**:787-794; 1999.
- [10] Abbasi, F.; Chen, Y. D.; Farin, H. M.; Lamendola, C.; Reaven, G. M. Comparison of three treatment approaches to decreasing cardiovascular disease risk in nondiabetic insulin-resistant dyslipidemic subjects. *Am J Cardiol* **102**:64-69; 2008.
- [11] Weir, G. C.; Bonner-Weir, S. Five stages of evolving beta-cell dysfunction during progression to diabetes. *Diabetes* **53 Suppl 3**:S16-21; 2004.
- [12] Pereira, L. O.; Francischi, R. P.; Lancha, A. H. Obesidade: Hábitos Nutricionais, Sedentarismo e Resistência à Insulina. *Arq Bras Endocrinol Metabol* **47**:111-127; 2003.
- [13] Poitout, V.; Robertson, R. P. Glucolipotoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction. *Endocr Rev* **29**:351-366; 2008.
- [14] Beckman, J. A.; Creager, M. A.; Libby, P. Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *Jama* **287**:2570-2581; 2002.
- [15] Schramm, T. K.; Gislason, G. H.; Kober, L.; Rasmussen, S.; Rasmussen, J. N.; Abildstrom, S. Z.; Hansen, M. L.; Folke, F.; Buch, P.; Madsen, M.; Vaag, A.; Torp-Pedersen, C. Diabetes patients requiring glucose-lowering therapy and nondiabetics with a prior myocardial infarction carry the same cardiovascular risk: a population study of 3.3 million people. *Circulation* **117**:1945-1954; 2008.
- [16] Booth, G. L.; Kapral, M. K.; Fung, K.; Tu, J. V. Relation between age and cardiovascular disease in men and women with diabetes compared with non-diabetic people: a population-based retrospective cohort study. *Lancet* **368**:29-36; 2006.

- [17] Sowers, J. R.; Epstein, M.; Frohlich, E. D. Diabetes, hypertension, and cardiovascular disease: an update. *Hypertension* **37**:1053-1059; 2001.
- [18] Gress, T. W.; Nieto, F. J.; Shahar, E.; Wofford, M. R.; Brancati, F. L. Hypertension and antihypertensive therapy as risk factors for type 2 diabetes mellitus. Atherosclerosis Risk in Communities Study. *N Engl J Med* **342**:905-912; 2000.
- [19] Pedro, R. A.; Isabel, M. M.; Marc, B. B.; Juan, F. B.; Ester, S. B. Review of the Relationship Between Renal and Retinal Microangiopathy in Diabetes Mellitus Patients. *Curr Diabetes Rev*; 2009.
- [20] Ginsberg, H. N.; Maccallum, P. R. The obesity, metabolic syndrome, and type 2 diabetes mellitus pandemic: II. Therapeutic management of atherogenic dyslipidemia. *J Clin Hypertens (Greenwich)* **11**:520-527; 2009.
- [21] Choi, S.; Diehl, A. M. Role of inflammation in nonalcoholic steatohepatitis. *Curr Opin Gastroenterol* **21**:702-707; 2005.
- [22] Yeh, M. M.; Brunt, E. M. Pathology of nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Clin Pathol* **128**:837-847; 2007.
- [23] Dela Pena, A.; Leclercq, I.; Field, J.; George, J.; Jones, B.; Farrell, G. NF-kappaB activation, rather than TNF, mediates hepatic inflammation in a murine dietary model of steatohepatitis. *Gastroenterology* **129**:1663-1674; 2005.
- [24] Carvalheira, J. B.; Saad, M. J. [Insulin resistance/hyperinsulinemia associated diseases not included in the metabolic syndrome]. *Arq Bras Endocrinol Metabol* **50**:360-367; 2006.
- [25] Guarente, L. Sirtuins as potential targets for metabolic syndrome. *Nature* **444**:868-874; 2006.
- [26] Davis, N.; Forbes, B.; Wylie-Rosett, J. Nutritional strategies in type 2 diabetes mellitus. *Mt Sinai J Med* **76**:257-268; 2009.
- [27] Pauli, J. R.; Cintra, D. E.; Souza, C. T.; Ropelle, E. R. [New mechanisms by which physical exercise improves insulin resistance in the skeletal muscle]. *Arq Bras Endocrinol Metabol* **53**:399-408; 2009.
- [28] Turner, R. C.; Cull, C. A.; Frighi, V.; Holman, R. R. Glycemic control with diet, sulfonylurea, metformin, or insulin in patients with type 2 diabetes mellitus: progressive requirement for multiple therapies (UKPDS 49). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Jama* **281**:2005-2012; 1999.
- [29] Glatstein, M. M.; Djokanovic, N.; Garcia-Bournissen, F.; Finkelstein, Y.; Koren, G. Use of hypoglycemic drugs during lactation. *Can Fam Physician* **55**:371-373; 2009.
- [30] Blickle, J. F. Meglitinide analogues: a review of clinical data focused on recent trials. *Diabetes Metab* **32**:113-120; 2006.
- [31] Hansen, A. M.; Hansen, J. B.; Carr, R. D.; Ashcroft, F. M.; Wahl, P. Kir6.2-dependent high-affinity repaglinide binding to beta-cell K(ATP) channels. *Br J Pharmacol* **144**:551-557; 2005.
- [32] Fuhendorff, J.; Rorsman, P.; Kofod, H.; Brand, C. L.; Rolin, B.; MacKay, P.; Shymko, R.; Carr, R. D. Stimulation of insulin release by repaglinide and glibenclamide involves both common and distinct processes. *Diabetes* **47**:345-351; 1998.
- [33] Cesur, M.; Corapcioglu, D.; Gursoy, A.; Gonen, S.; Ozduman, M.; Emral, R.; Uysal, A. R.; Tonyukuk, V.; Yilmaz, A. E.; Bayram, F.; Kamel, N. A comparison of glycemic effects of glimepiride, repaglinide, and insulin glargine in type 2 diabetes mellitus during Ramadan fasting. *Diabetes Res Clin Pract* **75**:141-147; 2007.

- [34] Vilsboll, T.; Krarup, T.; Deacon, C. F.; Madsbad, S.; Holst, J. J. Reduced postprandial concentrations of intact biologically active glucagon-like peptide 1 in type 2 diabetic patients. *Diabetes* **50**:609-613; 2001.
- [35] Lankas, G. R.; Leiting, B.; Roy, R. S.; Eiermann, G. J.; Beconi, M. G.; Biftu, T.; Chan, C. C.; Edmondson, S.; Feeney, W. P.; He, H.; Ippolito, D. E.; Kim, D.; Lyons, K. A.; Ok, H. O.; Patel, R. A.; Petrov, A. N.; Pryor, K. A.; Qian, X.; Reigle, L.; Woods, A.; Wu, J. K.; Zaller, D.; Zhang, X.; Zhu, L.; Weber, A. E.; Thornberry, N. A. Dipeptidyl peptidase IV inhibition for the treatment of type 2 diabetes: potential importance of selectivity over dipeptidyl peptidases 8 and 9. *Diabetes* **54**:2988-2994; 2005.
- [36] Goodarzi, M. O.; Bryer-Ash, M. Metformin revisited: re-evaluation of its properties and role in the pharmacopoeia of modern antidiabetic agents. *Diabetes Obes Metab* **7**:654-665; 2005.
- [37] Elte, J. W.; Blickle, J. F. Thiazolidinediones for the treatment of type 2 diabetes. *Eur J Intern Med* **18**:18-25; 2007.
- [38] Finck, B. N.; Kelly, D. P. PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *J Clin Invest* **116**:615-622; 2006.
- [39] Yoon, J. C.; Puigserver, P.; Chen, G.; Donovan, J.; Wu, Z.; Rhee, J.; Adelmant, G.; Stafford, J.; Kahn, C. R.; Granner, D. K.; Newgard, C. B.; Spiegelman, B. M. Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature* **413**:131-138; 2001.
- [40] Oliveira, R. L.; Ueno, M.; de Souza, C. T.; Pereira-da-Silva, M.; Gasparetti, A. L.; Bezzera, R. M.; Alberici, L. C.; Vercesi, A. E.; Saad, M. J.; Velloso, L. A. 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**:E686-695; 2004.
- [41] Ek, J.; Andersen, G.; Urhammer, S. A.; Gaede, P. H.; Drivsholm, T.; Borch-Johnsen, K.; Hansen, T.; Pedersen, O. 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; 2001.
- [42] Hara, K.; Tobe, K.; Okada, T.; Kadowaki, H.; Akanuma, Y.; Ito, C.; Kimura, S.; Kadowaki, T. A genetic variation in the PGC-1 gene could confer insulin resistance and susceptibility to Type II diabetes. *Diabetologia* **45**:740-743; 2002.
- [43] Lin, J.; Puigserver, P.; Donovan, J.; Tarr, P.; Spiegelman, B. M. Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 β (PGC-1 β), a novel PGC-1-related transcription coactivator associated with host cell factor. *J Biol Chem* **277**:1645-1648; 2002.
- [44] Kressler, D.; Schreiber, S. N.; Knutti, D.; Kralli, A. The PGC-1-related protein PERC is a selective coactivator of estrogen receptor α . *J Biol Chem* **277**:13918-13925; 2002.
- [45] Andersson, U.; Scarpulla, R. C. Pgc-1-related coactivator, a novel, serum-inducible coactivator of nuclear respiratory factor 1-dependent transcription in mammalian cells. *Mol Cell Biol* **21**:3738-3749; 2001.
- [46] Puigserver, P.; Spiegelman, B. M. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α (PGC-1 α): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev* **24**:78-90; 2003.
- [47] Glass, C. K.; Rosenfeld, M. G. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev* **14**:121-141; 2000.

- [48] Knutti, D.; Kaul, A.; Kralli, A. A tissue-specific coactivator of steroid receptors, identified in a functional genetic screen. *Mol Cell Biol* **20**:2411-2422; 2000.
- [49] Puigserver, P.; Wu, Z.; Park, C. W.; Graves, R.; Wright, M.; Spiegelman, B. M. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* **92**:829-839; 1998.
- [50] De Souza, C. T.; Araujo, E. P.; Prada, P. O.; Saad, M. J.; Boschero, A. C.; Velloso, L. A. Short-term inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha expression reverses diet-induced diabetes mellitus and hepatic steatosis in mice. *Diabetologia* **48**:1860-1871; 2005.
- [51] Herzig, S.; Long, F.; Jhala, U. S.; Hedrick, S.; Quinn, R.; Bauer, A.; Rudolph, D.; Schutz, G.; Yoon, C.; Puigserver, P.; Spiegelman, B.; Montminy, M. CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature* **413**:179-183; 2001.
- [52] De Souza, C. T.; Gasparetti, A. L.; Pereira-da-Silva, M.; Araujo, E. P.; Carneiro, J. B.; Saad, M. J.; Boschero, A. C.; Carneiro, E. M.; Velloso, L. A. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1-dependent uncoupling protein-2 expression in pancreatic islets of rats: a novel pathway for neural control of insulin secretion. *Diabetologia* **46**:1522-1531; 2003.
- [53] Handschin, C.; Spiegelman, B. M. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 coactivators, energy homeostasis, and metabolism. *Endocr Rev* **27**:728-735; 2006.
- [54] Zhang, C. Y.; Baffy, G.; Perret, P.; Krauss, S.; Peroni, O.; Grujic, D.; Hagen, T.; Vidal-Puig, A. J.; Boss, O.; Kim, Y. B.; Zheng, X. X.; Wheeler, M. B.; Shulman, G. I.; Chan, C. B.; Lowell, B. B. 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; 2001.
- [55] 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 rat islets. *Diabetes* **48**:1482-1486; 1999.
- [56] Leone, T. C.; Lehman, J. J.; Finck, B. N.; Schaeffer, P. J.; Wende, A. R.; Boudina, S.; Courtois, M.; Wozniak, D. F.; Sambandam, N.; Bernal-Mizrachi, C.; Chen, Z.; Holloszy, J. O.; Medeiros, D. M.; Schmidt, R. E.; Saffitz, J. E.; Abel, E. D.; Semenkovich, C. F.; Kelly, D. P. PGC-1alpha deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis. *PLoS Biol* **3**:e101; 2005.
- [57] Moller, D. E. New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Nature* **414**:821-827; 2001.
- [58] Boschero, A. C.; Szpak-Glasman, M.; Carneiro, E. M.; Bordin, S.; Paul, I.; Rojas, E.; Atwater, I. Oxotremorine-m potentiation of glucose-induced insulin release from rat islets involves M3 muscarinic receptors. *Am J Physiol* **268**:E336-342; 1995.
- [59] Bjork, E.; Velloso, L. A.; Kampe, O.; Karlsson, F. A. GAD autoantibodies in IDDM, stiff-man syndrome, and autoimmune polyendocrine syndrome type I recognize different epitopes. *Diabetes* **43**:161-165; 1994.
- [60] Gasparetti, A. L.; de Souza, C. T.; Pereira-da-Silva, M.; Oliveira, R. L.; Saad, M. J.; Carneiro, E. M.; Velloso, L. A. Cold exposure induces tissue-specific modulation of the insulin-signalling pathway in *Rattus norvegicus*. *J Physiol* **552**:149-162; 2003.
- [61] Bligh, E. G.; Dyer, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* **37**:911-917; 1959.

- [62] Newgard, C. B. While tinkering with the beta-cell...metabolic regulatory mechanisms and new therapeutic strategies: American Diabetes Association Lilly Lecture, 2001. *Diabetes* **51**:3141-3150; 2002.
- [63] Yoon, J. C.; Xu, G.; Deeney, J. T.; Yang, S. N.; Rhee, J.; Puigserver, P.; Levens, A. R.; Yang, R.; Zhang, C. Y.; Lowell, B. B.; Berggren, P. O.; Newgard, C. B.; Bonner-Weir, S.; Weir, G.; Spiegelman, B. M. Suppression of beta cell energy metabolism and insulin release by PGC-1alpha. *Dev Cell* **5**:73-83; 2003.
- [64] Agrawal, S.; Zhang, X.; Lu, Z.; Zhao, H.; Tamburin, J. M.; Yan, J.; Cai, H.; Diasio, R. B.; Habus, I.; Jiang, Z.; et al. Absorption, tissue distribution and in vivo stability in rats of a hybrid antisense oligonucleotide following oral administration. *Biochem Pharmacol* **50**:571-576; 1995.
- [65] Raoof, A. A.; Chiu, P.; Ramtoolsa, Z.; Cumming, I. K.; Teng, C.; Weinbach, S. P.; Hardee, G. E.; Levin, A. A.; Geary, R. S. Oral bioavailability and multiple dose tolerability of an antisense oligonucleotide tablet formulated with sodium caprate. *J Pharm Sci* **93**:1431-1439; 2004.
- [66] Tillman, L. G.; Geary, R. S.; Hardee, G. E. Oral delivery of antisense oligonucleotides in man. *J Pharm Sci* **97**:225-236; 2008.
- [67] Rodgers, J. T.; Puigserver, P. Fasting-dependent glucose and lipid metabolic response through hepatic sirtuin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:12861-12866; 2007.
- [68] Fery, F. Role of hepatic glucose production and glucose uptake in the pathogenesis of fasting hyperglycemia in type 2 diabetes: normalization of glucose kinetics by short-term fasting. *J Clin Endocrinol Metab* **78**:536-542; 1994.
- [69] Radziuk, J.; Bailey, C. J.; Wiernsperger, N. F.; Yudkin, J. S. Metformin and its liver targets in the treatment of type 2 diabetes. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* **3**:151-169; 2003.
- [70] Oliveira-Yamashita, F.; Garcia, R. F.; Felisberto-Junior, A. M.; Curi, R.; Bazotte, R. B. Evidence that L-glutamine is better than L-alanine as gluconeogenic substrate in perfused liver of weaned fasted rats submitted to short-term insulin-induced hypoglycaemia. *Cell Biochem Funct* **27**:30-34; 2009.
- [71] Gazola, V. A.; Garcia, R. F.; Hartmann, E. M.; Barrena, H. C.; Albuquerque, G. G.; Souza, H. M.; Bazotte, R. B. Glycemia recovery with oral amino acid administration during experimental short-term insulin-induced hypoglycemia. *J Diabetes Complications* **21**:320-325; 2007.
- [72] Garcia, R. F.; Gazola, V. A.; Barrena, H. C.; Hartmann, E. M.; Berti, J.; Toyama, M. H.; Boschero, A. C.; Carneiro, E. M.; Manso, F. C.; Bazotte, R. B. Blood amino acids concentration during insulin induced hypoglycemia in rats: the role of alanine and glutamine in glucose recovery. *Amino Acids* **33**:151-155; 2007.
- [73] Gazola, V. A.; Garcia, R. F.; Curi, R.; Pithon-Curi, T. C.; Mohamad, M. S.; Hartmann, E. M.; Barrena, H. C.; Bazotte, R. B. Acute effects of isolated and combined L-alanine and L-glutamine on hepatic gluconeogenesis, ureagenesis and glycaemic recovery in experimental short-term insulin induced hypoglycaemia. *Cell Biochem Funct* **25**:211-216; 2007.
- [74] Kim, Y. W.; Kim, Y. M.; Yang, Y. M.; Kim, T. H.; Hwang, S. J.; Lee, J. R.; Kim, S. C.; Kim, S. G. Inhibition of SREBP-1c-mediated hepatic steatosis and oxidative stress by sauchinone, an AMPK-activating lignan in *Saururus chinensis*. *Free Radic Biol Med*; 2009.

- [75] Haddad, Y.; Vallerand, D.; Brault, A.; Haddad, P. S. Antioxidant and Hepatoprotective Effects of Silibinin in a Rat Model of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Evid Based Complement Alternat Med*; 2009.
- [76] de Meijer, V. E.; Le, H. D.; Meisel, J. A.; Sharif, M. R.; Pan, A.; Nose, V.; Puder, M. Dietary fat intake promotes the development of hepatic steatosis independently from excess caloric consumption in a murine model. *Metabolism*; 2010.
- [77] Ozturk, F.; Gul, M.; Ates, B.; Ozturk, I. C.; Cetin, A.; Vardi, N.; Otlu, A.; Yilmaz, I. Protective effect of apricot (*Prunus armeniaca* L.) on hepatic steatosis and damage induced by carbon tetrachloride in Wistar rats. *Br J Nutr* **102**:1767-1775; 2009.
- [78] Pan, X.; Hussain, F. N.; Iqbal, J.; Feuerman, M. H.; Hussain, M. M. Inhibiting proteasomal degradation of microsomal triglyceride transfer protein prevents CCl₄-induced steatosis. *J Biol Chem* **282**:17078-17089; 2007.
- [79] Breitkopf, K.; Nagy, L. E.; Beier, J. I.; Mueller, S.; Weng, H.; Dooley, S. Current experimental perspectives on the clinical progression of alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res* **33**:1647-1655; 2009.
- [80] Donohue, T. M., Jr. Alcohol-induced steatosis in liver cells. *World J Gastroenterol* **13**:4974-4978; 2007.