

Universidade de São Paulo  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Sistema RANKL na regulação gênica de PGC-1 $\alpha$

**Ana Júlia Rossoni Carvalho**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado para obtenção do título de  
Bacharel em Ciências Biomédicas com  
Ênfase em Ciências Básicas da Saúde.

Ribeirão Preto

2018

# **Ana Júlia Rossoni Carvalho**

**Sistema RANKL na regulação da expressão gênica de PGC-1 $\alpha$**

Orientadora:

**Prof. Dra. MARIANA KIOMY OSAKO**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado para obtenção do título de  
Bacharel em Ciências Biomédicas com  
Ênfase em Ciências Básicas da Saúde.

Ribeirão Preto  
2018

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho aos meus avós, Hilda, Alda  
e Analdo: por suas palavras me transformo, e são  
elas que me dão asas.

## Agradecimentos

Aos meus pais, que nunca mediram esforços ao proporcionarem oportunidades para mim e minha irmã; sempre foram inspiração e norte moral, e não poderia ser quem sou hoje sem o auxílio, paciência e dedicação dos melhores dos pais—crescer como cresci é privilégio de poucos, e nunca conseguirei agradecê-los por me darem tudo o que deram.

À família forjada no mais cru dos lugares, só tenho de agradecer ao RANKLab. Por me receberem de volta sem pestanejar, e por me auxiliarem nos mais críticos dos meses; à Flávia, por ser minha companhia constante e, apesar de todas minhas falhas, ter uma paciência infinita para responder todas as minhas dúvidas, me deixando partilhar de todo seu vasto conhecimento; ao Paulo, por me proporcionar mais risadas do que eu consigo lembrar, e por estar do meu lado durante todas as dificuldades, me incentivando com as melhores palavras; ao Rye, por ser fonte conspiratória constante, capaz de me ensinar com os melhores comentários. Aos que se foram, Rodrigo, Karen e Mari, por terem sido parte de minha história e me proporcionarem as melhores memórias que eu poderia ter de um espaço físico restrito; e aos que se mudaram, pelas risadas e brincadeiras e memórias deixadas. Às técnicas de laboratório, Silvinha, Vani e Tuca, por me ensinarem muito mais do que simples técnicas laboratoriais; ao Laboratório de Microscopia Eletrônica, por toda dedicação e cuidado em um momento tão crucial de minha formação.

À minha orientadora, Mariana K. Osako, por todos os ensinamentos passados e confiança criada. Crescer e conseguir ser um terço do que ela é será o mais honrável e belo dos desafios; as histórias contadas e as vividas, as broncas e momentos de calmaria, são coisas que carregarei para o restante de minha vida, pois aprendi com a melhor das mestres o que é ser cientista, e como essa luta é árdua e infinita, e deve ser calcada com paciência e amor. Obrigada por ser a melhor das professoras, hoje e sempre; a admiração e amor que carrego não pode ser medido em palavras, e só tenho a agradecer por tudo.

Aos meus veteranos, por terem sido minha família longe de casa: cada um me modificou a seu modo, e não poderia ter encontrado mentes tão diferentes e tão semelhantes para me proporcionarem as melhores experiências; à Viviana, Marina, Thaís e Maycon, meu maior suporte e meus melhores companheiros, responsáveis por me segurarem quando não tinha chão e me aguentarem no pior dos humores; à minha família da Farmácia, capazes de adotarem e amarem até mesmo quem não se encaixa; às amizades feitas esse ano, pelas noites de jogos, conversas alongadas e confiança criada, onde o espaço proporcionado manteve minha sanidade e me deu respiro para o que estava para vir em seguida—sua companhia foi

essencial, e só posso agradecê-las por todas as ideias e energia trocada; à Sirius Biotecnologia Jr. e ao Coletivo Feminista Henrietta Lacks, por me proporcionarem espaço de crescimento pessoal e profissional inigualável, onde encontrei pessoas semelhantes e que buscavam caminhar ao meu lado por um mesmo propósito.

À Nayme, Isabella e Isabelly, pelo apoio que me proporcionam desde menina, e que sei vai transpassar qualquer momento e qualquer lugar; o amor de vocês é infinito, e tenho a melhor das sortes por ter irmãs como vocês ao meu lado.

Por fim, gostaria de agradecer a agência de fomento FAPESP (Processo 2017/25848-3), que tenho sido bolsista desde fevereiro de 2018, por proporcionar os recursos necessários para o desenvolvimento de meu projeto de pesquisa.

## **Epígrafe**

*“Nothing in life is to be feared, it is only to be understood.  
Now is the time to understand more, so that we may fear less.”*  
— Marie Curie (1867-1934)

## Sumário

R E S U M O.....	9
A B S T R A C T.....	10
1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1 OS DIFERENTES TECIDOS ADIPOSOS.....	11
1.1.1 TECIDO ADIPOSO BRANCO.....	11
1.1.2 ORIGEM E DIFERENCIACÃO DO ADIPÓCITO BRANCO.....	13
1.1.3 TECIDO ADIPOSO MARROM.....	15
1.1.4 ORIGEM DO ADIPÓCITO MARROM.....	15
1.1.5 TECIDO ADIPOSO BEGE.....	18
1.1.6 ORIGEM DO TECIDO ADIPOSO BEGE.....	18
1.2 MITOCÔNDRIAS E O PROGRAMA TERMOGÊNICO.....	20
1.2.1 VIAS METABÓLICAS E A MITOCÔNDRIA.....	21
1.2.2 MORFOLOGIA MITOCONDRIAL E SUA FUNÇÃO.....	24
1.2.3 PGC-1 $\alpha$ E A BIOGÊNESE MITOCONDRIAL.....	25
1.2.4 UCP1 E TERMOGÊNESE.....	28
1.3 O SISTEMA DE SINALIZAÇÃO RANK-RANKL-OPG.....	29
2. OBJETIVOS.....	33
2.1 GERAL.....	33
2.2 ESPECÍFICOS.....	33
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3.1 EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL.....	34
3.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	34
3.3 CULTURA CELULAR.....	34
3.3.1 LINHAGEM 3T3-L1.....	34
3.3.2 CULTURA PRIMÁRIA DA FRAÇÃO VASCULAR ESTROMAL.....	34
3.3.3 LINHAGEM HEK-293.....	35
3.4 ENSAIO DE OIL RED O.....	35
3.5 RT-qPCR.....	35
3.5.1 DESENHO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES ( <i>PRIMERS</i> ).....	36
3.5.2 EXTRAÇÃO DE RNA E TRANSCRIÇÃO REVERSA.....	36

3.5.3 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL - REAL TIME PCR.....	37
3.6 CLONAGEM DA REGIÃO PROMOTORA DE PGC-1 $\alpha$ .....	37
3.7 ENSAIO DE LUCIFERASE COM REGIÃO PROMOTORA DE PGC-1 $\alpha$ .....	38
3.8 ESTATÍSTICA.....	38
4. RESULTADOS.....	40
4.1 AVALIAÇÃO DOS TECIDOS ADIPOSOS SUBCUTÂNEOS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA.....	40
4.2 CARACTERIZAÇÃO DA DIFERENCIADA DO ADIPOCITO BEGE POR OIL RED O <i>in vitro</i> .....	41
4.3 EXPRESSÃO GÊNICA DE GENES TERMOGÊNICOS DIANTE A DIFERENCIADA A ADIPOCITOS BEGE.....	42
4.4 CONSTRUÇÃO DE PLASMÍDEO CONTENDO PROMOTOR DE PGC-1 $\alpha$ .....	42
4.5 REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE PGC-1 $\alpha$ MEDIADA POR RANKL.....	43
5. DISCUSSÃO.....	45
6. CONCLUSÃO.....	47
7. BIBLIOGRAFIA.....	48

## **RESUMO**

### **Sistema RANKL na regulação da expressão gênica de PGC-1 $\alpha$**

O tecido adiposo é atualmente considerado um órgão endócrino com funções importantes e variadas no organismo que envolvem, por exemplo, homeostase energética, termorregulação e reprodução. O tecido adiposo branco pode sofrer diferenciação para tecido adiposo bege, metabolicamente mais ativo, ao adquirir características termogênicas em um processo denominado *browning*, caracterizado por um aumento na concentração de mitocôndrias que permitem uma maior capacidade de transformação de energia química em calor, ou seja, maior gasto energético. O perfil termogênico tem sido alvo de muitos estudos visto a possibilidade de novas perspectivas no tratamento de obesidade e consequentemente doenças associadas como o diabetes. A biogênese mitocondrial é regulada por genes da família PGC-1 e, em especial, a PGC-1 $\alpha$  é um fator de regulação co-transcricional responsável pelo aumento da atividade de PPAR $\gamma$ , que regula a diferenciação do adipócito. O sistema RANK-RANKL-OPG, por sua vez, é muito bem caracterizado no metabolismo ósseo, exercendo também papel anti-inflamatório em macrófagos, calcificação vascular, e dados preliminares do nosso grupo sugerem participação direta de RANKL no processo de diferenciação do tecido adiposo bege. E o objetivo do presente trabalho foi elucidar o papel de RANKL na regulação da transcrição do gene PGC-1 $\alpha$  e avaliação da biogênese mitocondrial. Os dados mostram aumento do número de mitocôndrias no tecido adiposo subcutâneo de animais *knockout* para OPG, e ensaios *in vitro* demonstraram um aumento no número de gotículas lipídicas de adipócitos bege tratados com RANKL, o que indica maior mobilização lipídica. E experimentos em células HEK-293 demonstraram um aumento da ativação da região promotora de PGC-1 $\alpha$  por RANKL, assim como indução de sua expressão e de outros marcadores de termogênese como UCP1, e de biogênese mitocondrial como a citrato sintase em células da fração vascular estromal diferenciadas para bege. Em resumo, as evidências indicam que RANKL pode regular a expressão de PGC-1 $\alpha$  e contribuir para o aumento do número de mitocôndrias e do processo de *browning* do tecido adiposo branco.

## **ABSTRACT**

### **RANKL system in the genic expression regulation of PGC-1 $\alpha$**

The adipose tissue is regarded as an endocrine organ with different and important functions in the organism ranging from energy homeostasis, thermoregulation to reproduction. The white adipose tissue can be differentiated to the beige adipose tissue, which is more metabolic active, acquiring thermogenic characteristics in a process known as *browning*, which is characterized by a higher mitochondria concentration that allow a higher transformation of chemical energy into heat, and increase of energy expenditure. The thermogenic profile of the beige adipocyte has been the subject of many studies focusing on therapies for obesity and associated diseases such as type 2 diabetes. The mitochondrial biogenesis is regulated by PGC-1 family genes, in special by PGC-1 $\alpha$ , a co-transcriptional factor responsible for higher PPAR $\gamma$  activity, which regulates adipocyte differentiation. The RANK-RANKL-OPG system, in turn, is characterized in the bone metabolism, and also induces an anti-inflammatory profile in macrophages, vascular calcification, and preliminary data from our group suggests an active role for RANKL in the differentiation of the beige adipocyte. The objective of the present work was to elucidate the role of RANKL in the regulation of the transcription of PGC-1 $\alpha$  and mitochondrial biogenesis. And our data show a higher number of mitochondria in the subcutaneous adipose tissue of OPG *knockout* animals, and *in vitro* assays show higher amount of smaller lipid droplets in adipocytes treated with RANKL, indicating a higher lipid mobilization. Experiments with HEK-293 cells showed a higher activation of PGC-1 $\alpha$  promoter region by RANKL stimulus, as well as induction of its expression and of other genes such as UCP1, a marker for thermogenesis, and citrate synthase for mitochondrial biogenesis in cells of the stromal vascular fraction. In short, the present study shows evidence that RANKL can regulate the expression of PGC-1 $\alpha$  and may contribute to mitochondria biogenesis in the *browning* process of the white adipose tissue.

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 Os diferentes tecidos adiposos**

A obesidade é hoje um dos maiores problemas de saúde pública mundial, e é também um dos mais negligenciados. Por conta do estilo de vida do homem atual, houve um aumento do consumo de alimentos ricos em calorias vazias e redução da prática de atividades físicas, o que levou ao aumento do número de pessoas acima do peso ou obesas. Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) indicam que, em 2016, cerca de 1,9 bilhão de pessoas estavam com sobrepeso (IMC entre 25.0 e 29.9) e, dentro deste grupo, cerca de 650 milhões de pessoas eram obesas (IMC > 30.0) (OMS, 2017). A OMS ainda classifica a obesidade como um “acúmulo anormal ou excessivo de gordura que apresenta um risco à saúde”, que pode levar ao surgimento de doenças cardiovasculares, diabetes mellitus tipo II, dislipidemia, hipertensão e alguns tipos de câncer (MOZAFFARIAN *et al.*, 2016; HARMS e SEALE, 2013). Desta forma, o estudo do tecido adiposo tem relevância não só para a obesidade, mas para diversas outras doenças.

O tecido adiposo é um tecido conjuntivo especializado relacionado à homeostase energética, e pode ser encontrado em diversas regiões do organismo, como ao redor de vísceras e depósitos subcutâneos. O tecido adiposo também possui propriedades mecânicas, protegendo órgãos e amortecendo tecidos que sofrem de grande estresse mecânico; e é responsável pelo isolamento térmico em mamíferos (IRVING e HART, 1957; PRESTRUD e NILSEN, 1992; NELSON, 1973). Esse tecido é classicamente dividido em duas formas: como tecido adiposo branco e como tecido adiposo marrom. E é classicamente dividido em duas formas: como tecido adiposo branco e como tecido adiposo marrom, e mais recentemente um terceiro tipo foi descrito: o tecido adiposo bege.

#### **1.1.1 Tecido adiposo branco**

O tecido adiposo branco é composto primariamente por adipócitos grandes e esféricos, agrupados de maneira confluente. Seu conteúdo lipídico ocupa a maior parte de seu volume celular, levando sua célula a ser chamada de adipócito unilocular (WRONSKA e KMIEC, 2012). Sua distribuição corporal deve-se a múltiplos fatores, e é mais comumente dividido entre tecido adiposo branco subcutâneo e visceral. Enquanto os depósitos subcutâneos mais estudados são os das regiões abdominais, glúteas e femoriais, os depósitos viscerais estão associados com o sistema digestivo, compondo o mesentério, as alças omentais e o apêndice epiplôngeo (LEE *et al.*, 2012). A diferença na distribuição corporal do tecido

adiposo branco se deve principalmente a fatores como sexo e etnia. Existe um dimorfismo sexual facilmente visto entre homens e mulheres, nos quais há um acúmulo de tecido adiposo na região abdominal em homens, e na região glúteo-femoral em mulheres (GEER e SHEN, 2009), dando aos homens um aspecto em “forma de maçã”, e nas mulheres um aspecto em “forma de pera”. E há uma prevalência no acúmulo de gordura na região abdominal em homens e mulheres durante o envelhecimento. Há uma diferença também na deposição de gordura relacionada à etnia: trabalhos mostram que hispânicos e afro-americanos possuem menos gordura visceral do que pessoas brancas, enquanto estas são menos propensas à obesidade que as outras etnias (CARROLL et al., 2008; KATZMARZYK et al., 2010); embora nestes casos, tanto fatores genéticos quanto fatores externos, tais como alimentação e ambiente, têm papéis preponderantes.

Assim, por muito tempo, o tecido adiposo esteve relacionado ao armazenamento energético. De fato, o tecido adiposo estoca energia em excesso na forma de triacilgliceróis. Em situações de jejum ou hipoglicemia, os triacilgliceróis são liberados por lipólise como ácidos graxos livres na circulação, que servem de substrato celular para obtenção de energia. Porém, estudos demonstraram que o tecido adiposo possui outros tipos celulares, como pré-adipócitos, macrófagos, células endoteliais, fibroblastos e leucócitos (WOZNIAK et al., 2009) e também está relacionado a outros processos, como a resposta imune, homeostase energética e funções reprodutivas, por exemplo.

Em 1953, KENNEDY (1953) propôs que havia um fator de regulação negativo presente neste sistema, e que este estaria na circulação, atuando centralmente para manutenção do gasto energético e alimentação do indivíduo (GALIC et al., 2010), sendo secretado pelo tecido adiposo. Quase meio século depois, este fator foi identificado como sendo a leptina, e outros fatores também foram identificados nesta mesma época, como IL-6 e o TNF- $\alpha$ , e desta forma, além do papel metabólico, o tecido adiposo adquire um papel endócrino e imunológico (ZHANG et al., 1994; HOTAMISLIGIL et al., 1993). A leptina é um hormônio produto do gene *Ob*, que é produzido pelos adipócitos proporcionalmente à gordura corporal, é transportada pela corrente sanguínea e chega ao hipotálamo em processo mediado pelos tanicitos (BALLAND, 2014). E induz, através do seu receptor Ob-R em neurônios sensíveis presentes na região dorsal, ventral, medial e pré-mamilar, a produção de neuropeptídeos que regulam o comportamento alimentar e o peso corporal, resultando na inibição da ingestão de alimento (MOLINA, 2014).

As ações imunológicas, por sua vez, se devem à íntima relação entre adipócitos e células imunológicas e a inflamação no contexto da obesidade. A inflamação presente em indivíduos obesos difere da inflamação gerada por patógenos, por exemplo, onde há os sinais clássicos de inflamação como rubor, inchaço, calor e dor; na obesidade, a inflamação ocorre por uma razão metabólica em que os adipócitos mantém o insulto inflamatório e também são responsáveis pelo início da resposta inflamatória (GREGOR e HOTAMISLIGIL, 2011). O adipócito hipertrofiado eventualmente sofre lise e os ácidos graxos liberados atuam como moléculas de padrão associados à patógenos (PAMP) e ativam macrófagos ao serem reconhecidos pelo receptor TLR-4 (*toll like receptor-4*); e também é responsável pela liberação de citocinas (conhecidas como adipocinas) pró-inflamatórias, tais como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  (HOTAMISLIGIL et al., 1993). Além do recrutamento, macrófagos residentes no tecido adiposo sofrem ativação e são polarizados também para o estado pró-inflamatório (conhecido como ativação M1 em contraposição ao perfil anti-inflamatório ou M2). Assim, na obesidade, há maior presença de macrófagos M1 e aumento de citocinas pró-inflamatórias naquela região.

### **1.1.2 Origem e diferenciação do adipócito branco**

Os adipócitos brancos são provenientes de pré-adipócitos, que são oriundos de células precursoras mesenquimais, em processo conhecido como adipogênese, que ocorre em duas fases: a primeira chamada de determinação, em que ocorre comprometimento das células precursoras para pré-adipócitos e, a segunda chamada de diferenciação definitiva, em que pré-adipócitos diferenciarem-se em adipócitos completamente maduros (ROSEN e SPIEGELMAN, 2014).

A fase de determinação envolve a sinalização Wnt e *hedgehog*, e fatores de transcrição adipogênicos como o receptor gamma ativado pelo proliferador peroxisomo (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*, PPAR $\gamma$ ) e a proteína alfa ligada a CCAAT/potenciador (*CCAAT/enhancer-binding protein alpha*, C/EBP $\alpha$ ). PPAR $\gamma$  é conhecido como um regulador da adipogênese e somente sua expressão é suficiente para início da adipogênese, e sua ausência leva à incapacidade de outros fatores de iniciarem a transformação de pré-adipócitos (OKAMURA et al., 2009; ROSEN e MACDOUGALD, 2006). PPAR $\gamma$  ainda é importante para a manutenção do estado diferenciado dos adipócitos, e sem sua expressão há redução no acúmulo de lipídeos e redução da expressão de marcadores de adipócitos (TAMORI et al., 2002). Sua regulação se dá por meio de fatores de transcrição da família C/

EBP, principalmente os fatores C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$  e C/EBP $\delta$ , que estimulam sua transcrição, além de outros fatores como o SREBP1c, fatores tipo Krueppel (*Krueppel-like factor, KLF*) 5, KLF15, e proteína de dedo de zinco (*Zinc finger protein, ZFP*) 423 (KAWAI e ROSEN, 2010). A expressão dos fatores de transcrição C/EBP $\beta$  e C/EBP $\delta$  levam à indução da expressão de C/EBP $\alpha$  (CAO et al., 1991). Em animais deficientes para C/EBP $\beta$ , há redução da adiposidade, mas C/EBP $\delta$  pode compensar a perda de C/EBP $\beta$  (TANAKA et al., 1997). Estes dois fatores induzem a expressão de C/EBP $\alpha$ , que por sua vez induz a expressão de PPAR $\gamma$ . Porém, somente a expressão de C/EBP $\alpha$  e PPAR $\gamma$  não é suficiente para que o desenvolvimento adequado do tecido adiposo, sendo necessária expressão inicial de C/EBP $\delta$  e C/EBP $\beta$  para que o tecido seja formado (YEH et al., 1994).

Os KLFs, por sua vez, em especial os fatores KLF15 e KLF5, induzem a diferenciação dos adipócitos assim como a expressão do transportador de glicose sensível à insulina 4 (*Glucose transporter-4, GLUT4*) (MORI et al, 2005; GRAY, 2002). KLF15 é responsável pela expressão de GLUT4, enquanto que KLF5 é induzido por C/EBP $\beta$  e C/EBP $\delta$ , ligando-se ao promotor de PPAR $\gamma$ , auxiliando e aumentando o efeito das C/EBPs neste gene (OISHI, 2005). Outros membros da família KLF não promovem a diferenciação dos adipócitos, mas a inibe; KLF2 e KLF7 são conhecidos fatores anti-adipogênicos, que reprimem o promotor de PPAR $\gamma$  e param a diferenciação (WU, 2005; BANERJEE, 2003). Estudos demonstram que o pré-adipócito possuí KLF2 ligado ao promotor de PPAR $\gamma$ , que é substituído por KLF5 na diferenciação inicial, e este é substituído pela KLF15, mantendo a diferenciação do adipócito enquanto PPAR $\gamma$  é expresso.

Alguns produtos sintéticos, como as tiazolidinedionas (por exemplo, a rosiglitazona), também são capazes de induzir à expressão de PPAR $\gamma$  ao estimular sua atividade transcrecional, levando ao aumento da regulação de genes relacionados ao metabolismo lipídico, tais como o grupo de diferenciação 36 (*cluster of differentiation 36, CD36*), a proteína 4 ligante de ácidos graxos (*fatty-acid binding protein 4, FABP4*) e a lipase lipoproteica (LPL) (KAWAI, 2010). O uso das tiazolidinedionas, no entanto, está relacionado à incorporação de ácidos graxos livres ao tecido adiposo, e à redistribuição do tecido adiposo visceral em subcutâneo, melhorando quadros de resistência à insulina, como ocorre com a diabetes. A ativação de PPAR $\gamma$  leva também a um aumento de adipócitos pequenos e expressão de fatores tais como a adiponectina, um fator secretor que sensibiliza o tecido à insulina e diminui a expressão de fatores causadores da resistência à insulina, como o TNF $\alpha$  (KAWAI e ROSEN, 2010).

### **1.1.3 Tecido adiposo marrom**

O tecido adiposo marrom se caracteriza por um conjunto especializado de células capaz de dissipar energia química armazenada na forma de calor após estimulação simpática. Seus adipócitos são pequenos e possuem múltiplas gotículas lipídicas, que lhe confere o nome de adipócitos multiloculares. Possuem uma grande concentração mitocondrial, responsável pela capacidade termogênica do tecido, e que garante sua coloração amarronzada devido ao citocromo *c* presente nesta organela. A termogênese ocorre pela atividade de uma proteína desacopladora presente na membrana mitocondrial interna de seus adipócitos, conhecida como proteína desacopladora 1 (*uncoupling protein 1, UCP1*), que atua no “vazamento” de prótons entre as duas membranas mitocondriais, desacoplando, assim, a síntese de ATP e dissipando a energia em forma de calor.

O tecido adiposo marrom é responsável pela manutenção da temperatura corporal e foi descrito inicialmente em animais hibernantes. Em humanos, foi inicialmente encontrado em neonatos, sendo importante para mantê-los aquecidos por meio da termogênese independente de tremores (*non-shivering thermogenesis*) (AHERNE e HULL, 1966). Adultos, por sua vez, não possuiriam esse tecido a não ser que sofressem desafios específicos para desenvolvê-lo, tais como exposição crônica ao frio ou um excesso de catecolaminas (HUTTUNEN *et al.*, 1981; ENGLISH *et al.*, 1973). Recentemente, porém, CYPESS e colaboradores (2009) conseguiram demonstrar a presença de depósitos de tecido adiposo marrom em adultos por meio de observações radiológicas com *PET-scan* de um banco de dados. O tecido adiposo marrom foi encontrado em uma região estendendo-se da região anterior do pescoço, clavícula, e descendo pelo tórax. A probabilidade de sua detecção era inversamente proporcional à idade dos pacientes analisados, à temperatura externa quando o *scan* foi realizado, ao uso de beta-bloqueadores e, com pacientes mais velhos, ao índice de massa corporal. Essa descoberta fez com que o interesse neste tecido retornasse, levando a pesquisas relacionadas à identidade do tecido, sua abundância, prevalência e significância em adultos.

### **1.1.4 Origem do adipócito marrom**

Ao contrário do tecido adiposo branco, que possui uma origem mesenquimal, o tecido adiposo marrom tem origem e desenvolvimento diferentes. Em animais como ratos e camundongos, o tecido adiposo marrom desenvolve-se após o nascimento, pois possuem o

eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) imaturo e não fazem termogênese independente de tremores, de modo que os filhotes se aninharam entre si para poderem aumentar ou manter a temperatura corporal. Já em humanos, que nascem com o eixo HPA desenvolvido, eles possuem o tecido adiposo marrom desenvolvido, responsável pela termogênese (SYMONDS, 2013), e sua origem é semelhante àquelas das células musculares esqueléticas, e seus progenitores que expressam o fator *Myf5* no início do desenvolvimento das células como demonstrado por SEALE e colaboradores (2008). Este mesmo grupo demonstrou que a PRD1-BF-1-RIZ1 (*PRD1-BF-1-RIZ1 homologous domain-containing protein-16, PRDM16*) é um regulador dominante para a diferenciação do tecido adiposo marrom, pois sua ausência em culturas primárias de tecido adiposo marrom induz mudança fenotípica para músculo esquelético, enquanto sua expressão em mioblastos诱导 fenótipo de tecido adiposo marrom. PRDM16 é responsável pela expressão de genes termogênicos tais como UCP1 e PGC-1 $\alpha$ , genes mitocondriais, entre outros (KAJIMURA et al., 2008; SEALE et al., 2007, 2008). Ele também induz o fenótipo de tecido adiposo marrom não por uma ligação direta com o DNA por meio de dedos de zinco, mas sim por meio de interações proteína-proteína, sendo responsável também por co-ativar a atividade transcrecional de PGC-1 $\alpha$  e PGC-1 $\beta$ , assim como PPAR $\alpha$  e PPAR $\gamma$  por uma ligação física direta (SEALE et al., 2007, 2008). Além da supressão dos marcadores de diferenciação para tecido muscular esquelético, PRDM16 também suprime marcadores seletivos para tecido adiposo branco, tais como resistina e angiotensinogênio, atuando por meio de sua associação com os co-repressores CtBP1 e 2. E a ligação de PRDM16 com PGC-1 $\alpha$  ou PGC-1 $\beta$  forma um complexo que desassocia PRDM16 dos CtBPs e permite que o novo complexo ative a expressão de genes característicos de tecido adiposo marrom, como o próprio PGC-1 $\alpha$  (KAJIMURA et al., 2008).

E semelhante, porém, ao tecido adiposo branco, a expressão de PPAR $\gamma$  também é importante nesse tecido, e os fatores C/EBPs também tem papel relevante em seu desenvolvimento. Estudos mostraram que a indução da expressão de C/EBP $\beta$  é capaz de reprogramar células de linhagem pré-adipócitas murinas 3T3-L1, conhecidas por se diferenciarem com estímulos adequados em adipócitos brancos, para a expressão de um padrão gênico semelhante ao tecido adiposo marrom, por meio da expressão da proteína desacopladora 1 (*uncoupling protein 1, UCP1*) e do co-ativador 1 $\alpha$  de PPAR $\gamma$  (*PPAR $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$ , PGC-1 $\alpha$* ) (KARAMANLIDIS et al., 2007).

Outro regulador relevante para a diferenciação do tecido adiposo marrom é o co-ativador de PPAR $\gamma$  1 $\alpha$  (*PPAR $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$ , PGC-1 $\alpha$* ). Sua expressão se dá principalmente

pela exposição crônica ao frio, mediado pela via de PKA-CREB (HERZIG et al., 2001; CAO et al., 2004), e regula a biogênese mitocondrial, expressão de componentes de vias de  $\beta$ -oxidação e genes termogênicos, como a UCP1 (PUIGSERVER, 1998). A regulação de PGC-1 $\alpha$ , por sua vez, acontece por meio de diversas outras moléculas, como o co-repressor nuclear RIP140, que antagoniza a função de PGC-1 $\alpha$  (SETH et al., 2007; HALLBERG et al., 2008), e membros da família de co-ativadores do receptor de esteróides (*steroid receptor coactivator, SRC*) SRC-1, SRC-2 e SRC-3, que possuem algumas funções semelhantes e outras distintas no controle do metabolismo energético e desenvolvimento do tecido adiposo marrom (LOUET e O'MALLEY, 2007). Enquanto que animais *knockout* para o gene de SRC-1 apresentam termogênese prejudicada e uma redução dos níveis de UCP1, animais *knockout* para SRC-2 apresentam uma melhora em sua capacidade de gasto energético e uma melhor termogênese adaptativa. Observou-se também que SRC-1 melhora a co-ativação por PGC-1 $\alpha$  da atividade transcrecional de PPAR $\gamma$ , enquanto que SRC-2 seria responsável pela inibição dessa interação (PICARD et al., 2002). Animais *knockout* para SRC-3, por sua vez, apresentam adipócitos com múltiplas gotículas lipídicas e uma grande concentração mitocondrial, uma vez que SRC-3 é responsável pela indução de uma acetiltransferase que reprime a atividade transcrecional de PGC-1 $\alpha$  (COSTE et al., 2008; LERIN et al., 2006; LOUET e O'MALLEY, 2007). Sua ausência, assim, diminui a acetilação de PGC-1 $\alpha$ , levando a um aumento da biogênese mitocondrial. De maneira geral tem-se, então, que PGC-1 $\alpha$  possui um papel fundamental no desenvolvimento e na função do tecido adiposo marrom, de forma que sua ausência reduz a capacidade termogênica adaptativa deste tecido.

Existem ainda outros sistemas e moléculas responsáveis por influenciar o aparecimento e funcionamento do tecido adiposo marrom. Sabe-se que este tecido é ricamente inervado pelo sistema nervoso simpático, e tem na noraepinefrina um grande regulador de suas funções. A noraepinefrina é responsável tanto pela proliferação quanto diferenciação do tecido adiposo marrom em roedores, e sua administração crônica aumenta a massa e o número de células presentes no tecido, assim como um aumento da expressão de UCP1 (GELOEN et al., 1988). Os efeitos da noraepinefrina no tecido adiposo marrom são dependentes dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos, que possui 3 subtipos dentro de sua família ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$  e  $\beta 3$ ) expressos no tecido adiposo marrom, com o receptor  $\beta 3$ -adrenérgico sendo o mais abundante, embora possuam papéis complementares e que se sobreponham muitas vezes. Animais que não expressam receptores  $\beta$ -adrenérgicos apresentam tecido adiposo marrom com colarização pálida em relação aos animais controle, além da redução na expressão de UCP1 e na

capacidade termogênica, assemelhando-se inclusive morfologicamente ao tecido adiposo branco (BACHMAN et al., 2002).

Outros reguladores do tecido adiposo marrom são os hormônios tireoidianos (HT), que atuam por meios endócrinos e parácrinos. Tanto o tecido adiposo marrom quanto os pré-adipócitos expressam grandes quantidades da enzima DIO2, responsável pela conversão de T4 em T3, que por sua vez aumenta a expressão de UCP1 (LEE et al., 2011). Os HT também atuam em vias nervosas centrais na regulação do balanço energético mediada pelo sistema nervoso simpático, pois o aumento de T3 no espaço intracerebroventricular aumenta a atividade termogênica do tecido adiposo marrom e diminui o peso corporal em roedores, assim como a inibição de receptores de HT centrais levam à inativação do tecido adiposo marrom e ao ganho de peso (LÓPEZ et al., 2010).

### **1.1.5 Tecido adiposo bege**

Além do branco e marrom, um terceiro tipo de tecido adiposo denominado bege foi descrito recentemente. Animais expostos de forma crônica ao frio ou à sinalização adrenérgica apresentam, em depósitos de tecido adiposo branco, centros de células termogênicas com estrutura semelhante a adipócitos marrons. Estas células induzidas são chamadas de adipócitos bege, e surgem em um processo conhecido como “*browning*” do tecido adiposo branco. Enquanto o sistema nervoso simpático, responsável pelos estímulos  $\beta$ -adrenérgicos, é responsável pela distribuição de sinal entre os tecidos adiposos brancos e marrons, sua influência no processo de *browning* é relativamente diferente do que ocorre com a exposição crônica ao frio (ROSEN e SPIEGELMAN, 2014).

### **1.1.6 Origem do adipócito bege**

A origem embrionária deste tecido é distinta daquela do tecido adiposo marrom e, atualmente, há duas teorias para sua origem: a primeira é baseada em evidências que esses adipócitos derivariam de uma transdiferenciação de adipócitos brancos maduros, por meio de uma exposição crônica ao frio ou tratamento com agonistas  $\beta$ -adrenérgicos, para adipócitos multiloculados e com alta densidade mitocondrial (HIMMS-HAGEN et al., 2000; VITALI et al., 2012); e a segunda se baseia em experimentos de *sorting* celular e defende que os adipócitos bege derivam de células precursoras própria que se encontram na fração estromal do tecido adiposo branco (LEE et al., 2012; SCHULZ et al., 2011). Em concordância com esta segunda teoria, Spiegelman e colaboradores clonaram linhagem celulares de pré-

adipócitos a partir da fração vascular estromal (SVF) de tecido adiposo branco subcutâneo, e identificaram por meio de análise genética e de diferenciação celular, dois tipos de pré-adipócitos: brancos e beges. Ambos os tipos celulares quando diferenciados para adipócitos sob condições normais de temperatura mostravam-se sem capacidade termogênica, porém, quando tratadas com agonistas  $\beta$ -adrenérgicos, somente os adipócitos bege eram capazes de expressar os genes termogênicos e apresentaram marcadores de superfície específicos para seu tipo celular, como Tmem26 e Cd137 (WU et al., 2012). Assim, exposição crônica ao frio, que desencadeia a ativação  $\beta$ -adrenérgica, é capaz de iniciar a diferenciação de pré-adipócitos que contém os marcadores Tmem26 e Cd137, para adipócitos beges capazes de expressar UCP1, e necessitam de um estímulo constante para a manutenção de seu perfil termogênico.

A plasticidade destes adipócitos beges foi demonstrada em experimentos em que sua resposta à exposição ao frio, e o retorno ao perfil de expressão e morfologia semelhante ao de adipócitos brancos assim que o animal retornava a condições de temperatura ambiente, em um movimento chamado de interconvenção bi-direcional (ROSENWALD et al., 2013). Isto é, uma subpopulação de células potencialmente termogênicas que podem se modificar conforme as demandas das condições ambientais.

Assim como ocorre no tecido adiposo marrom, PRDM16 é responsável pela diferenciação e manutenção da expressão de genes termogênicos, em especial UCP1, por meio da ligação e modulação de PPAR $\gamma$  e PGC-1 $\alpha$ . No tecido adiposo bege, sua deleção leva ao bloqueio da expressão do programa termogênico de adipócitos subcutâneos em resposta a agonistas  $\beta$ -adrenérgicos e de ativação PPAR $\gamma$ .

Inicialmente acreditava-se que o sistema nervoso simpático era o único responsável pela indução da termogênese no tecido adiposo marrom e bege e capaz também de induzir a adipogênese dos adipócitos bege; porém, estudos demonstraram que hormônios e outros fatores também são capazes de regular esses fenômenos. Spiegelman e colaboradores demonstraram recentemente que a ativação de PGC-1 $\alpha$  no músculo esquelético leva ao aumento na expressão de Fndc5, uma proteína de membrana que é também secretada e atua como hormônio, chamada de irisina. Esta, por sua vez, atua diretamente no tecido adiposo branco, estimulando a expressão de UCP1 e levando a ativação do programa termogênico desse tecido (BOSTRÖM et al., 2012). A produção de irisina está diretamente relacionada ao aumento do exercício físico em animais e humanos, porém, seu mecanismo de ação ainda é pouco esclarecido.

Outro hormônio responsável pela ativação do programa termogênico é o fator de crescimento de fibroblastos 21 (*fibroblast growth factor 21, FGF21*), descrito por regular os níveis de energia sistêmica do organismo, e sua expressão aumenta também durante a exposição crônica ao frio, e a indução do processo de *browning* pelo aumento de PGC-1 $\alpha$  no tecido adiposo branco (CHARTOUMPEKIS et al., 2011; HONDARES et al., 2011; KLEINER et al., 2012).

Tendo em vista esses três tipos de tecido, assim como sua formação e seus reguladores, aumentar a compreensão do funcionamento dos tecidos adiposos marrom e bege, e dos mecanismos de regulação do programa termogênico como forma de perder gorduras, é essencial para desenvolver terapias eficientes ao combate à obesidade e também doenças relacionadas, como diabetes mellitus tipo 2.

## 1.2 Mitocôndrias e termogênese

A grande característica do tecido adiposo marrom e bege é sua capacidade de oxidar glicose e ácidos graxos para a produção de calor. Este é um processo diretamente relacionado às mitocôndrias, e a compreensão dessa organela é fundamental para se compreender a termogênese independente de tremores (*non-shivering thermogenesis*), como é conhecida a termogênese destes tecidos.

A mitocôndria é uma organela citoplasmática encontrada nos animais eucariotos, extremamente dinâmica, com características marcantes em sua estrutura: possui duas membranas, uma externa e outra interna, e esta se encontra dobrada em forma de cristas que aumentam sua área de superfície. Possui ainda um espaço intermembranar e intercristas, assim como uma matriz rica em proteínas, além de material genético próprio, semelhante àquele de procariotos. Por causa disso, na década de 1960, foi proposta a teoria endossimbiontica por Lynn Margulis. A partir de estudos genéticos, conseguiu-se identificar a  $\alpha$ -proteobacteria como progenitora da mitocôndria; a proposta de Margulis não era nova, tendo esta teoria sendo proposta muito antes durante o século XIX e início do século XX, porém, ela agora defendia que a origem das mitocôndrias a partir de um progenitor procariótico foi um passo decisivo e benéfico para a célula eucariótica., pois sugeria que a origem de eucariotos se deu por uma necessidade dos diferentes organismos de sobreviver em um ambiente rico em oxigênio (GRAY e DOOLITTLE, 1982; GRAY, 2017).

### **1.2.1 Mitocôndrias e vias metabólicas**

Descritas no meio do século XIX, o papel da mitocôndria no metabolismo celular começou a ser esclarecido somente no começo do século XX. Battelli e Stern mostraram em estudos com desidrogenases que a oxidação biológica está associada a estruturas celulares insolúveis, e logo depois Warburg reportou que a respiração celular também estava associada a algumas partículas, chamando-as de “grana”, e que seu papel era aumentar a atividade de uma “enzima respiratória” (ERNSTER e SCHATZ, 1981). Em 1937, Krebs descreveu o ciclo do ácido cítrico, e Kalckar demonstrou a fosforilação aeróbica. Mais tarde Belitser e Tsybakova deduziram em experimentos com tecido muscular que pelo menos duas moléculas de ATP eram produzidas por átomo de oxigênio consumido, ligando a fosforilação com a respiração celular; em 1949, Friedkin e Lehninger deram evidências concretas da cadeia respiratória com a fosforilação, a partir do uso de NADH como substrato energético (ERNSTER e SCHATZ, 1981).

Nas vias metabólicas, os substratos energéticos celulares geram, como produto final, adenosina trifosfato (*adenosine tri-phosphate*, ATP), a “moeda energética” da célula, já que a desfosforilação de ATP é responsável por todas as funções celulares com gasto energético. O catabolismo de lipídeos, carboidratos e proteínas leva à produção de ácidos graxos, glicose e aminoácidos respectivamente, e estes vão gerar produtos que convergem para o ciclo do ácido cítrico (também conhecido como ciclo de Krebs), sendo finalmente oxidados em CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O. A maior parte dos lipídeos e carboidratos são degradados e formam acetil-coA, o principal substrato do ciclo de Krebs. Os aminoácidos também podem ser degradados para formação de acetil-coA, mas originam ainda outros substratos que entram em outros pontos nessa cadeia (NELSON e COX, 2008, p. 616).

Durante a catabolização dos carboidratos, o piruvato formado é transportado para dentro da mitocôndria pelo transportador piruvato translocase. Ali ocorre sua descarboxilação por meio do complexo piruvato desidrogenase, que libera CO<sub>2</sub> e uma molécula de NADH, e formando a acetil-coA: uma molécula com grupo acetil ligado a uma coenzima A. E ao doar seu grupo acetil para oxaloacetato gera citrato e entra efetivamente no ciclo de Krebs (NELSON e COX, 2008, p. 620). Essa reação é intermediada pela citrato sintase, presente na matriz mitocondrial, que além da formação de citrato, libera coenzima A e uma molécula de NADH (WIEGAND e REMINGTON, 1986). Por isso, muitos estudos usam a atividade de citrato sintase como marcador de densidade mitocondrial (LARSEN et al., 2012).

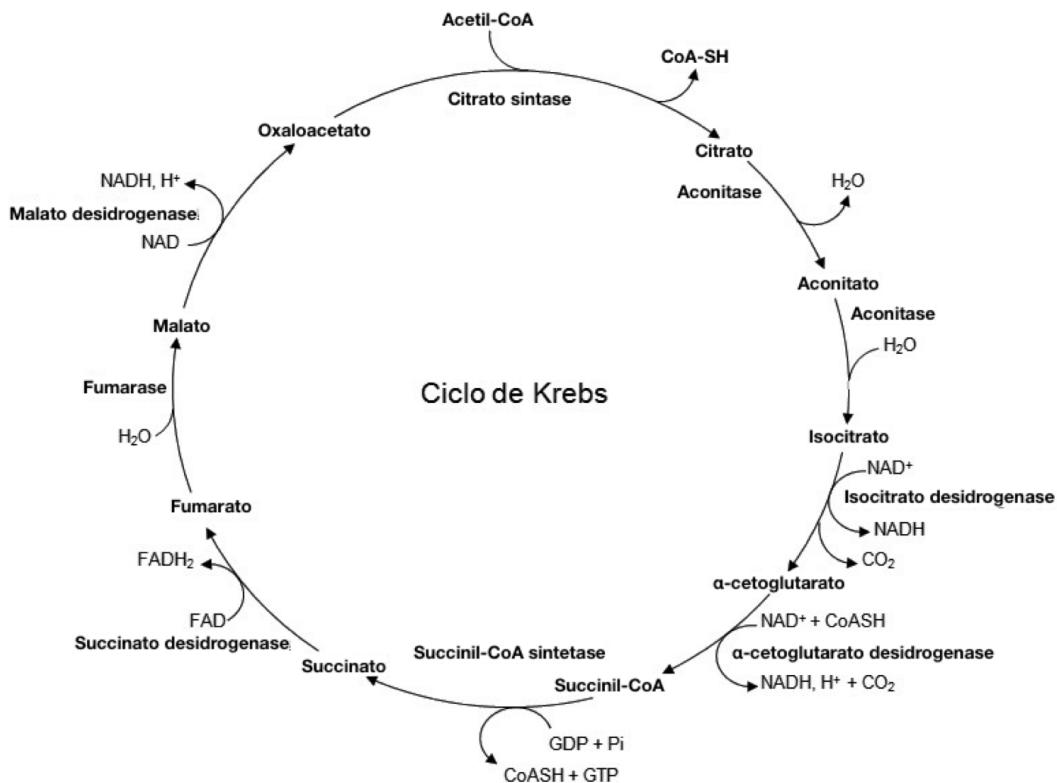


Figura 1: Ciclo de Krebs, com respectivos substratos e enzimas do processo que ocorre na matriz mitocondrial, e NADH e FADH<sub>2</sub> resultantes são encaminhados para a cadeia respiratória presente na membrana mitocondrial interna. Imagem adaptada de <http://fisiolvegetal.blogspot.com/2012/11/respiracion-ii-ciclo-de-krebs.html>, acessado em 17 de outubro de 2018.

Após a formação do citrato, os próximos dois passos no ciclo de Krebs são a formação de isocitrato, com este rapidamente sendo descarboxilado para a formação de  $\alpha$ -cetoglutarato, novamente com a transferência de um elétron para um NAD<sup>+</sup>, gerando um NADH. A próxima reação também tem a formação de mais um NADH, dessa vez com a descarboxilação do  $\alpha$ -cetoglutarato para a formação de succinil-coA. A conversão tem succinil-coA tem a formação do primeiro ATP do ciclo de Krebs, e a desidrogenação desse succinil-coA leva a formação de fumarato com um próton sendo doado para um FADH<sub>2</sub>. O fumarato é hidratado em malato, e esse malato é oxidado em oxaloacetato em uma reação que gera mais um NADH. Todo esse processo se dá no interior da matriz mitocondrial, com as enzimas presentes tanto na matriz quanto na membrana interna mitocondrial, como é o caso da enzima que desidrogeniza o succinato e gera o fumarato (figura 1) (NELSON e COX, 2008, p. 621-630).

Os ácidos graxos são catabolizados para entrarem no ciclo de Krebs em processo denominado  $\beta$ -oxidação. Ácidos graxos com 12 carbonos ou menos conseguem atravessar as membranas mitocondriais, porém a maioria dos ácidos graxos intracelulares apresentam 14

carbonos ou mais, de forma que eles são transportados através da membrana externa e interna da mitocôndria pela ligação à carnitina e com gasto energético (NELSON e COX, 2008, p. 650-652). A  $\beta$ -oxidação começa pela desidrogenação do ácido graxo, em que há a perda de elétrons para produção de FADH<sub>2</sub>, em um processo que ocorre na membrana mitocondrial interna. Segue-se então pela hidratação da molécula, e mais uma desidrogenação, sendo que NAD<sup>+</sup> agora é o acceptor, formando NADH. Finalmente há a transferência de uma coenzima A para a molécula, liberando o fim do terminal carboxila para que um acetil-coA seja formado (NELSON e COX, 2008, p. 652-656).

Assim, em uma reação com palmitoil, um ácido graxo contendo 14 carbonos, por exemplo, há a formação de 8 acetil-coA, 7 moléculas de FADH<sub>2</sub> e 7 moléculas de NADH, além de 7 H<sup>+</sup>. As moléculas de acetil-coA vão ser direcionadas todas para o ciclo do ácido cítrico, que gera 3 NADH e 1 FADH<sub>2</sub>, que são direcionados para a cadeia respiratória, além de um ATP (NELSON e COX, 2008, p. 654-655). Esta eficiência energética obtida com a mobilização de ácidos graxos é superior àquela obtida com os carboidratos e justifica o tecido adiposo branco ser reconhecido como reserva energética.

A cadeia respiratória consiste em uma sequência de carreadores de elétrons, muitos dos quais são proteínas com grupos prostéticos capazes de aceitar ou doar elétrons e todas presentes nas cristas mitocondriais. Estes carreadores de elétrons recebem elétrons de NADH e FADH<sub>2</sub> e os passam entre si por meio de um gradiente até que, na presença de O<sub>2</sub>, ocorra a produção de ATP. O primeiro passo da cadeia respiratória se dá pela transferência dos elétrons de NADH para o complexo I (NADH:ubiquinona oxirredutase), ou de FADH<sub>2</sub> para o complexo II (succinato:ubiquinona oxirredutase), e estes vão doá-los para a ubiquinona, chamada também de coenzima Q (ou Q), que é uma enzima lipossolúvel, capaz de se mover pela membrana mitocondrial interna para transportar os elétrons para o próximo complexo na cadeia. Uma vez que ela pode carregar tanto prótons quanto elétrons, a ubiquinona possui papel central em acoplar o fluxo de elétrons com o movimento dos prótons. Desta forma, o complexo I atua como uma bomba de prótons regulada pela transferência de elétrons, levando a matriz a ficar negativamente carregada, enquanto que o espaço intermembranas se torna positivamente carregado. A ubiquinona, por sua vez, transfere esses elétrons para o complexo III (ubiquinol:citocromo *c* oxirredutase), também conhecido como complexo de citocromo *bc*<sub>1</sub>, composto pelos citocromos *b* e *c*. O complexo IV (citocromo *c* oxidase) realiza a passagem dos elétrons do citocromo *c* para o oxigênio, reduzindo-o à água (NELSON e COX, 2008, p. 710-718) (*figura 2*).

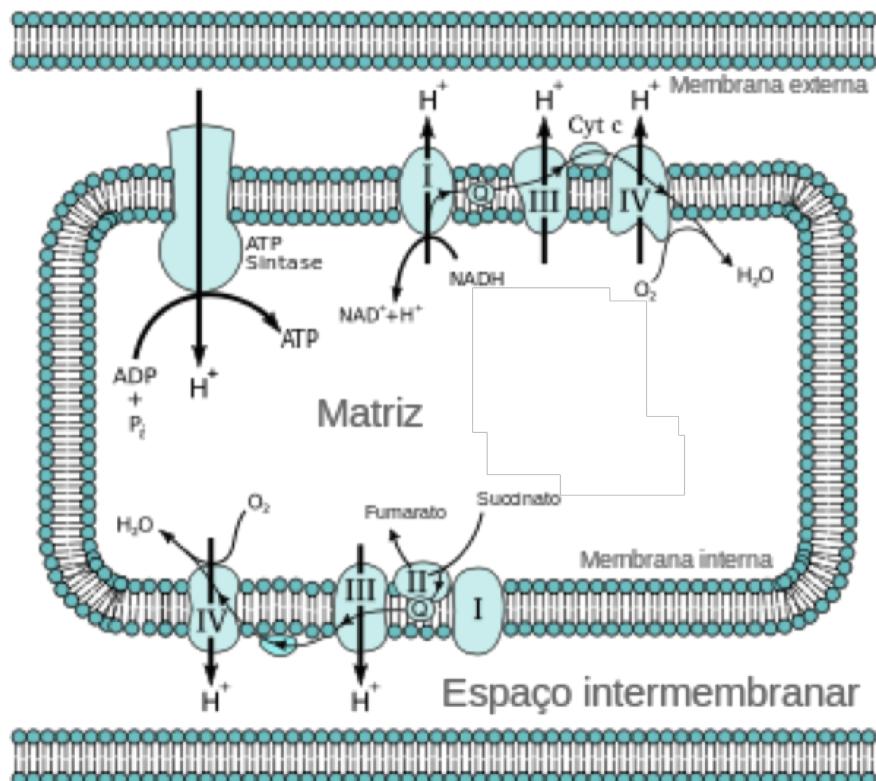


Figura 2: Complexos que compõem a cadeia respiratória de elétrons: o complexo NADH:ubiquinona redutase (complexo I), com passagem de 4 prótons para o espaço intermembranar, o complexo succinato-ubiquinona redutase (complexo II), sem passagem de prótons, complexo ubiquinol-citocromo *c* (complexo III), com passagem de mais 2 prótons para o espaço intermembranar, o complexo citocromo *c* oxidase (complexo IV), com consumo de oxigênio e formação de água. A ubiquinona (Q) e o citocromo *c*, responsáveis pelo carreamento de elétrons até o complexo IV. Há ainda a presença da ATP-sintase, responsável por sintetizar um ATP através do retorno de prótons, possibilitando a formação do gradiente de prótons que compõe a cadeia respiratória.

Adaptado de <https://www.scienceprofonline.org/publishImages/metabolism~electron-transport-chain-cellular-respiration-2~element143.jpg>, acessado em 18 de outubro de 2018.

A diferença na concentração de prótons é responsável pela atividade da enzima ATP-sintase, que é composta por duas partes, uma presa à membrana mitocondrial interna, e uma do lado da matriz mitocondrial. A primeira, acoplada à membrana mitocondrial interna, é responsável pela passagem de prótons do espaço intermembranas para a matriz, enquanto que a segunda, presente na matriz mitocondrial, é capaz de rotacionar por conta da força próton-motriz, onde a passagem do próton pela primeira parte da proteína, leva a rotação da segunda parte, permitindo a fosforilação de um ADP, gerando um ATP (JONCKHEERE et al., 2012).

### 1.2.2 Morfologia e função mitocondrial

A mitocôndria é conhecida como uma organela extremamente dinâmica envolvida em diversos processos, como a respiração celular, apoptose e metabolismo, e sua estrutura em forma de redes alongadas é alterada por fusão e fissão em resposta às necessidades celulares e

para modular suas funções (TWIG et al., 2008). A fusão mitocondrial aumenta sua conectividade e permite redistribuição de metabólitos, proteínas e o próprio material genético mitocondrial pelas novas redes formadas (SANTEL et al., 2003); a fissão, por sua vez, permite a eliminação de mitocôndrias disfuncionais, que se desconectam da rede formada e são eliminadas pela mitofagia (ROMANELLO e SANDRI, 2015). Ativação de vias de autofagia, por exemplo, acabam por induzir alongamento das mitocôndrias em formas de rede, protegendo-as da degradação e levando a um aumento da produção de ATP para aumentar a eficiência de conversão energética em privação de nutrientes (GOMES et al., 2011). A situação oposta, onde há um excesso de nutrientes, leva a fragmentação mitocondrial, o que aumenta a dissociação da fosforilação oxidativa da produção de ATP (MOLINA et al., 2009).

### **1.2.3 PGC-1 $\alpha$ e a biogênese mitocondrial**

A biogênese mitocondrial pode ser definida como o crescimento e divisão de mitocôndrias já existentes em determinada célula, podendo ocorrer a partir de estímulos estressores como exercício físico, restrições calóricas, baixas temperaturas, estresse oxidativo, divisão, renovação e diferenciação celular, com variações no tamanho e massa mitocondrial (JORNAYVAZ e SCHULMAN, 2010). PGC-1 $\alpha$ , o primeiro membro da família a ser descrito (PUIGSERVER et al., 1998), possui forte atividade transcrecional, pois mesmo sem ter atividade de histona acetil-transferases (*histone acetyltransferases, HAT*), conseguem se ligar a diversas proteínas que possuem as HATs, como SRC-1 (PUIGSERVER et al., 1999). A atividade de PGC-1 $\alpha$  também é regulada por sua fosforilação direta, como feita pela AMPK, que não só é capaz de induzir a transcrição de PGC-1 $\alpha$  como também pode ativá-lo ao fosforilar a treonina-177 e serina-538 (JAGER et al., 2007). Por outro lado, o estímulo com insulina diminui a transcrição de PGC-1 $\alpha$  e também a inibe pela fosforilação na serina-570 por meio da Akt, inibindo-a de outra forma (SOUTHGATE et al., 2005; LI et al., 2007).

No tecido adiposo marrom, a ativação de receptores  $\beta$ -adrenérgicos acoplados a proteínas G aumentam a atividade de PKA, que fosforila CREB, e o aumento também induz a ativação de p38 MAPK, que fosforila e estabiliza PGC-1 $\alpha$  (CAO et al., 2001; PUIGSERVER et al., 2001; AKIMOTO et al., 2005). CREB é conhecido por induzir a expressão do programa gliconeogênico por meio de PGC-1 $\alpha$ , e sua ausência acaba por reduzir a expressão de PGC-1 $\alpha$ , que contém em sua região promotora um sítio CRE (*Figura 3*), enquanto que a superexpressão de PGC-1 $\alpha$  leva a retomada do programa gliconeogênico (HERZIG et al.,

2001). A região promotora de PGC-1 $\alpha$  possuí ainda regiões onde elementos responsivos à insulina se ligam, sendo estes ativados pelo *forkhead box class-O* (FoxO1), que é regulado por sua vez por Akt. A sinalização por insulina ativa Akt, que fosforila FoxO1, levando a

```

TCTCATTCACTCTACAAATCAGTTAAAATGGACTTCTATAGCAGCAGAAAACACAAGGGGAAGAGGGCAG
CGTGTCTGTGTTCATGCCCTGTGCTCTCTAGCTTCACATACCCCTTTATGAAGGTAGAGGACAG
AGTGGCTGTTAAGCAGATCATTAGCTTCACTGGATGTGCTGGGTTAGTTCTTTCTTTCTTTCTTT
TCTTTTTAAAGTAGAATTAGGGGGCAAAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAATTATCTT
TCAAAGCAAAGAAAAGAAAATCCGCCACAATTCACTGGATGTGAGCAAGTTAAGATATCFoxO1ATATGC
AGAGTTATCTAGTCAAGCAACCACCTGTAAAGAAGAGGTGTGATGAGGTTGAAAAAGTATGGTGGATG
CCTAATGGATGACAAAGAGAAAAGCAAAGTATCACTGGCCAGCATTATTCACAGTTGACTGTGTTGAAAGTAGAGCC
AATAAACATCGACTCTTATAGCTAAGTGGCCAGCATTATTCACAGTTGACTGTGTTGAAAGTAGAGCC
CATGACCTTGTCTGAATTAAAGTTACTGAAGTTTACATTAAGTAAAATCTAATTGGCAAGAA
AAATTAGTGTCTTGTGGGAGTACAGAGTAAGGCTACTAATTGCATGTAGAAAATGATCCCAGGGTTG
TCTCTCTCTCTCTGAATTAGAAAATTAAAGATAATACCTTCTGATGTTGAAAGAGGACAGTTGT
AGCAGTGAAGTATATTCACTTAATTAGTCAAGCTGTGGCCATCTGTTGTTCACTTATTGA
CAAACGTGCGATTTCATTACCATATTCCCTGTCTACTAGTTGTGGACATCCAAGCAAACAGACCCCTTAT
ACGGGGTCTGAAGCAAACAGCAAGCTTGTGGGCTTTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
GTGTGTGTGTGTGCACGCTCGCTGCATTCTTCTTCACTTTACTGTATTAGTAACTGACTATATAA
AGTCAGACTGAGAGAAAGTCACCAATGTTTCTCTAAGGGAGAGAAAATAAAGAGCACATTAAATTAA
CCTCAGTGGAAATGGAGTTAAATGAATGGTCTTTATAAATTATATTAGATGCATAGGGACTTTTTC
TTCTCTAAATTACTGTCAAGTAAAGGAAATGAGCTGGTTTGAGCTGTGGGTTGAGGTATTGTGA
AAAATGTTTCAAGGTCCCCGTGCATTCTCACTGGGCTGGAGGGTTAAGTCTGAGCACCCAAAGT
GTTATGGAAAGTGCTGAGAGTTGGTTATGCTCTGTCTGTAATGTCACAGGAAAACAGTGGCACCTGC
ATTACCCCTCATTGACTCAGGAACGACAAAAAGTATTAGTAAGCAGCTCAAGAAATGAGTATCTCTG
CTGATACCAATTCACTGTTTCCCTGACATTCCCTGGACATTCTGATTCAAAACAAACTGTACAGCCC
AAGGCACTAGGGTGGAGTCCAATGTTTATTCAAAAGGCACCCCTGAAGCCATGAGGAAGACTGTGCTAC
ATATGAGAAAAGAAAATAAGGGTGGGGCAGGTGAGTAGCTAAGCTGTTCAAGGATGGCAGCAGCAATT
GTATTCTAGCATTGTTCTGGGAGCTATGAGATCCACGGAAAAGAATCATGAGGGGGAAACCCAAAG
GTCTAGGGTGTGCTGCTTACAAGGAGCAAGGCAAACACTGCAGTAACAGTTAGGAGACTG
ATTCTCTACTGCCAAGGAGACAGCTGATTGGGTAGAGAAAATTGTTAGACCTAAACAAATGTGGCG
TTTGTGACTAAACATGGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAA
GAAACAAAGAAAAGAAAAGAGGAAGGAAGGAAGGAAGAAAAGGAAGGAAGGAGAGGAAGGAAGGAAGG
AAAGAAAGGAGAGAGAGAAAATCGGGGTGTTGCTTCAAACACTCCTCTAATAGGGAGGGAAAAA
AAAGAATCTCATGAAAATGTATCACATGAGGAGCGCTTGCTTCAAGCTGAGTCTGGGACTCT
GGAAACCATTTCTAAAGCACACATTTAGGCAAGGGTGTAGTTACTGTGTCAGTAACAGGGATCTT
TGCTATTTGCTGTTGGATGGAAAATAATTAAAAAAAGATTGCAAGGAGATTGAGTTATTATG
TGAGCAGGGCTCCGGTTAGAGTTGGTGGCATTCAGCTGGCTCAGTCACAGTGTGATGCTGAGCC
TCCCAAAGGCCAGTGTCTGGAGTCREGCRE
TGAGGCAGAGGGCTGCCCTGGAGTCREGCRE
GGGTGAGTGACCREGCRE
CCTTCAGTTCACTCTCAGTAAGGGCTGGGCTGGCTGCATGAGTGTGCTGTGTCAGAGTGGATTGGA
GTTGAAAAAGCTGACTGGCGTCATTGGAGCTGGATGGCTGGACATGTGAGCAGCCAAAGACTCTGTAT
GGAGTGACATAGAGGTGAGCTGGGCTGAGTATTGCAAGGACGGAGCTCTCAGATGCAATGATTCC

```

Figura 3: Região promotora de PGC-1 $\alpha$ . Em negrito, região do promotor de -2,533 bp a +78 bp, como descrito por HANDSCHIN e colaboradores (2003); em sublinhado, os *binding sites* para FoxO1 e CREB.

supressão da expressão de PGC-1 $\alpha$ , uma vez que não há ligação dele com os elementos responsivos à insulina na região promotora de PGC-1 $\alpha$  (SOUTHGATE et al., 2005). De maneira geral, o estímulo de PGC-1 $\alpha$  aumenta a capacidade enzimática para que ocorra a  $\beta$ -oxidação, o ciclo do ácido cítrico e a fosforilação oxidativa, uma vez que o número de mitocôndrias e seu volume geral aumentam por conta da biogênese promovida por esse co-ativador. A ausência de PGC-1 $\alpha$  não é capaz de abolir a diferenciação do tecido adiposo marrom, devido a presença de PGC-1 $\beta$ , mas o tecido não consegue desenvolver seu aparato termogênico. Quando ambos os genes se tornam ausentes, porém, o tecido não se diferencia, o que demonstra um papel complementar entre os co-ativadores para que aconteça a biogênese dependente de diferenciação (ULDRY et al., 2006).

Na mitocôndria, as cristas são uma das partes mais dinâmicas e reúnem os supercomplexos, que são as proteínas da cadeia respiratória, e permite que o transporte de elétrons ocorra de forma mais eficiente. Experimentos demonstraram dímeros de ATP-sintase na parte mais curvada da crista mitocondrial (STRAUSS et al., 2008; DAVIES et al., 2011; DUDKINA et al., 2005), enquanto que o complexo I encontra-se em qualquer um dos lados

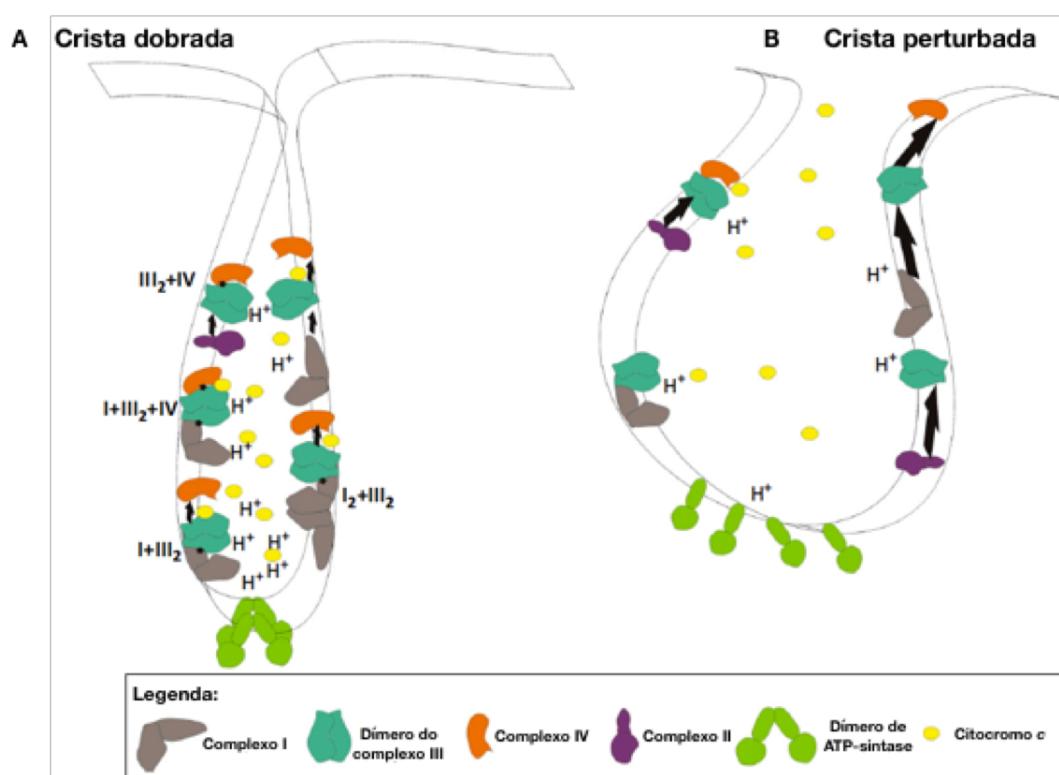


Figura 4 - Posicionamento das cristas mitocondriais. O dinamismo das cristas permite a formação de supercomplexos (A), com dímeros da ATP-sintase localizando-se na curva da crista mitocondrial em uma espécie de “gargalo”, permitindo a formação do gradiente de prótons necessário para a formação do ATP e funcionamento geral da cadeia respiratória de elétrons. Imagem adaptada de COGLIATI, ENRIQUEZ e SORANO, 2016.

lisos da membrana (DAVIES et al., 2011). Assim, o posicionamento da ATP-sintase situado na curva da membrana, com os outros complexos situando-se ao redor, é fundamental para a criação de um gradiente de prótons, onde há um acúmulo destes na concavidade da crista mitocondrial (DAVIES et al., 2011) (*figura 4*). Desta forma, o consumo de prótons pela ATP-sintase seguiria esse gradiente, permitindo que os prótons seguissem um movimento em direção ao fundo da crista, em uma espécie de ralo para prótons, que seria a ATP-sintase. Assim, o formato das cristas mitocondriais possuí papel chave na cadeia respiratória.

#### **1.2.4 UCP1 e termogênese**

Estudos de termogênese do tecido adiposo marrom levaram a descoberta de uma outra proteína presente na cadeia respiratória mitocondrial chamada de proteína desacopladora (*uncoupling protein, UCP*), sendo renomeada de UCP1 após a descoberta de proteínas homólogas que atuam em outros tecidos, como baço, rins, pâncreas e músculo esquelético, assim como sistema nervoso central e cérebro, porém os mecanismos de desacoplamento ainda permanecem sem esclarecimento (LIU et al., 2013). A UCP1 é um canal que permite a passagem de prótons do espaço intermembranas para a matriz mitocondrial, o que desfaz a energia potencial acumulada e gerada pela cadeia respiratória, impossibilitando assim a formação de ATP e dissipando esta energia em forma de calor. Estudos demonstraram que a atividade de UCP1 é ativada na presença de ácidos graxos não esterificados, enquanto que nucleotídeos inibem sua atividade (RIQUIER e BOUILAUD, 2000).

A regulação de UCP1 no tecido adiposo marrom se dá por diferentes estímulos, entre eles a sinalização  $\beta$ -adrenérgica, induzida pela exposição crônica ao frio, que induz também biogênese mitocondrial, hiperplasia e hipertrofia do tecido (TRAYHURN et al., 1983; BARBATELLI et al., 2010). Animais expostos ao frio crônico (4°C), em um período de 3 a 7 semanas, apresentaram aumento da expressão de UCP1 tanto em depósitos de tecido adiposo branco quanto marrom, e este aumento foi relacionado ao aumento da produção de calor do tecido adiposo marrom. Esta coordenação do aumento de UCP1 com a biogênese mitocondrial é essencial para que o tecido realize termogênese, mas mantenha níveis de ATP estáveis na presença desse desacoplamento da diferença de potencial (LOWELL e SPIEGELMAN, 2000).

UCP1 pode ser induzido no tecido adiposo marrom tanto pela adição de AMPc quanto pela ativação da proteína quinase A (*protein kinase A, PKA*), e estudos com

tiazolidinedionas sintéticas, agonistas de PPAR $\gamma$ , mostraram que sua ativação promove tanto a diferenciação quanto a hipertrofia do tecido adiposo marrom *in vivo* (FOELLMI-ADAMS et al., 1996; TAI et al., 1996). Importante ressaltar que co-ativadores específicos regulam esta função tecido-específica de PPAR $\gamma$ , como por exemplo o PGC-1 $\alpha$ , responsável por modular a expressão de UCP1.

### 1.3 O sistema de sinalização RANK-RANKL-OPG

O sistema RANK-RANKL-OPG foi inicialmente descrito no remodelamento ósseo, onde o osso é remodelado constantemente por meio de síntese da matriz óssea por meio dos osteoblastos, e reabsorção, promovida pelos osteoclastos (BOYLE et al., 2003; KARSENTY e WAGNER, 2002). A perturbação desse sistema leva ao desenvolvimento de doenças como osteoporose ou osteopetrose. A osteoporose ocorre normalmente em pessoas idosas, principalmente mulheres, assim como pacientes imobilizados e até mesmo astronautas, por experimentarem gravidade zero, uma vez que um dos estímulos para a formação da matriz óssea é o impacto mecânico; a osteopetrose, por sua vez, decorre de desordens genéticas, marcada por grande densidade óssea.

O controle deste remodelamento, como dito anteriormente, e os fatores envolvidos no controle da formação de osteoclastos são o receptor ativador do fator nuclear  $\kappa$ B (*receptor activator of NF- $\kappa$ B, RANK*), seu ligante, RANKL, e o receptor *decoy* de RANKL, osteoprotegerina (OPG). Este sistema funciona de maneira que a ligação de RANKL com seu receptor RANK sinaliza o desenvolvimento de osteoclastos a partir de células mieloides hematopoiéticas progenitoras, e OPG regula negativamente esta ligação pois atua como receptor solúvel de RANKL, e inibe a formação de osteoclastos. O início das descobertas desses fatores se deu com OPG, quando este foi clonado como um inibidor da osteoclastogênese (TSUDA et al., 1997; SIMONET et al., 1997). Experimentos subsequentes mostraram que OPG é capaz de se associar com RANKL, e age como receptor *decoy* para esta molécula. O verdadeiro receptor de RANKL, porém, é RANK, sendo ele uma proteína transmembranar que foi clonada originalmente a partir de células dendríticas (ANDERSON et al., 1997). RANKL por sua vez foi clonado por quatro diferentes grupos, que demonstraram que esse fator é apresentado tanto como uma proteína de membrana como uma proteína secretada pela célula pela ação de uma enzima *sheddase* (BOYLE et al., 2003; ANDERSON et al., 1997; WONG et al., 1997; YASUDA et al., 1998). A diminuição na expressão de RANK e RANKL faz com que o indivíduo apresente um quadro de osteopetrose, pois há

ausência de osteoclastos, e estudos mostram a necessidade desses dois fatores para a osteoclastogênese (LI et al., 2000; KONG et al., 1999). A ausência de OPG, por outro lado, resulta em osteoporose, uma vez que há alta atuação dos osteoclastos presentes, resultando em uma acentuada fragilidade óssea (MIZUNO et al., 1998).

A ligação de RANKL a RANK ativa distintas cascatas de sinalização e controlam o comprometimento da linhagem celular para a formação de osteoclastos. Primeiramente, deve-

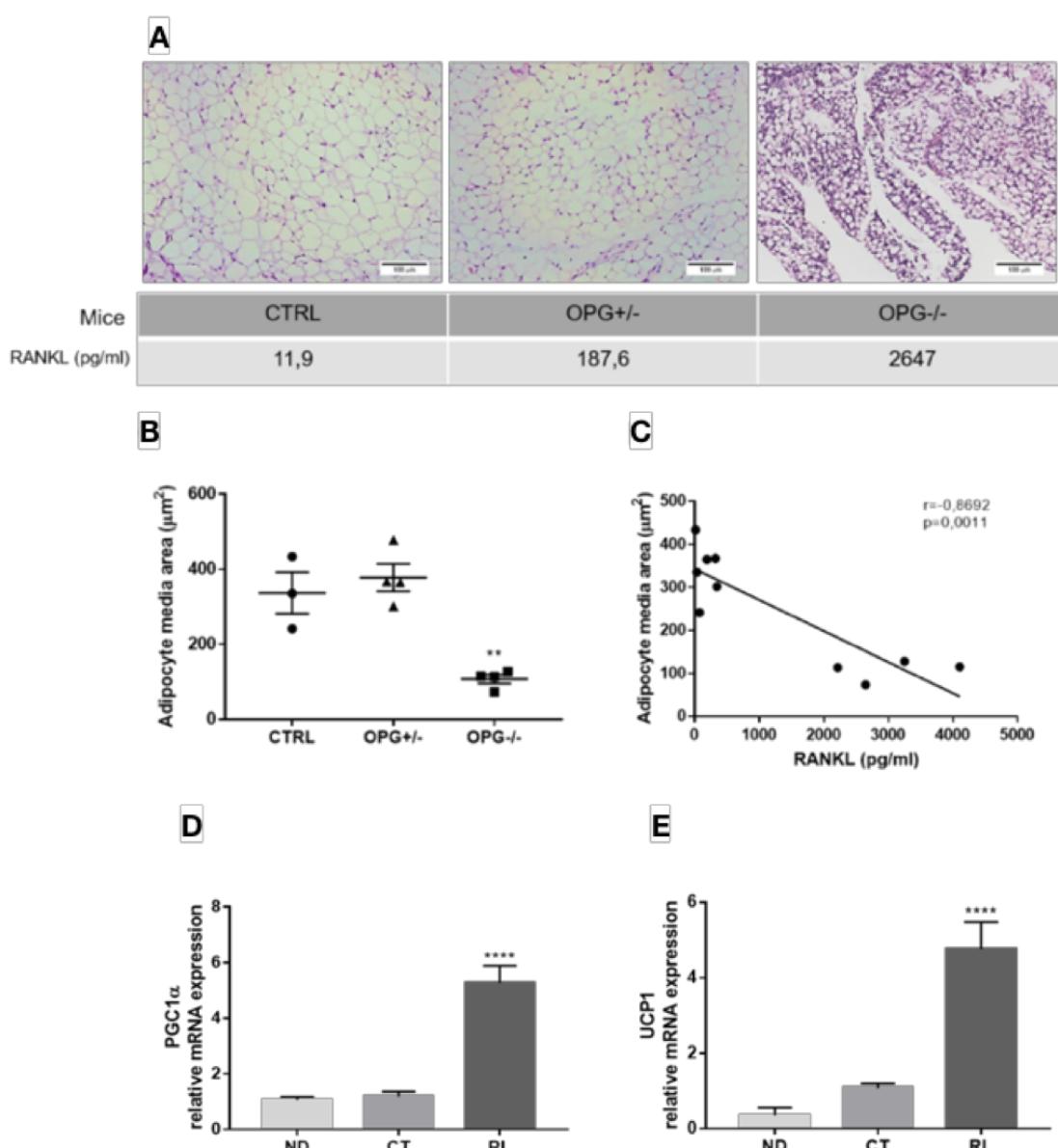


Figura 5: Browning do tecido adiposo branco subcutâneo de animais controle, heterozigotos e *knock-out* para OPG. (A) As imagens foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E, magnificação de 200x), e as concentrações sorológicas de RANKL estão indicadas no painel inferior. (B) Análise da média da área de cada adipócito para cada grupo. (C) Correlação da análise entre a média da área e o nível de RANKL sérico para cada animal. (D) e (E) são análises de PCR quantitativo com ou sem tratamento de RANKL; ND representa as amostras sem diferenciação. A análise estatística realizada foi One-way ANOVA seguida de teste de comparações múltiplas de Bonferroni para todos os grupos. \* p<0.05; \*\* p<0.001. (MATSUO, F.S. et al., dados não publicados)

se falar da ativação do fator nuclear NF- $\kappa$ B. A ativação de RANK por diferentes proteínas associadas ao fator do receptor de TNF (TRAF) leva a indução de NF- $\kappa$ B, e estudos mostraram que TRAF6 é essencial para a osteoclastogênese (LOMAGA et al., 1999); os fatores nucleares IKK $\alpha$  e IKK $\beta$  também são responsáveis por mediar a ativação de NF- $\kappa$ B, e são importantes para a sinalização de RANK-RANKL e a osteoclastogênese (RUOCCHI et al., 2005). Outra cascata importante é a das proteínas quinases ativadas por mitogênio (*mitogen activated protein kinase, MAPK*), que consistem nas proteínas p38-MAPK, JNK1, 2 e 3 e ERK 1 e 2 (WADA e PENNINGER, 2004; CHANG e KARIN, 2001). Estudos com a inibição da p38-MAPK sugerem que essa proteína está envolvida na osteoclastogênese mediada por RANKL, e que ela fosforila o transdutor de sinal e ativador de transcrição 1 (*signal transducer and activator of transcription 1, STAT1*) e controla assim a expressão de diferentes genes (MATSUMOTO et al., 2000; KWAK et al., 2005).

RANK e RANKL não atuam somente no tecido ósseo. RANKL é expresso em células T, e a ligação RANK-RANKL é importante para a interação de células T com células dendríticas, e sinaliza para a ativação de células T regulatórias (ANDERSON et al., 1997; KONG et al., 1999). A ausência de RANK e RANKL, além de causar osteopetrosse, também faz com que as estruturas lóbulo-alveolares mamárias estejam comprometidas durante a gravidez. RANKL é induzido durante a gravidez nas células epiteliares em resposta a hormônios sexuais, levando a sua proliferação. Hormônios sexuais também estão ligados a incidência de doenças ósseas, como ocorre em casos de osteoporose em mulheres na menopausa; a queda da produção de estrogênio resulta na diminuição de OPG perda de massa óssea e, eventualmente, na osteoporose. Tanto o estrogênio quanto andrógenos são responsáveis pela supressão da diferenciação de osteoclastos por meio de RANKL ao inibirem a via de JNK, assim como são responsáveis por controlarem a expressão de OPG (SYED e KHOSLA, 2005).

Sabe-se ainda que a calcificação arterial está associada a osteoporose, principalmente em mulheres na menopausa. Osako e colaboradores mostraram que RANKL contribui para a calcificação vascular ao regular proteínas relacionadas ao tecido ósseo, e que sua atuação é contra-regulada pela presença de estrogênio (OSAKO et al., 2010). Em outro estudo do nosso grupo, demonstramos que o aumento da sinalização de RANK-RANKL em camundongos knockout para OPG (OPG $^{-/-}$ ) reduz a área infartada e o edema cerebral por meio de inflamação pós-isquêmica reduzida, com esse eixo de sinalização atenuando os efeitos inflamatórios em macrófagos e na micróglia (SHIMAMURA et al., 2014). Ainda, MARUYAMA e

colaboradores (2006) demonstraram que o tratamento com RANKL suprime a produção de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos após estímulo por LPS (lipopolissacarídeos).

Em estudos do nosso grupo, observamos que RANKL atua na polarização de macrófagos para estados anti-inflamatórios e reduz a infiltração leucocitária no tecido adiposo branco visceral de camundongos OPG *knockout* ( $OPG^{-/-}$ ), mesmo sob dieta hipercalórica, e apresentaram interessantemente uma diferenciação para o tecido adiposo bege, com evidente processo de *browning* correlacionado com o nível de RANKL sérico (*figura 5A*). O tamanho da área dos adipócitos dos animais  $OPG^{-/-}$  é显著mente menor quando comparado com os grupos  $OPG^{+/-}$  e controle (CTRL) (*figura 5B*), e a área média do adipócito correlaciona negativamente com o nível de RANKL circulante (*figura 5C*). Outros ensaios demonstraram ainda que pré-adipócitos da linhagem 3T3-L1 mesmo quando diferenciados para adipócito branco maduro na presença de RANKL, apresentam aumento da expressão de genes relacionados ao processo de *browning*, tais como UCP1 e PGC-1 $\alpha$  (*figura 5D e E*). ISHII e colaboradores (2009) demonstraram que PGC-1 $\beta$  é capaz de mediar a ativação da biogênese mitocondrial em osteoclastos, e que sua ausência incapacita a diferenciação e maturação destes mesmos osteoclastos, e isso reforça a ideia de que PGC-1 $\alpha$  também possa ser regulado pelo sistema RANKL nos adipócitos, induzindo a expressão de genes termogênicos, tais como UCP1, e a biogênese mitocondrial com um aumento do número de cristas mitocondriais, e por esta via RANKL induz a diferenciação do tecido adiposo bege. Assim, hipotetizamos que o eixo RANK-RANKL e p38 MAPK seja responsável pela ativação e aumento de PGC-1 $\alpha$  e processo de *browning* do tecido adiposo observado em camundongos  $OPG^{-/-}$ .

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Elucidar o papel de RANKL na regulação da transcrição do gene mitocondrial PGC-1 $\alpha$ , avaliação da biogênese mitocondrial, e sua contribuição na diferenciação do adipócito bege durante processo de *browning* do tecido adiposo branco.

### **2.2 Específicos**

**2.2.1** Caracterizar a diferenciação do adipócito bege com o tratamento ou não de RANKL;

**2.2.2** Avaliar o perfil de expressão gênica no adipócito com o tratamento ou não de RANKL durante a diferenciação para bege;

**2.2.3** Avaliar a regulação do promotor do gene PGC-1 $\alpha$  por RANKL.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Experimentação animal**

Os camundongos utilizados neste estudo são das linhagens pertencem as linhagens: C57BL6/J e B6.129S4-Tnfrsf11btm1Eax/J ( $OPG^{-/-}$ ) obtidos do The Jackson Laboratory e mantidos no biotério do Departamento de Biologia Celular, Molecular e Bioagentes Patogênicos da FMRP/USP. O experimento foi conduzido de acordo com as normas da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, FMRP/USP, protocolo número 009/2016-1.

#### **3.2 Microscopia eletrônica de transmissão**

Os tecidos adiposos subcutâneos de animais selvagem e *knock-out* para OPG foram retirados e cortados em cubos de 1 mm para a fixação por imersão em 2.5% de glutaraldeído e 2% de paraformaldeído (Solução de Karnovsky) em tampão de cacodilato 0.1 M (pH = 7.3). O tecido foi, então, pós-fixado com tetróxido de ósmio a 1% em tampão de cacodilato 0.1 M (pH = 7.3), em seguida feita contrastação em bloco com 1% de acetato de uranila. A amostra foi submetida a cortes ultrafinos de 70 nm. O microscópio eletrônico JEM-100CX II foi utilizado para a captura das imagens.

#### **3.3 Cultura Celular**

##### **3.3.1 Linhagem 3T3-L1**

Pré-adipócitos da linhagem murina 3T3-L1 foram adquiridos do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) e cultivados em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Vitrocell) e 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina (denominado DMEMc). As células foram cultivadas em placas de 3,5 cm em 1 ml de meio DMEMc ( $2 \times 10^5$  células/placa). Para o ensaio de transfecção, as células foram estimuladas com 20 ng/ml de RANKL e 1 µM de rosiglitazona.

##### **3.3.2 Cultura Primária da Fração Vascular Estromal**

Células murinas da fração vascular estromal (*stromal vascular fraction, SVF*) do tecido adiposo foram extraídas do depósito subcutâneo de animais selvagem (C57BL6/J) seguindo o protocolo estabelecido por AUNE e colaboradores (2013). Resumidamente, o tecido retirado foi dissecado e lavado com PBS, sendo picado e digerido em PBS contendo 1.5 U/ml de Colagenase D (Sigma-Aldrich), 2.4 U/ml de Dispase II (Sigma-Aldrich) e 10 mM

de CaCl em agitação, de 30 a 40 min, a 37°. O tecido é então filtrado e centrifugado, sendo ressuspensido em DMEMc. As células foram inicialmente cultivadas em placas de 10 cm em meio DMEM suplementado com 20% de SFB e 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina. Depois, foram cultivadas em placas de 3,5 cm em 1 ml de meio de indução para a diferenciação em tecido adiposo bege (dia 0). O meio de indução consiste em DMEMc suplementado 125 µM de indometacina, 2 µg/ml de dexametasona, 0,5 mM de IBMX, 0,5 µM de rosiglitazona e 20 ng/ml de RANKL. Após 48h (dia 2), o meio de indução é substituído pelo meio de manutenção 1, que consiste em meio DMEMc suplementado 5 µg/ml de insulina, 1 nM de 3,3',5-Triiodo-L-tironina (T3), 0,5 µM de rosiglitazona e 20 ng/ml de RANKL. Após mais 48h (dia 4), o meio é renovado pelo meio de manutenção 2, que consiste em DMEMc suplementado com 5 µg/ml de insulina, 1 nM de T3, 1µM de rosiglitazona e 0,02 ng/µl de RANKL. As células foram diferenciadas até o dia 9.

### **3.3.3 Linhagem HEK-293**

Células HEK-293 foram cultivadas em meio DMEMc, e para transfecção foram semeadas em placas de 3,5 cm em 1 ml de meio DMEMc na quantidade de  $5 \times 10^5$  células/placa. Para ensaio de transfecção, receberam 5 µg de plasmídeo e 2 ml de lipofectamina (Lipofectamine® 2000, cat. 11668027, Invitrogen), e estimuladas com 5 µM rosiglitazona, 20 ng/ml de RANKL, e 10 ng/ml de LPS.

### **3.4 Ensaio de Oil Red O**

O ensaio de Oil Red O (O0625, Sigma-Aldrich) foi realizado de acordo com o protocolo do fabricante para coloração de gotículas de gordura. As células da fração vascular estromal foram semeadas em placa de 24-wells (1,5 cm) e diferenciadas para bege até o dia 9. As placas foram armazenadas a 5°C, com 1 ml de água destilada por placa para posterior visualização e documentação ao microscópio de fluorescência DMI 6000 Leica (Laboratório do Prof. Dr. Marcelo D. Gomes, Departamento de Bioquímica, FMRP/USP). A análise das imagens foi realizada pelo *software* ImageJ. Foram tiradas 3 fotos por poço, as imagens foram modificadas para binárias (8-bit) e o *threshold* de visualização foi ajustado, seguindo-se para quantificação da área com coloração positiva; por fim, foi feito uma média da área dos poços de cada grupo ( $n = 6$ ).

### **3.5 RT-qPCR**

### **3.5.1 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*)**

Os *primers* foram desenhados no *software* disponibilizado pela empresa Integrated DNA Technologies (IDT), através do link PrimerQuest Tool. Os parâmetros escolhidos foram: temperatura de *melting* próximo aos 60°C, porcentagem de CG em torno de 50%, tamanho do *amplicon* próximo a 100 pb, tamanho do primer próximo de 22 nucleotídeos, *primers* que estivessem em região na mesma exônica com anelamento na região intermediária do gene e interseção de dois exôns. O reconhecimento da sequência de interesse do gene alvo foi feito por meio da biblioteca gênica National Center for Biotechnology Information (NCBI) PubMed e a especificidade do primer avaliada por meio da ferramenta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Eles foram padronizados para uma concentração total de uso de 600 ng. A *tabela 2* detalha os *primers forward (F)* e *reverse (R)* empregados no estudo de acordo com os parâmetros acima citados.

Gene	Sequência	Referência NCBI
GAPDH F	AACGGATTGGCCGTATT G	NM_001289726.
GAPDH R	GTGGTGAAGACACCACT AGA	NM_001289726.
UCP1 F	GGCCCTTGAAACAAACAA ATTAC	NM_009463.3
UCP1 R	GGCAACAAGAGCTGACA GTAAAT	NM_009463.3
PGC-1 $\alpha$ F	GCTATGGTTTCATCACCTA CC	NM_008904.2
PGC-1 $\alpha$ R	GTACAGCTCGAACAGTCAGT TTC	NM_008904.2
Citrato sintase F	CAACATGGGAAGACAGT GG	NM_026444.4
Citrato Sintase R	GTCAGGATCAAGAACCG AAG	NM_026444.4

\*F - Forward

\*R - Reverse

### **3.5.2 Extração de RNA e transcrição reversa**

Após o início da indução (dia 0), o RNA das células SVF foram coletados nos dias 1, 3, 5, 7 e 9 pelo método do TRIZOL (QIAGEN). As amostras foram vortexadas e incubadas a temperatura ambiente por cinco minutos, adicionando 1/5 do volume de TRIZOL de

clorofórmio P.A (SYNTH), vortexando-se as amostras novamente e incubando-as por 2 min a temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 12 000 rpm durante 20 min, à 4°C, e em seguida a fase aquosa foi coletada, igual volume de isopropanol P.A (SYNTH) foi adicionado, seguindo incubação por 10 min a temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14 000 rpm por 10 min, a 4°C, e o sobrenadante descartado. O pellet formado foi lavado com 1 ml etanol (70-75%), seguido de centrifugação a 14 000 rpm por 10 min, a 4°C, e o sobrenadante descartado. O pellet formado (RNA) foi ressuspensido em 20 µl de H<sub>2</sub>O RNase free, e quantificado no NanoVue Plus (GE Healthcare). O RNA foi utilizado na concentração de 250 ng/µl para tratamento com DNase I (Cat. AMPD1, Sigma-Aldrich). A transcrição reversa foi feita com o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Cat. 4368814, Applied Biosystems), seguindo-se as instruções dos fabricantes.

### **3.5.3 Reação em cadeia da polimerase em tempo real - Real time PCR**

A quantificação da expressão dos genes PGC-1 $\alpha$ , UCP1 e citrato sintase foram realizadas por PCR em tempo real no aparelho ABI 7500 (Applied Biosystems) através do método comparativo de *threshold cycles* (Ct). Os experimentos foram montados em placas de 96 poços e conduzidos em triplicata técnica com 1 controle negativo para cada gene. Cada biblioteca de cDNA foi analisada pela expressão dos genes de interesse e normalizada pela expressão do gene *housekeeping* GAPDH usando-se o método por detecção por fluorescência com o reagente QuantiFast SYBR® Green (Cat. 204052, QIAGEN) por RT-qPCR de acordo com as instruções do fabricante.

### **3.6 Clonagem da região promotora de PGC-1 $\alpha$**

Para análise da região promotora de PGC-1 $\alpha$ , utilizamos *primers* específicos descritos por SPIEGELMAN e colaboradores (2003). Utilizamos o seguinte par de *primers* para amplificação da região promotora (Forward: GCCAGGATTGCTTGATAATGATG; Reverse: CAACTCCAATCCACTCTGAC) de 2197 pares de base. Em seguida, na segunda rodada de PCR convencional, utilizamos o seguinte par de *primers* para a inserção das enzimas de restrição KpnI e SacI (Forward: GCGGTACCCAGGATTGCTTGATAATG; Reverse: GCGAGCTCTCCAATCCACTCT; Alternative Reverse: GCGAGCTCCCAGTCAAGCTT) nas extremidades do *amplicon*; foram desenhados dois primers reverse com as enzimas em sua sequência. Os *primers* foram desenhados no *software* disponibilizado pela IDT, de acordo com os seguintes parâmetros: temperatura de *melting*

próximo aos 60°C, porcentagem de CG em torno de 50%, tamanho do primer próximo de 22 nucleotídeos. O DNA genômico foi extraído de células murinas 3T3-L1, segundo protocolo do kit PureLink® Genomic DNA Kits (Invitrogen, número de catálogo K1820-01) para cultura de células mamíferas.

### **3.7 Ensaio de luciferase com região promotora de PGC-1 $\alpha$**

Utilizamos o plasmídeo *PGC-1 alpha promoter luciferase delta MEF*, construído por Bruce Spiegelman e fornecido pela plataforma Addgene (Plasmídeo Addgene #8889) em bactérias *E. coli*, que foram cultivadas em meio LB (Luria Bertani) líquido suplementado com ampicilina (100 µg/ml) e posteriormente semeadas em meio LB sólido suplementado com ampicilina. As colônias isoladas foram submetidas a *MiniPrep* caseiro para amplificação e purificação do plasmídeo. O plasmídeo foi digerido utilizando as enzimas EcoRV e BsaI (New England Biolabs® Inc.), e após a confirmação do padrão de digestão indicado, a colônia originária foi amplificada e purificada via *MaxiPrep* usando o kit QIAGEN® Plasmid (QIAGEN). A transfecção foi realizada em células 3T3-L1 e células HEK-239 com lipofetamina (Lipofectamine® 2000, cat. 11668027, Invitrogen), na proporção de 2 µl/ml. Os plasmídeos usados estavam a uma concentração de 200 ng/µl, tendo 5 µg/placa de plasmídeo. Tanto a lipofetamina quanto os plasmídeos foram diluídos em meio Opti-MEM® (Gibco® by Life Technologies™). Após a adição da solução complexo lipofetamina-plasmídeo e 5 horas de incubação para a transfecção, o meio foi renovado com 1 ml de meio DMEMc. As células foram transfectadas no dia seguinte ao seu plaqueamento.

As células 3T3-L1 foram estimuladas 24h após a transfecção com 20 ng/ml de RANKL e 1 µM de rosiglitazona, e 48h após a transfecção, foi realizado o ensaio de luciferase seguindo-se o protocolo descrito no kit Luciferase Assay System with Reporter Lysis Buffer (Cat. #E4030, Promega), e a luminescência detectada com o equipamento VICTOR X3 Multilabel Plate Reader (PerkinElmer®). Os dados foram normalizados pela concentração da proteína total obtida pelo método de Bradford.

### **3.8 Estatística**

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o *software* GraphPad Prism 7.0. Para a definição do teste estatístico empregado utilizou-se previamente o teste de normalidade. Para as análises de múltiplas comparações, empregou-se One Way ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. Para análises comparativas entre dois grupos foi utilizado

o teste t de Student. Em todas as análises,  $p<0.05$  foi definido como sendo estatisticamente significante.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Avaliação dos tecidos adiposos subcutâneos por microscopia eletrônica

Resultados prévios do nosso grupo demonstram intenso processo de *browning* no tecido adiposo subcutâneo em camundongos OPG<sup>-/-</sup> comparados com o grupo selvagem (*figura 5*), e hipotetizamos que a elevada ativação da sinalização RANK-RANKL no contexto de deficiência de OPG poderia induzir biogênese mitocondrial pela ativação de PGC-1α, visto que estas organelas atuam na metabolização de lipídeos e termogênese. Inicialmente, avaliamos o tecido adiposo subcutâneo por microscopia eletrônica de transmissão, e observamos uma grande gota lipídica central, com mitocôndrias pouco densas e cristas mitocondriais com espaços visíveis entre as membranas no grupo selvagem (*figura 6A e C*). No animal OPG<sup>-/-</sup>, por outro lado, é possível observar uma maior densidade mitocondrial

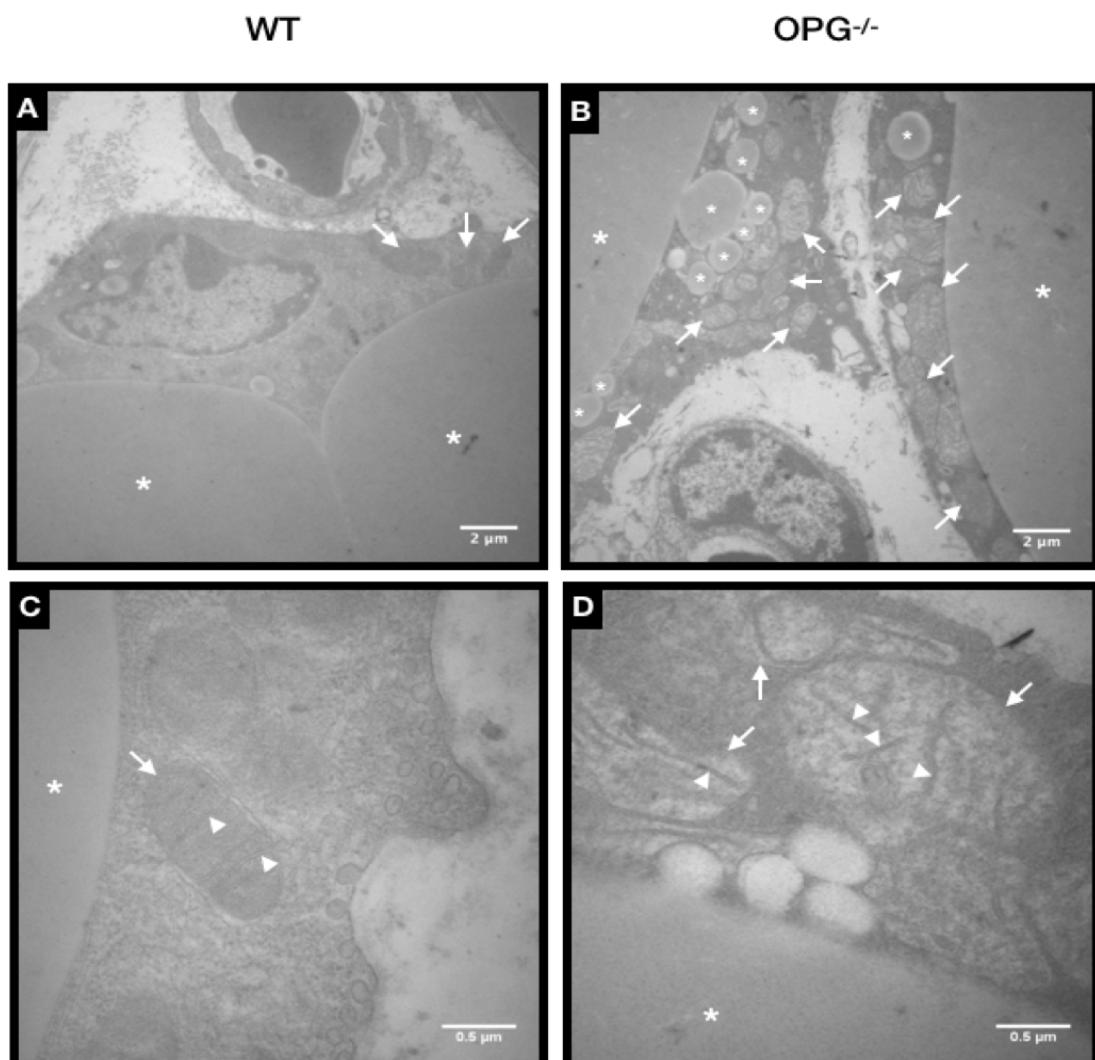


Figura 6: Microscopia eletrônica de transmissão de animais controle (A e C) e *knock-out* para OPG (OPG<sup>-/-</sup>) (B e D). (A e B) Aumento de 10x; (C e D) aumento de 50x. Gotícula lipídica indicada por asterisco (\*);mitocôndrias estão na ponta da seta (→); e a crista mitocondrial está indicada pela cabeça da seta (▲).

(figura 6B e D). Além da presença da gotícula lipídica central, no animal OPG<sup>-/-</sup>, observamos também a presença de outras gotículas lipídicas menores mobilizando-se a partir da gotícula central. Portanto, esse resultado corrobora com os resultados histológicos obtidos previamente (figura 5) e demonstram maior densidade mitocondrial no grupo OPG<sup>-/-</sup> comparado ao selvagem.

#### 4.2 Detecção da diferenciação do adipócito bege por Oil Red O *in vitro*

Células SVF do tecido adiposo subcutâneo foram extraídas e diferenciadas para adipócitos bege até o 9º dia para avaliar o efeito do estímulo de RANKL na diferenciação do adipócito bege e expressão de marcadores termogênicos e de biogênese mitocondrial. Observamos a diferenciação dos adipócitos com a coloração por Oil Red O (figura 7A e B), e detectamos um aumento significativo na área total positiva para a coloração de gotículas lipídicas ao tratarmos as células com RANKL (figura 7B e C) durante o período de diferenciação.

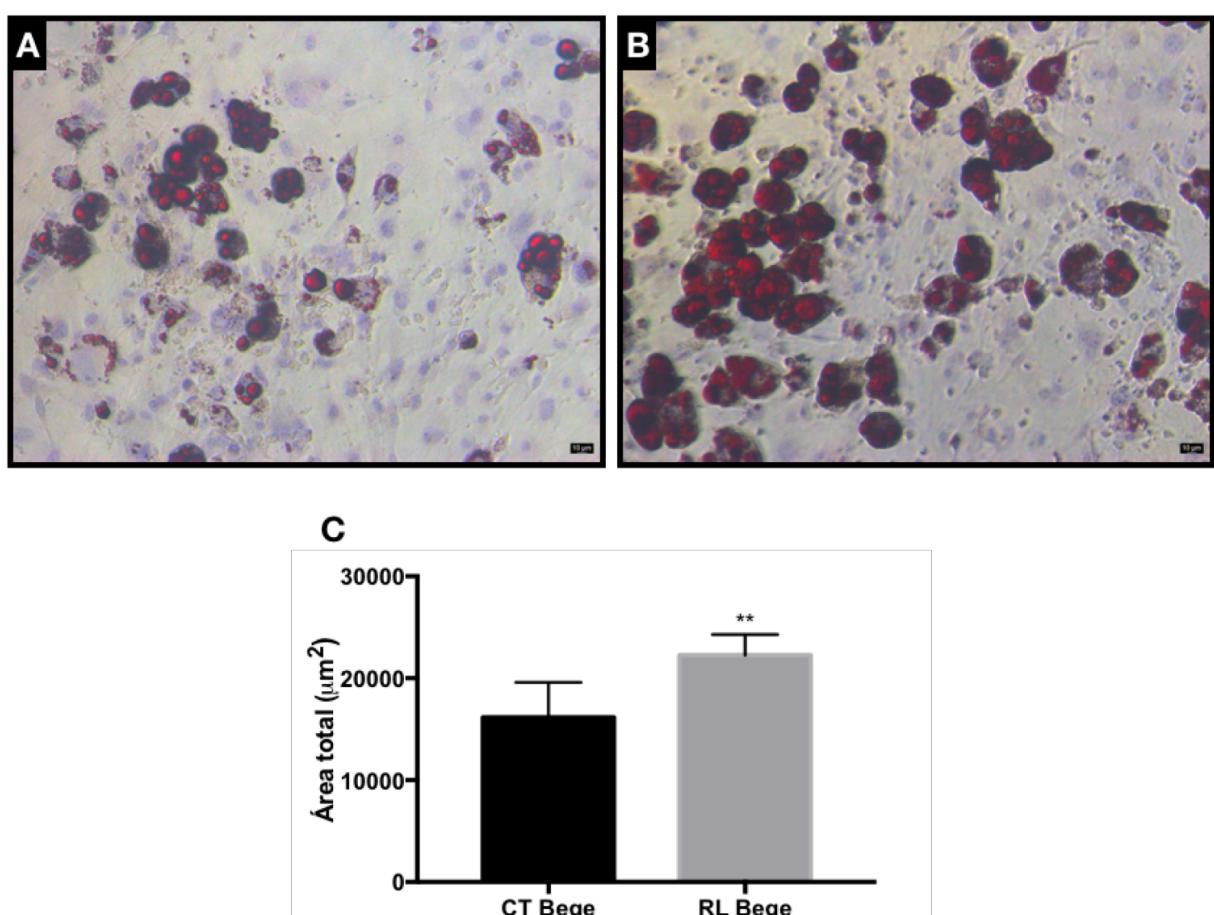


Figura 7: Pré-adipócitos da fração vascular estromal (SVF) diferenciadas durante 9 dias para adipócitos bege e corados com Oil Red O. Células diferenciadas para adipócitos bege (A) e em (B) as células foram tratadas também com RANKL. (C) Área total dos adipócitos. \*\* p<0.05. A análise estatística utilizada foi Teste t não pareado.

#### 4.3 Expressão gênica de genes termogênicos diante a diferenciação a adipócitos bege

Durante este processo de diferenciação, o mRNA foi extraído nos dias 1, 3, 5, 7 e 9 e analisado em ensaios de PCR em tempo real. Observamos um aumento significativo na expressão de PGC-1 $\alpha$  no quinto dia de diferenciação, assim como uma tendência da elevação da expressão de UCP1 comparado com o grupo não tratado (*figura 8A e B*). Observamos também um aumento agudo da citrato sintase no primeiro dia de diferenciação na presença de RANKL comparado ao grupo não tratado (*figura 8C*).

#### 4.4 Construção do plasmídeo contendo promotor de PGC-1 $\alpha$

A região promotora desejada de 2197 pb de PGC-1 $\alpha$  foi amplificada inicialmente com um par de *primers* sem sítio enzimático e por PCR convencional utilizando como amostra DNA genômico de células 3T3-L1 (*figura 9A*). A partir dela, foi realizado um novo PCR com *primers* contendo os sítios de restrição sítios enzimáticos para KpnI e SacI, para sua

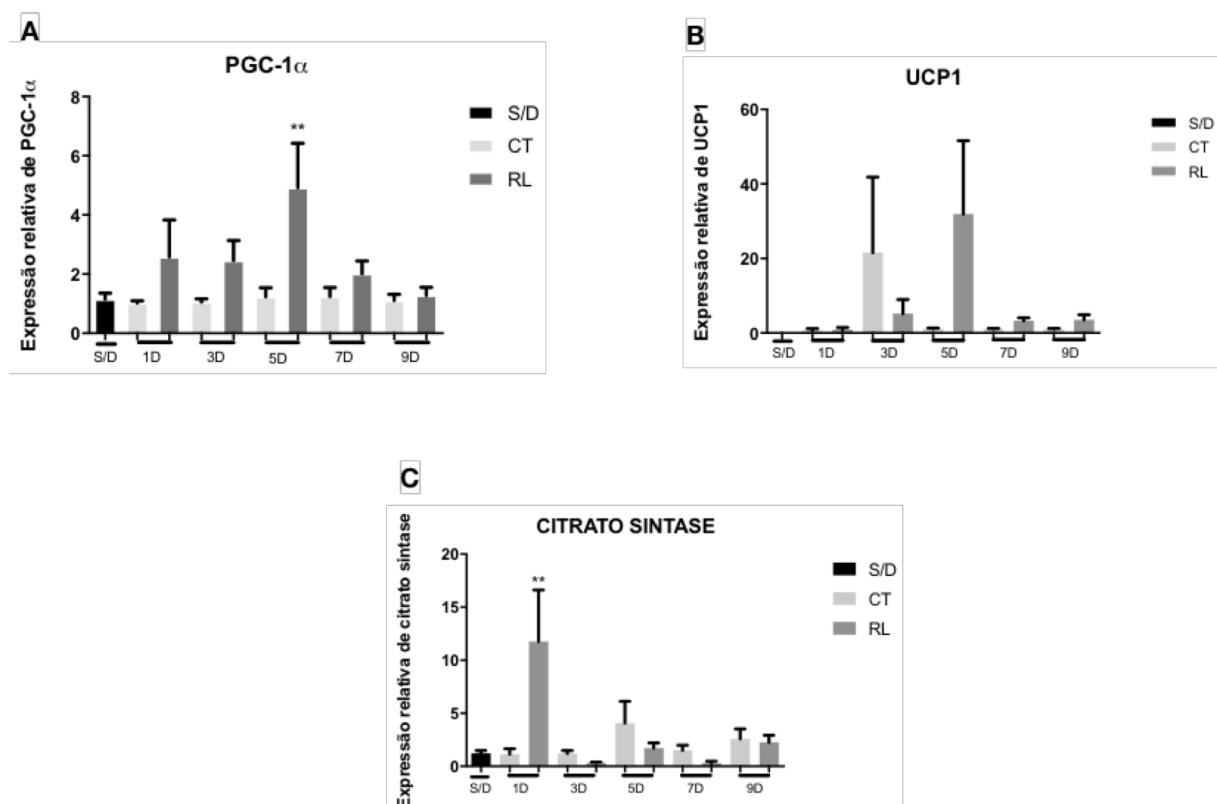


Figura 8: PCR quantitativo de amostras de pré-adipócitos diferenciados para adipócitos bege por 9 dias para detecção da expressão do gene PGC-1 $\alpha$  (A), UCP1 (B) e citrato sintase (C). S/D são células sem diferenciação; CT são células controle; RL são células tratadas com RANKL. A análise estatística realizada foi one-way ANOVA. \*\* p<0.05.

ligação em sítio de clonagem no plasmídeo repórter para luciferase. Entretanto, devido as dificuldades de clonar a sequência promotora, adquirimos o plasmídeo PGC-1 alpha promoter luciferase delta MEF (pPGC1 $\alpha$ ) cedido por Bruce Spiegelman (Addgene), utilizando-o nos experimentos subsequentes. O plasmídeo foi digerido com as enzimas EcoRV e BsaI e os tamanhos dos fragmentos correspondentes aos descritos anteriormente foram detectados no gel de eletroforese (figura 9B).

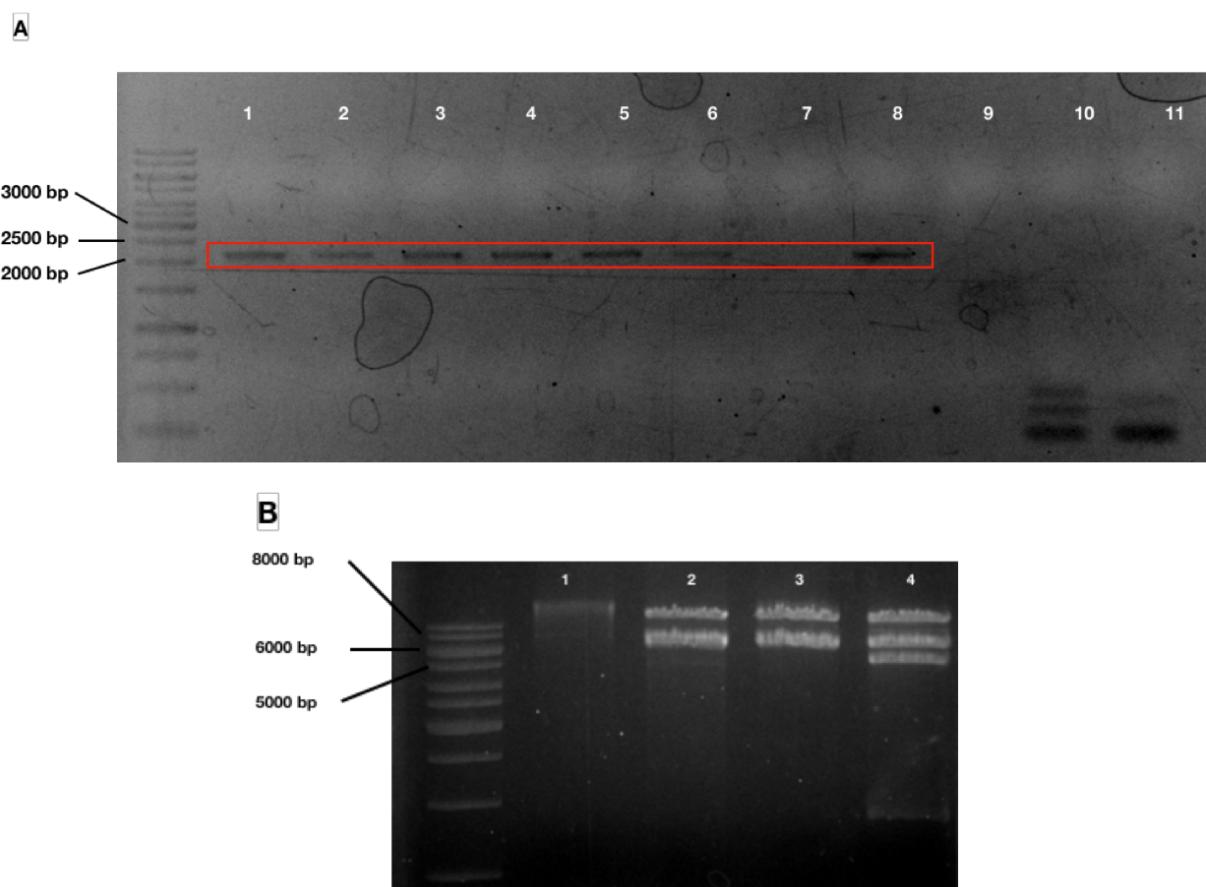


Figura 9: (A) Clonagem da região promotora de PGC-1 $\alpha$ . Foi realizado um gradiente de temperatura para verificação da temperatura de *melting* com o primer sem os sítios enzimáticos. 1 - 56°C; 2 - 55,8°C; 3 - 55,4°C; 4 - 54,9°C; 5 - 54,2°C; 6 - 53,6°C; 7 - 53,2°C; 8 - 53°C; 9 - controle negativo; 10 - controle positivo com DNA genômico; 11 - controle positivo com cDNA. (B) Gel com digestão do plasmídeo; 1 - plasmídeo completo; 2 - plasmídeo digerido com a enzima de restrição EcoRV; 3 - plasmídeo digerido com BsaI; 4 - plasmídeo digerido com EcoRV e BsaI.

#### 4.5 Regulação da expressão gênica de PGC-1 $\alpha$ mediada por RANKL

Células HEK-293 foram transfetadas com o plasmídeo pPGC1 $\alpha$  e estimuladas com o agonista de PPAR $\gamma$  rosiglitazona, e RANKL. Como esperado, rosiglitazona ativa a região promotora de PGC-1 $\alpha$ , e ainda, observamos que as células estimuladas com RANKL apresentaram maior atividade de luciferase em relação a rosiglitazona, demonstrando que o

estímulo de RANKL também ativa a expressão de PGC-1 $\alpha$ , (figura 10). As células 3T3-L1 foram transfectadas, porém não detectamos atividade da luciferase em nenhum dos grupos, possivelmente por serem resistentes à transfecção pelo método utilizado.

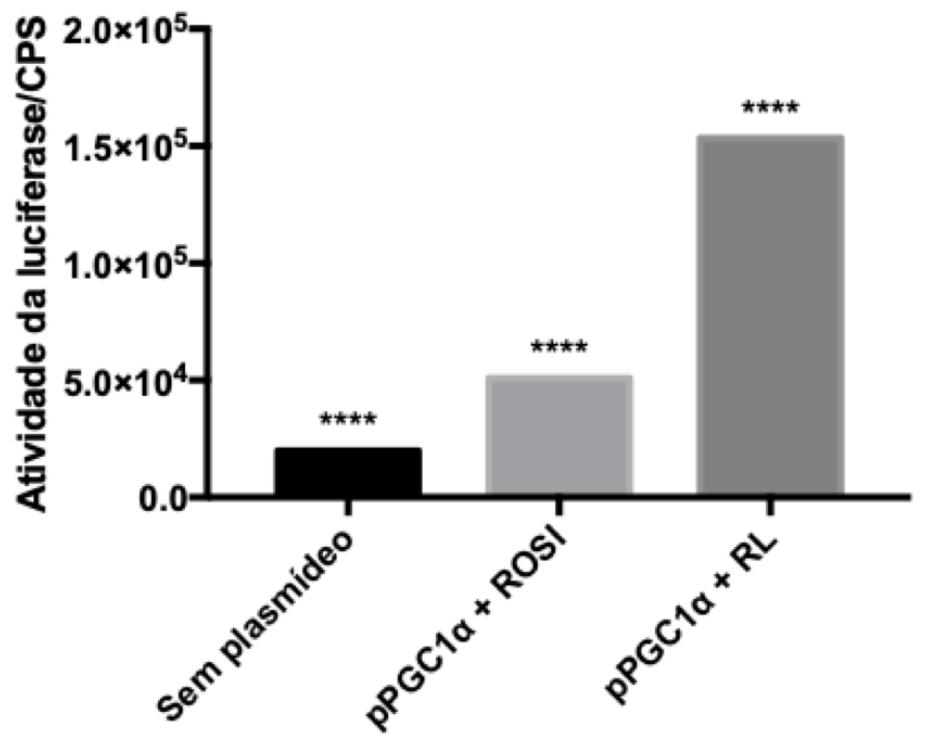


Figura 10: Transfecção das células HEK-293 com os plasmídeos do promotor de PGC-1 $\alpha$ , tratadas com rosiglitazona ou RANKL. \*\*\*\*p<0.0001

## 5. DISCUSSÃO

As mitocôndrias são as principais responsáveis pela metabolização de lipídeos e termogênese no tecido adiposo marrom e bege e, neste trabalho, observamos que o processo de *browning* observado no tecido adiposo branco de camundongos com a sinalização RANK-RANKL exacerbada sem oposição de OPG, como é o caso de animais OPG<sup>-/-</sup>, correlaciona com a presença de adipócitos com maior densidade mitocondrial e gotículas lipídicas multiloculadas. HACKENBROCK (1966) demonstrou que as cristas mitocondriais apresentam uma estrutura “ortodoxa” e uma estrutura “condensada”. Na primeira, a crista se apresenta em filamentos alongados e com opacidade reduzida na microscopia eletrônica por conta de uma diminuição da matriz mitocondrial, e esse estado é apresentado com a redução de ATP. O segundo estado apresenta cristas com redes alongadas e opacidade alta, sendo o estado para o qual as mitocôndrias convergem pois ATP encontra-se elevado. Desta maneira, as cristas observadas nos animais OPG<sup>-/-</sup> apresentam-se em sua forma “ortodoxa”, com menor concentração de ATP, condizendo a presença de UCP1 em sua estrutura, responsável por desfazer o gradiente de prótons responsável pela produção de ATP, convertendo-o em energia termogênica.

A diferenciação de pré-adipócitos para adipócitos bege mostrou-se efetiva, e o tratamento com RANKL foi capaz de aumentar o número de gotículas lipídicas presentes, indicando a mudança para adipócitos multiloculares como detectado pela coloração Oil Red O. A presença desses adipócitos multiloculares indicam, assim, uma maior mobilização lipídica para consumo energético. E a fim de produzir a termogênese independente de tremores (*non-shivering thermogenesis*) observada em adipócitos beges, há necessidade tanto do aumento de mitocôndrias presentes como aumento de seu maquinário termogênico, e verificamos a expressão de três genes relacionados a essas funções: *PGC-1α*, relacionado à biogênese mitocondrial; *UCP1*, responsável pela proteína desacopladora capaz de gerar calor ao desfazer a diferença de potencial entre as duas membranas mitocondriais; e *citrato sintase*, responsável pela proteína presente no início do ciclo de Krebs, que forma citrato a partir de oxaloacetato e acetil-coA em uma reação altamente exergônica, possibilitando o início do ciclo. Tanto *PGC-1α* quanto *UCP1* tem sua expressão aumentada na presença de RANKL após cinco dias de estímulo de diferenciação para adipócito bege, indicando que o aumento da biogênese mitocondrial se dá de forma concomitante com o aumento da maquinaria termogênica. *Citrato sintase*, por sua vez, aumenta no primeiro dia de diferenciação com

tratamento com RANKL, possivelmente indicando o início da preparação proteica para o aumento da densidade mitocondrial que ocorre nos dias seguintes.

ISHII e colaboradores (2009) demonstraram que PGC-1 $\beta$  era induzido durante a diferenciação de osteoclastos por meio da proteína de ligação do elemento responsivo de AMPc (CREB), uma vez que a atividade de reabsorção óssea destas células é altamente dependentes da atividade mitocondrial. O *knockdown* desse gene inibe a diferenciação dos osteoclastos, inibindo também a biogênese mitocondrial. Assim como RANKL é responsável pela diferenciação de osteoclastos e, munido das observações feitas *in vitro* com células estimuladas com RANKL e *in vivo* no tecido de animais OPG $^{-/-}$ , iniciamos a clonagem da região promotora de PGC-1 $\alpha$ , responsável pela biogênese mitocondrial em adipócitos, para análise da regulação gênica pela via de RANK-RANKL. Observamos que RANKL aumenta a expressão da luciferase em células HEK-293 transfectadas com o plasmídeo repórter para luciferase controlado pelo promotor de PGC-1 $\alpha$ . HANDSCHIN e colaboradores (2003) mostraram em seu estudo que o promotor humano de PGC-1 $\alpha$  contém a região CRE essencial para sua ativação por AMPc; essa mesma região é conservada no promotor murino, com ambas as regiões possuindo distância semelhante do sítio inicial de transcrição. Dessa maneira, apesar das células HEK-293 serem de origem humana, e a sequência promotora de PGC-1 $\alpha$  clonada no plasmídeo ser de origem murina, observamos um aumento da atividade da luciferase no grupo estimulado com rosiglitazona (controle positivo) e significativamente maior com RANKL, e isto indica que a conservação evolutiva da região promotora entre as duas espécies é suficiente para possibilitar a regulação positiva pelo estímulo de RANKL. A expressão de PGC-1 $\alpha$  é ativada pela sinalização p38 MAPK (AKIMOTO et al., 2005), e RANKL também ativa esta via na diferenciação de osteoclastos (MATSUMOTO et al., 2000). Portanto, o eixo RANK-RANKL e p38 MAPK será o foco de experimentos futuros para melhore compreensão dos efeitos de RANKL na regulação gênica de PGC-1 $\alpha$  durante o processo de *browning* e biogênese mitocondrial.

## **6. CONCLUSÃO**

O presente trabalho teve como objetivo demonstrar que RANKL induz a biogênese mitocondrial no processo de *browning* do tecido adiposo branco por meio da regulação da expressão gênica de PGC-1 $\alpha$ . Observamos o aumento da densidade mitocondrial, com diferenças estruturais marcantes relacionadas com o perfil termogênico nas mitocôndrias de animais OPG $^{-/-}$  comparadas aos animais selvagens, e correlacionadas com aumento da expressão de PGC-1 $\alpha$ , UCP1 e citrato sintase em células estimuladas com RANKL e diferenciadas para adipócito bege *in vitro*. Ainda, células tratadas com RANKL apresentaram aumento da ativação da região promotora de PGC-1 $\alpha$  em ensaio de luciferase, e isso indica que possivelmente RANKL induz a diferenciação do adipócito bege por atuar na biogênese mitocondrial via regulação de PGC-1 $\alpha$ . Estes dados, embora preliminares, apontam o eixo RANK-RANKL-OPG como potencial indutor do processo de *browning* do tecido adiposo em situações de obesidade e doenças relacionadas.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aherne, W., & Hull, D. (1966). Brown adipose tissue and heat production in the newborn infant. *The Journal of pathology and bacteriology*, 91(1), 223-234.
- Akimoto, T., Pohnert, S.C., Li, P., Zhang, M., Gumbs, C., Rosenberg, P.B., Williams, R.S. and Yan, Z. (2005). Exercise stimulates Pgc-1 $\alpha$  transcription in skeletal muscle through activation of the p38 MAPK pathway. *Journal of Biological Chemistry*.
- Anderson, D.M., Maraskovsky, E., Billingsley, W.L., Dougall, W.C., Tometsko, M.E., Roux, E.R., Teepe, M.C., DuBose, R.F., Cosman, D. and Galibert, L. (1997). A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature*, 390(6656), 175.
- Bachman, E. S., Dhillon, H., Zhang, C. Y., Cinti, S., Bianco, A. C., Kobilka, B. K., & Lowell, B. B. (2002).  $\beta$ AR signaling required for diet-induced thermogenesis and obesity resistance. *Science*, 297(5582), 843-845.
- Ballard, E., Dam, J., Langlet, F., Caron, E., Steculorum, S., Messina, A., Rasika, S., Falluel-Morel, A., Anouar, Y., Dehouck, B. and Trinquet, E. (2014). Hypothalamic tanycytes are an ERK-gated conduit for leptin into the brain. *Cell metabolism*, 19(2), 293-301.
- Banerjee, S.S., Feinberg, M.W., Watanabe, M., Gray, S., Haspel, R.L., Denkinger, D.J., Kawahara, R., Hauner, H. and Jain, M.K. (2003). The Krüppel-like factor KLF2 inhibits peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  expression and adipogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 278(4), 2581-2584.
- Barbatelli, G., Murano, I., Madsen, L., Hao, Q., Jimenez, M., Kristiansen, K., Giacobino, J.P., De Matteis, R. and Cinti, S. (2010). The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 298(6), E1244.
- Boström, P., Wu, J., Jedrychowski, M.P., Korde, A., Ye, L., Lo, J.C., Rasbach, K.A., Boström, E.A., Choi, J.H., Long, J.Z., Kajimura, S., Zingaretti, M.C., Vind, B.F., Tu, H., Cinti, S., Højlund, K., Gygi, S.P. and Spiegelman, B.M. (2012). A PGC1- $\alpha$ -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature*, 481(7382), 463.
- Boyle, W. J., Simonet, W. S., & Lacey, D. L. (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, 423(6937), 337.
- Cao, W., Daniel, K.W., Robidoux, J., Puigserver, P., Medvedev, A.V., Bai, X., Floering, L.M., Spiegelman, B.M. and Collins, S. (2004). p38 mitogen-activated protein kinase is the central regulator of cyclic AMP-dependent transcription of the brown fat uncoupling protein 1 gene. *Molecular and cellular biology*, 24(7), 3057-3067.
- Cao, W., Medvedev, A. V., Daniel, K. W., & Collins, S. (2001).  $\beta$ -Adrenergic activation of p38 MAP kinase in adipocytes: cAMP induction of the uncoupling protein-1 (UCP1) gene requires p38 MAP kinase. *Journal of Biological Chemistry*.

- Cao, Z., Umek, R. M., & McKnight, S. L. (1991). Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes & development*, 5(9), 1538-1552.
- Carey, A.L., Vorlander, C., Reddy-Luthmoodoo, M., Natoli, A.K., Formosa, M.F., Bertovic, D.A., Anderson, M.J., Duffy, S.J. and Kingwell, B.A. (2014). Reduced UCP-1 content in in vitro differentiated beige/brite adipocytes derived from preadipocytes of human subcutaneous white adipose tissues in obesity. *PLoS one*, 9(3), e91997.
- Carroll, J.F., Chiapa, A.L., Rodriguez, M., Phelps, D.R., Cardarelli, K.M., Vishwanatha, J.K., Bae, S. and Cardarelli, R. (2008). Visceral fat, waist circumference, and BMI: impact of race/ethnicity. *Obesity*, 16(3), 600-607.
- Chang, L., & Karin, M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, 410(6824), 37.
- Chartoumpakis, D. V., Habeos, I. G., Ziros, P. G., Psyrogiannis, A. I., Kyriazopoulou, V. E., & Papavassiliou, A. G. (2011). Brown adipose tissue responds to cold and adrenergic stimulation by induction of FGF21. *Molecular medicine*, 17(7-8), 736.
- Coste, A., Louet, J.F., Lagouge, M., Lerin, C., Antal, M.C., Meziane, H., Schoonjans, K., Puigserver, P., O'Malley, B.W. and Auwerx, J. (2008). The genetic ablation of SRC-3 protects against obesity and improves insulin sensitivity by reducing the acetylation of PGC-1 $\alpha$ . *Proceedings of the national academy of sciences*, 105(44), 17187-17192.
- Cypess, A.M., Lehman, S., Williams, G., Tal, I., Rodman, D., Goldfine, A.B., Kuo, F.C., Palmer, E.L., Tseng, Y.H., Doria, A. and Kolodny, G.M. (2009). Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *New England Journal of Medicine*, 360(15), 1509-1517.
- Davies, K.M., Strauss, M., Daum, B., Kief, J.H., Osiewacz, H.D., Rycovska, A., Zickermann, V. and Kühlbrandt, W. (2011). Macromolecular organization of ATP synthase and complex I in whole mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(34), 14121-14126.
- Dudkina, N. V., Heinemeyer, J., Keegstra, W., Boekema, E. J., & Braun, H. P. (2005). Structure of dimeric ATP synthase from mitochondria: an angular association of monomers induces the strong curvature of the inner membrane. *FEBS letters*, 579(25), 5769-5772.
- English, J. T., Patel, S. K., & Flanagan, M. J. (1973). Association of pheochromocytomas with brown fat tumors. *Radiology*, 107(2), 279-281.
- Ernster, L., & Schatz, G. (1981). Mitochondria: a historical review. *J Cell Biol*, 91(3), 227s-255s.
- Foellmi-Adams, L. A., Wyse, B. M., Herron, D., Nedergaard, J., & Kletzien, R. F. (1996). Induction of uncoupling protein in brown adipose tissue: synergy between norepinephrine and pioglitazone, an insulin-sensitizing agent. *Biochemical pharmacology*, 52(5), 693-701.
- Gallic, S., Oakhill, J. S., & Steinberg, G. R. (2010). Adipose tissue as an endocrine organ. *Molecular and cellular endocrinology*, 316(2), 129-139.

- Geer, E. B., & Shen, W. (2009). Gender differences in insulin resistance, body composition, and energy balance. *Gender medicine*, 6, 60-75.
- Geloen, A., Collet, A. J., Guay, G., & Bukowiecki, L. J. (1988). Beta-adrenergic stimulation of brown adipocyte proliferation. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 254(1), C175-C182.
- Gomes, L. C., Di Benedetto, G., & Scorrano, L. (2011). During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nature cell biology*, 13(5), 589.
- Gray, M. W. (2017). Lynn Margulis and the endosymbiont hypothesis: 50 years later. *Molecular biology of the cell*, 28(10), 1285-1287.
- Gray, M. W., & Doolittle, W. F. (1982). Has the endosymbiont hypothesis been proven?. *Microbiological Reviews*, 46(1), 1.
- Gray, S., Feinberg, M.W., Hull, S., Kuo, C.T., Watanabe, M., Sen, S., DePina, A., Haspel, R. and Jain, M.K. (2002). The Kruppel-like factor KLF15 regulates the insulin-sensitive glucose transporter GLUT4. *Journal of Biological Chemistry*.
- Hackenbrock, C. R. (1966). Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria: I. Reversible ultrastructural changes with change in metabolic steady state in isolated liver mitochondria. *The Journal of cell biology*, 30(2), 269-297.
- Hallberg, M., Morganstein, D.L., Kiskinis, E., Shah, K., Kralli, A., Dilworth, S.M., White, R., Parker, M.G. and Christian, M. (2008). A functional interaction between RIP140 and PGC-1 $\alpha$  regulates the expression of the lipid droplet protein CIDEA. *Molecular and cellular biology*, 28(22), 6785-6795.
- Handschin, C., Rhee, J., Lin, J., Tarr, P. T., & Spiegelman, B. M. (2003). An autoregulatory loop controls peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$  expression in muscle. *Proceedings of the national academy of sciences*, 100(12), 7111-7116.
- Harms, M., & Seale, P. (2013). Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nature medicine*, 19(10), 1252.
- Herzig, S., Long, F., Jhala, U.S., Hedrick, S., Quinn, R., Bauer, A., Rudolph, D., Schutz, G., Yoon, C., Puigserver, P. and Spiegelman, B. (2001). CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature*, 413(6852), 179.
- Himms-Hagen, J., Melnyk, A., Zingaretti, M. C., Ceresi, E., Barbatelli, G., & Cinti, S. (2000). Multilocular fat cells in WAT of CL-316243-treated rats derive directly from white adipocytes. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 279(3), C670-C681.
- Hondares, E., Iglesias, R., Giralt, A., Gonzalez, F. J., Giralt, M., Mampel, T., & Villarroya, F. (2011). Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown adipose tissue. *Journal of Biological Chemistry*, jbc-M110.
- Hotamisligil, G. S., Shargill, N. S., & Spiegelman, B. M. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*, 259(5091), 87-91.

- Huttunen, P., Hirvonen, J., & Kinnula, V. (1981). The occurrence of brown adipose tissue in outdoor workers. *European journal of applied physiology and occupational physiology*, 46(4), 339-345.
- Irving, L., & Hart, J. S. (1957). The metabolism and insulation of seals as bare-skinned mammals in cold water. *Canadian Journal of Zoology*, 35(4), 497-511.
- Ishii, K.A., Fumoto, T., Iwai, K., Takeshita, S., Ito, M., Shimohata, N., Aburatani, H., Taketani, S., Lelliott, C.J., Vidal-Puig, A. and Ikeda, K. (2009). Coordination of PGC-1 $\beta$  and iron uptake in mitochondrial biogenesis and osteoclast activation. *Nature medicine*, 15(3), 259.
- Jäger, S., Handschin, C., Pierre, J. S., & Spiegelman, B. M. (2007). AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 $\alpha$ . *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(29), 12017-12022.
- Jonckheere, A. I., Smeitink, J. A., & Rodenburg, R. J. (2012). Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology. *Journal of inherited metabolic disease*, 35(2), 211-225.
- Jornayvaz, F. R., & Shulman, G. I. (2010). Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays in biochemistry*, 47, 69-84.
- Kajimura, S., Seale, P., Tomaru, T., Erdjument-Bromage, H., Cooper, M.P., Ruas, J.L., Chin, S., Tempst, P., Lazar, M.A. and Spiegelman, B.M. (2008). Regulation of the brown and white fat gene programs through a PRDM16/CtBP transcriptional complex. *Genes & development*, 22(10), 1397-1409.
- Karamanlidis, G., Karamitri, A., Docherty, K., Hazlerigg, D. G., & Lomax, M. A. (2007). C/EBP $\beta$  reprograms white 3T3-L1 preadipocytes to a brown adipocyte pattern of gene expression. *Journal of Biological Chemistry*, 282(34), 24660-24669.
- Karsenty, G., & Wagner, E. F. (2002). Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Developmental cell*, 2(4), 389-406.
- Katzmarzyk, P.T., Bray, G.A., Greenway, F.L., Johnson, W.D., Newton Jr, R.L., Ravussin, E., Ryan, D.H., Smith, S.R. and Bouchard, C. (2009). Racial differences in abdominal depot-specific adiposity in white and African American adults-. *The American journal of clinical nutrition*, 91(1), 7-15.
- Kawai, M., & Rosen, C. J. (2010). PPAR $\gamma$ : a circadian transcription factor in adipogenesis and osteogenesis. *Nature Reviews Endocrinology*, 6(11), 629.
- Kawai, M., Sousa, K. M., MacDougald, O. A., & Rosen, C. J. (2010). The many facets of PPAR $\gamma$ : novel insights for the skeleton. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 299(1), E3-E9.
- Kennedy, G. C. (1953). The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 140(901), 578-592.

Kleiner, S., Douris, N., Fox, E.C., Mepani, R.J., Verdeguer, F., Wu, J., Kharitonov, A., Flier, J.S., Maratos-Flier, E. and Spiegelman, B.M. (2012). FGF21 regulates PGC-1 $\alpha$  and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes & development*, 26(3), 271-281.

Kong, Y.Y., Feige, U., Sarosi, I., Bolon, B., Tafuri, A., Morony, S., Capparelli, C., Li, J., Elliott, R., McCabe, S. and Wong, T. (1999). Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature*, 402(6759), 304.

Kong, Y.Y., Yoshida, H., Sarosi, I., Tan, H.L., Timms, E., Capparelli, C., Morony, S., Oliveira-dos-Santos, A.J., Van, G., Itie, A. and Khoo, W. (1999). OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature*, 397(6717), 315.

Kwak, H.B., Lee, S.W., Jin, H.M., Ha, H., Lee, S.H., Takeshita, S., Tanaka, S., Kim, H.M., Kim, H.H. and Lee, Z.H. (2005). Monokine induced by interferon- $\gamma$  is induced by receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand and is involved in osteoclast adhesion and migration. *Blood*, 105(7), 2963-2969.

Larsen, S., Nielsen, J., Hansen, C.N., Nielsen, L.B., Wibrand, F., Stride, N., Schroder, H.D., Boushel, R., Helge, J.W., Dela, F. and Hey-Mogensen, M. (2012). Biomarkers of mitochondrial content in skeletal muscle of healthy young human subjects. *The Journal of physiology*, 590(14), 3349-3360.

Lee, J.Y., Takahashi, N., Yasubuchi, M., Kim, Y.I., Hashizaki, H., Kim, M.J., Sakamoto, T., Goto, T. and Kawada, T. (2011). Triiodothyronine induces UCP-1 expression and mitochondrial biogenesis in human adipocytes. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 302(2), C463-C472.

Lee, M. J., Wu, Y., & Fried, S. K. (2013). Adipose tissue heterogeneity: implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications. *Molecular aspects of medicine*, 34(1), 1-11.

Lee, Y. H., Petkova, A. P., Mottillo, E. P., & Granneman, J. G. (2012). In vivo identification of bipotential adipocyte progenitors recruited by  $\beta$ 3-adrenoceptor activation and high-fat feeding. *Cell metabolism*, 15(4), 480-491.

Lerin, C., Rodgers, J. T., Kalume, D. E., Kim, S. H., Pandey, A., & Puigserver, P. (2006). GCN5 acetyltransferase complex controls glucose metabolism through transcriptional repression of PGC-1 $\alpha$ . *Cell metabolism*, 3(6), 429-438.

Li, J., Sarosi, I., Yan, X.Q., Morony, S., Capparelli, C., Tan, H.L., McCabe, S., Elliott, R., Scully, S., Van, G. and Kaufman, S. (2000). RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(4), 1566-1571.

Li, X., Monks, B., Ge, Q., & Birnbaum, M. J. (2007). Akt/PKB regulates hepatic metabolism by directly inhibiting PGC-1 $\alpha$  transcription coactivator. *Nature*, 447(7147), 1012.

Liu, J., Li, J., Li, W. J., & Wang, C. M. (2013). The role of uncoupling proteins in diabetes mellitus. *Journal of diabetes research*, 2013.

Lomaga, M.A., Yeh, W.C., Sarosi, I., Duncan, G.S., Furlonger, C., Ho, A., Morony, S., Capparelli, C., Van, G., Kaufman, S. and Van Der Heiden, A. (1999). TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling. *Genes & development*, 13(8), 1015-1024.

López, M., Varela, L., Vázquez, M.J., Rodríguez-Cuenca, S., González, C.R., Velagapudi, V.R., Morgan, D.A., Schoenmakers, E., Agassanian, K., Lage, R. and De Morentin, P.B.M. (2010). Hypothalamic AMPK and fatty acid metabolism mediate thyroid regulation of energy balance. *Nature medicine*, 16(9), 1001.

Louet, J. F., & O'Malley, B. W. (2007). Coregulators in adipogenesis: what could we learn from the SRC (p160) coactivator family?. *Cell Cycle*, 6(20), 2448-2452.

Lowell, B. B., & Spiegelman, B. M. (2000). Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature*, 404(6778), 652.

Maruyama, K., Takada, Y., Ray, N., Kishimoto, Y., Penninger, J. M., Yasuda, H., & Matsuo, K. (2006). Receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand and osteoprotegerin regulate proinflammatory cytokine production in mice. *The Journal of Immunology*, 177(6), 3799-3805.

Matsumoto, M., Sudo, T., Saito, T., Osada, H., & Tsujimoto, M. (2000). Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway in osteoclastogenesis mediated by receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL). *Journal of Biological Chemistry*, 275(40), 31155-31161.

Mizuno, A., Amizuka, N., Irie, K., Murakami, A., Fujise, N., Kanno, T., Sato, Y., Nakagawa, N., Yasuda, H., Mochizuki, S.I. and Gomibuchi, T. (1998). Severe osteoporosis in mice lacking osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin. *Biochemical and biophysical research communications*, 247(3), 610-615.

Molina, A.J., Wikstrom, J.D., Stiles, L., Las, G., Mohamed, H., Elorza, A., Walzer, G., Twig, G., Katz, S., Corkey, B.E. and Shirihai, O.S. (2009). Mitochondrial networking protects beta cells from nutrient induced apoptosis. *Diabetes*.

Molina, Patricia E. *Fisiología Endócrina-4*. AMGH Editora, 2014

Mori, T., Sakaue, H., Iguchi, H., Gomi, H., Okada, Y., Takashima, Y., Nakamura, K., Nakamura, T., Yamauchi, T., Kubota, N. and Kadokawa, T. (2005). Role of Krüppel-like factor 15 (KLF15) in transcriptional regulation of adipogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 280(13), 12867-12875.

Mozaffarian, D, Benjamin, EJ, Go, AS, Arnett, DK, Blaha, MJ, Cushman, M, Das, SR, De Ferranti, S, Després, JP, Fullerton, HJ, Howard, VJ, Huffman, MD, Isasi, CR, Jiménez, MC, Judd, SE, Kissela, BM, Lichtman, JH, Lisabeth, LD, Liu, S, MacKey, RH, Magid, DJ, McGuire, DK, Mohler, ER, Moy, CS, Muntner, P, Mussolino, ME, Nasir, K, Neumar, RW, Nichol, G, Palaniappan, L, Pandey, DK, Reeves, MJ, Rodriguez, CJ, Rosamond, W, Sorlie, PD, Stein, J, Towfighi, A, Turan, TN, Virani, SS, Woo, D, Yeh, RW & Turner, MB. (2016). Heart disease and stroke statistics-2016 update: A Report from the American Heart Association. *Circulation*, 133(4):447-454

Nelson, D. L. and Cox, M. M. Lehninger Principles of Biochemistry. 5th edition, W.H. Freeman and company, New York. 616, 620-630, 649-656, 710-720, 722-731, 736.

Nelson, R. A. (1973, October). Winter sleep in the black bear. A physiologic and metabolic marvel. In *Mayo Clinic Proceedings* (Vol. 48, No. 10, p. 733).

Oishi, Y., Manabe, I., Tobe, K., Tsushima, K., Shindo, T., Fujii, K., Nishimura, G., Maemura, K., Yamauchi, T., Kubota, N. and Suzuki, R. (2005). Krüppel-like transcription factor KLF5 is a key regulator of adipocyte differentiation. *Cell metabolism*, 1(1), 27-39.

Okamura, M., Kudo, H., Wakabayashi, K.I., Tanaka, T., Nonaka, A., Uchida, A., Tsutsumi, S., Sakakibara, I., Naito, M., Osborne, T.F. and Hamakubo, T. (2009). COUP-TFII acts downstream of Wnt/β-catenin signal to silence PPARγ gene expression and repress adipogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(14), 5819-5824.

Organização Mundial da Saúde - World Health Organization | Obesity and overweight - <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/> - 2017, outubro, 10 - acesso: 12 de março de 2018.

Osako, M.K., Nakagami, H., Koibuchi, N., Shimizu, H., Nakagami, F., Koriyama, H., Shimamura, M., Miyake, T., Rakugi, H. and Morishita, R. (2010). Estrogen Inhibits Vascular Calcification via Vascular RANKL SystemNovelty and Significance: Common Mechanism of Osteoporosis and Vascular Calcification. *Circulation Research*, 107(4), 466-475.

Picard, F., Géhin, M., Annicotte, J.S., Rocchi, S., Champy, M.F., O'Malley, B.W., Chambon, P. and Auwerx, J. (2002). SRC-1 and TIF2 control energy balance between white and brown adipose tissues. *Cell*, 111(7), 931-941.

Prestrud, P., & Nilssen, K. (1992). Fat deposition and seasonal variation in body composition of arctic foxes in Svalbard. *The Journal of wildlife management*, 221-233.

Puigserver, P., Adelmant, G., Wu, Z., Fan, M., Xu, J., O'malley, B., & Spiegelman, B. M. (1999). Activation of PPARγ coactivator-1 through transcription factor docking. *Science*, 286(5443), 1368-1371.

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

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

Ricquier, D., & Bouillaud, F. (2000). The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. *Biochemical Journal*, 345(2), 161-179.

Romanello, V., & Sandri, M. (2016). Mitochondria quality control and muscle mass maintenance. *Frontiers in physiology*, 6, 422.

Rosen, E. D., & MacDougald, O. A. (2006). Adipocyte differentiation from the inside out. *Nature reviews Molecular cell biology*, 7(12), 885.

Rosen, E. D., & Spiegelman, B. M. (2014). What we talk about when we talk about fat. *Cell*, 156(1-2), 20-44.

- Rosenwald, M., Perdikari, A., Rülicke, T., & Wolfrum, C. (2013). Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nature cell biology*, 15(6), 659.
- Ruocco, M.G., Maeda, S., Park, J.M., Lawrence, T., Hsu, L.C., Cao, Y., Schett, G., Wagner, E.F. and Karin, M. (2005). I $\kappa$ B kinase (IKK)  $\beta$ , but not IKK $\alpha$ , is a critical mediator of osteoclast survival and is required for inflammation-induced bone loss. *Journal of Experimental Medicine*, 201(10), 1677-1687.
- Santel, A., Frank, S., Gaume, B., Herrler, M., Youle, R. J., & Fuller, M. T. (2003). Mitofusin-1 protein is a generally expressed mediator of mitochondrial fusion in mammalian cells. *Journal of cell science*, 116(13), 2763-2774.
- Schulz, T.J., Huang, T.L., Tran, T.T., Zhang, H., Townsend, K.L., Shadrach, J.L., Cerletti, M., McDougall, L.E., Giorgadze, N., Tchkonia, T. and Schrier, D. (2011). Identification of inducible brown adipocyte progenitors residing in skeletal muscle and white fat. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(1), 143-148.
- Seale, P., Bjork, B., Yang, W., Kajimura, S., Chin, S., Kuang, S., Scime, A., Devarakonda, S., Conroe, H.M., Erdjument-Bromage, H. and Tempst, P. (2008). PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature*, 454(7207), 961.
- Seale, P., Kajimura, S., Yang, W., Chin, S., Rohas, L.M., Uldry, M., Tavernier, G., Langin, D. and Spiegelman, B.M. (2007). Transcriptional control of brown fat determination by PRDM16. *Cell metabolism*, 6(1), 38-54.
- Seth, A., Steel, J.H., Nichol, D., Pocock, V., Kumaran, M.K., Fritah, A., Mobberley, M., Ryder, T.A., Rowlerson, A., Scott, J. and Poutanen, M. (2007). The transcriptional corepressor RIP140 regulates oxidative metabolism in skeletal muscle. *Cell metabolism*, 6(3), 236-245.
- Shimamura, M., Nakagami, H., Osako, M.K., Kurinami, H., Koriyama, H., Zhengda, P., Tomioka, H., Tenma, A., Wakayama, K. and Morishita, R. (2014). OPG/RANKL/RANK axis is a critical inflammatory signaling system in ischemic brain in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201400544.
- Simonet, W.S., Lacey, D.L., Dunstan, C.R., Kelley, M.C.M.S., Chang, M.S., Lüthy, R., Nguyen, H.Q., Wooden, S., Bennett, L., Boone, T. and Shimamoto, G. (1997). Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, 89(2), 309-319.
- Southgate, R.J., Bruce, C.R., Carey, A.L., Steinberg, G.R., Walder, K., Monks, R., Watt, M.J., Hawley, J.A., Birnbaum, M.J. and Febbraio, M.A. (2005). PGC-1 $\alpha$  gene expression is down-regulated by Akt-mediated phosphorylation and nuclear exclusion of FoxO1 in insulin-stimulated skeletal muscle. *The FASEB journal*, 19(14), 2072-2074.
- Strauss, M., Hofhaus, G., Schröder, R. R., & Kühlbrandt, W. (2008). Dimer ribbons of ATP synthase shape the inner mitochondrial membrane. *The EMBO journal*, 27(7), 1154-1160.
- Syed, F., & Khosla, S. (2005). Mechanisms of sex steroid effects on bone. *Biochemical and biophysical research communications*, 328(3), 688-696.
- Symonds, M. E. (2013). Brown adipose tissue growth and development. *Scientifica*, 2013.

- Tai, T.A.C., Jennermann, C., Brown, K.K., Oliver, B.B., MacGinnitie, M.A., Wilkison, W.O., Brown, H.R., Lehmann, J.M., Kliewer, S.A., Morris, D.C. and Graves, R.A. (1996). Activation of the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  promotes brown adipocyte differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 271(47), 29909-29914.
- Tamori, Y., Masugi, J., Nishino, N., & Kasuga, M. (2002). Role of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  in maintenance of the characteristics of mature 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes*, 51(7), 2045-2055.
- Tanaka, T., Yoshida, N., Kishimoto, T., & Akira, S. (1997). Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBP $\beta$  and/or C/EBP $\delta$  gene. *The EMBO journal*, 16(24), 7432-7443.
- Trayhurn, P., Richard, D., Jennings, G., & Ashwell, M. (1983). Adaptive changes in the concentration of the mitochondrial 'uncoupling' protein in brown adipose tissue of hamsters acclimated at different temperatures. *Bioscience reports*, 3(12), 1077-1084.
- Tsuda, E., Goto, M., Mochizuki, S. I., Yano, K., Kobayashi, F., Morinaga, T., & Higashio, K. (1997). Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. *Biochemical and biophysical research communications*, 234(1), 137-142.
- Twig, G., Elorza, A., Molina, A.J., Mohamed, H., Wikstrom, J.D., Walzer, G., Stiles, L., Haigh, S.E., Katz, S., Las, G. and Alroy, J. (2008). Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *The EMBO journal*, 27(2), 433-446.
- Uldry, M., Yang, W., St-Pierre, J., Lin, J., Seale, P., & Spiegelman, B. M. (2006). Complementary action of the PGC-1 coactivators in mitochondrial biogenesis and brown fat differentiation. *Cell metabolism*, 3(5), 333-341.
- Vitali, A., Murano, I., Zingaretti, M. C., Frontini, A., Ricquier, D., & Cinti, S. (2012). The adipose organ of obesity-prone C57BL/6J mice is composed of mixed white and brown adipocytes. *Journal of lipid research*, jlr-M018846.
- Wada, T., & Penninger, J. M. (2004). Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene*, 23(16), 2838.
- Wiegand, G., & Remington, S. J. (1986). Citrate synthase: structure, control, and mechanism. *Annual review of biophysics and biophysical chemistry*, 15(1), 97-117.
- Wong, B.R., Rho, J., Arron, J., Robinson, E., Orlinick, J., Chao, M., Kalachikov, S., Cayani, E., Bartlett, F.S., Frankel, W.N. and Lee, S.Y. (1997). TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells. *Journal of Biological Chemistry*, 272(40), 25190-25194.
- Wozniak, S. E., Gee, L. L., Wachtel, M. S., & Frezza, E. E. (2009). Adipose tissue: the new endocrine organ? A review article. *Digestive diseases and sciences*, 54(9), 1847-1856.
- Wronska, A., & Kmiec, Z. (2012). Structural and biochemical characteristics of various white adipose tissue depots. *Acta Physiologica*, 205(2), 194-208.

Wu, J., Boström, P., Sparks, L.M., Ye, L., Choi, J.H., Giang, A.H., Khandekar, M., Virtanen, K.A., Nuutila, P., Schaart, G. and Huang, K. (2012). Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*, 150(2), 366-376.

Wu, J., Srinivasan, S. V., Neumann, J. C., & Lingrel, J. B. (2005). The KLF2 transcription factor does not affect the formation of preadipocytes but inhibits their differentiation into adipocytes. *Biochemistry*, 44(33), 11098-11105.

Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Yamaguchi, K., Kinoshita, M., Mochizuki, S.I., Tomoyasu, A., Yano, K., Goto, M., Murakami, A. and Tsuda, E. (1998). Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(7), 3597-3602.

Yeh, W. C., Cao, Z., Classon, M., & McKnight, S. L. (1995). Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins. *Genes & development*, 9(2), 168-181.

Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., & Friedman, J. M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372(6505), 425.