

Juliana Magdalon

**A ativação constitutiva de mTORC1 em
adipócitos aumenta a capacidade oxidativa
mitocondrial e reduz a adiposidade
visceral em camundongos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2016

Juliana Magdalon

A ativação constitutiva de mTORC1 em adipócitos aumenta a capacidade oxidativa mitocondrial e reduz a adiposidade visceral em camundongos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana
Orientador: William Tadeu Lara Festuccia

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Dissertações e Teses da USP (BDTD)

São Paulo
2016

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Magdalon, Juliana.

A ativação constitutiva de mTORC1 em adipócitos aumenta a capacidade oxidativa mitocondrial e reduz a adiposidade visceral em camundongos. / Juliana Magdalon. -- São Paulo, 2016.

Orientador: William Tadeu Lara Festuccia.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Biologia do tecido adiposo.

Versão do título para o inglês: Constitutive adipocyte mTORC1 activation enhances mitochondrial oxidative capacity and reduces visceral adiposity in mice.

1. Tecido adiposo 2. Adiposidade 3. Obesidade I. William Tadeu Lara Festuccia II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB088/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Juliana Magdalon.

Título da Tese: A ativação constitutiva de mTORC1 em adipócitos aumenta a capacidade oxidativa mitocondrial e reduz a adiposidade visceral em camundongos.

Orientador(a): William Tadeu Lara Festuccia.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

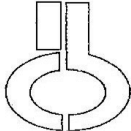
Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Presidente: Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

	<p>UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS</p> <p>Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011)3091-8405 e-mail: cep@icb.usp.br</p> <p>COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</p>
---	--

Decl. CEUA-ICB/USP - 047/2011

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 98/10/CEUA, datado de 29.09.10 e por solicitação do Prof. Dr. Rui Curi, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão da aluna **Juliana Magdalon** ao Projeto de Pesquisa "Controle da expressão gênica por receptores nucleares", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao referido certificado.

São Paulo, 10 de novembro de 2011.



Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima
Coordenador da CEUA
ICB/USP

Aos meus pais,
Cristiane e Alexandre

AGRADECIMENTOS

São tantas as pessoas a agradecer. Cada pessoa que passou pela minha vida e influenciou meu modo de ser tem um papel importante na realização do meu doutorado. Cada professor que me ensinou desde criança até agora foi fundamental para a construção do meu raciocínio e conhecimento. Cada amigo que durante esses anos de estudo e pesquisa estava me divertindo e assim possibilitando fazer meu trabalho com mais tranquilidade. Cada familiar me admirando e me apoiando me dava forças a seguir em frente mesmo quando os experimentos não iam lá muito bem... Existem, entretanto, algumas pessoas que eu gostaria de deixar registrado meus profundos agradecimentos, além da FAPESP pela concessão da bolsa e financiamento da pesquisa de nosso laboratório.

Agradeço ao Prof. William, meu orientador e exemplo de pesquisador e pessoa. Que bom que eu estava procurando um orientador de doutorado quando o William apareceu no Brasil em busca de alunos para começar um grupo de pesquisa. Com ele aprendi como se faz pesquisa de alto nível, buscando sempre o que fosse preciso para testar nossas hipóteses. Queria ter a capacidade de armazenar conhecimento e de raciocínio rápido que ele tem. Obrigada também por estar sempre presente, por me ouvir e considerar minhas ideias, por ser eficiente em corrigir qualquer documento e por manter um ambiente legal no laboratório.

Agradeço aos meus amigos de laboratório, alguns já não mais no grupo, que sempre se disponibilizaram a ajudar no que fosse preciso. Este grupo vou levar no coração como exemplo de parceria dentro e fora do laboratório. Nem a falta de recursos durante boa parte do meu doutorado fez este grupo perder a união e a alegria. Obrigada Vivian e Thiago, meus parceiros desde o início de doutorado, que sempre contei para tudo; Patrícia, que me ajudou muito com os experimentos deste projeto; Alex, Fernanda, Rafael, Érique, Tiago e Milene, pelas discussões científicas e não tão científicas assim, pelas risadas e pela ajuda nos experimentos; André e Thayna, pela ajuda com os camundongos, genotipagens e cuidado com o laboratório; Maynara, minha housemate e grande amiga que posso contar pra qualquer experimento, conversa, Masterchef e bolo de aniversário e que é meu exemplo diário da importância das relações sociais.

Agradeço ao Rodrigo, Talita e Andressa pela ajuda nos experimentos no início de meu doutorado. Agradeço também ao Marcel e à Profa. Alícia Kowaltowski

(IQ-USP), que nos receberam em seu laboratório e tanto nos ajudaram nos experimentos envolvendo mitocôndria. Agradeço aos Profs. Marcelo Mori (UNIFESP), Mathieu Laplante e Yves Deshaies (Quebec Heart and Lung Institute, Quebec, Canada) pela discussão sobre nossos resultados e revisão de nosso artigo científico.

Agradeço a muitos laboratórios do Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB-USP pela disponibilização de seus equipamentos e reagentes para diversos experimentos. Em especial, gostaria de agradecer ao laboratório da Profa. Maria Tereza Nunes, onde sempre fomos muito bem tratados e nos forneceram tudo que podiam e precisávamos, como reagentes, material e uso de equipamentos. Obrigada também Prof. José Donato Junior pela doação do anticorpo para receptor de estrógeno. Agradeço também ao laboratório do Prof. José Cesar Rosa Neto, do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do ICB-USP, pela parceria e ajuda com o que fosse preciso. Agradeço ao Bob e aos outros funcionários do biotério por cuidarem de nossos camundongos. Agradeço também a todos os outros funcionários do ICB, que possibilitam que nossa pesquisa seja realizada, cuidando da burocracia, da limpeza e da vigilância de nosso prédio. Obrigada também funcionários da USP, que possibilitam que esta universidade funcione e assim eu possa viver feliz aqui, comer no bandeirão e usar o CEPEUSP.

Agradeço ao Prof. Shu-Bing Qian pela oportunidade de estagiar em seu laboratório na Universidade de Cornell durante um ano. Obrigada por todo aprendizado, pela paciência e pela liberdade para pesquisar sobre adipogênese, mesmo não sendo uma linha de pesquisa de seu grupo. Agradeço a todos os colegas de laboratório por terem me mostrado como se faz e se pensa em pesquisa em um lugar de alta qualidade, onde a pressão é imensa. Obrigada Xiangwei, Ji e Botao por colaborarem com minha pesquisa e terem se esforçado em fazer as coisas darem certo. Obrigada Joy, Mridu, Alex e Ben pelos dias de convívio no laboratório, pelas conversas filosóficas e por sempre me receberem com alegria quando fui visitá-los. Agradeço também aos meus amigos brasileiros que fiz em Ithaca e deixaram meus dias lá muito mais divertidos, especialmente Fabi, Jussara e Bárbara. Sinto saudades de vocês e de nossas vidas naquela cidade linda.

Agradeço aos meus amigos de graduação Gustavo (Chefe), Alegria, Léo, Marcos (CET), Débora e Felipe (CPF) pelos onze anos de amizade, pelos estudos em grupo e por terem despertado meu interesse ainda maior por ciência,

especialmente metabolismo durante as aulas de bioquímica. Fico muito feliz de ainda sermos um grupo unido e de encontrar com vocês e Isa, Carol, Gi, Agnes e Diogo para se divertir e ainda continuar discutindo sobre ciência e pesquisa. Obrigada Alegria por me salvar com um anticorpo secundário, ECL e filme de revelação de melhor qualidade pra eu conseguir o último blot que precisava para nosso artigo ser publicado. Agradeço também às minhas amigas de pós-graduação Laiali e Natalia pela amizade, risadas, viagens e desabafos sobre a pós-graduação e sobre a vida. Vocês foram essenciais durante esses anos de doutorado.

Agradeço ao meu time de futsal ICBIÓ, o time mais legal, mais tumulto, mais amor que eu já conheci. É um prazer imenso treinar e competir com vocês, mesmo que isso às vezes signifique deixar de sair com outras pessoas e ir dormir duas horas da manhã. Esses momentos foram muito importantes para mim, assim tive outros objetivos na vida que não foram apenas fazer pesquisa, relaxei a mente, cuidei da minha saúde e dei muitas risadas (de chorar e doer a barriga) enquanto fiz grandes amigas e amigos que eu espero continuar convivendo por muito tempo.

Agradeço ao meu namorado Zé, meu querido que sempre me ajudou no que fosse possível mesmo com a distância. Quase posso chamá-lo de co-orientador, porque muitas dúvidas que eu tinha em relação a técnicas de laboratório ele me ajudava a solucionar. Me ajudou inclusive fazendo perguntas sobre meu projeto que eu mesma nunca tinha pensado. Ele é outra pessoa que tenho como exemplo de pesquisador, por sua inteligência, dedicação ao trabalho e perfeccionismo nos experimentos e apresentação dos dados. Obrigada também por me acalmar e me incentivar quando tudo parecia dar errado na pesquisa e por todos momentos maravilhosos que passamos em Ithaca e no Brasil.

Agradeço aos meus pais pela minha educação que me tornou quem sou hoje. Obrigada pela preocupação em sempre me dar tudo do melhor que vocês podiam, sempre pensando no que seria melhor para meu presente e futuro. Obrigada pela liberdade que tenho em decidir o que fazer da vida e por confiarem nas minhas escolhas. Obrigada pelo amor e carinho que sempre me deram e me fez ser uma pessoa confiante e independente. Agradeço também aos meus avós, tias e irmão por todo carinho e preocupação em saber como vão meus experimentos e por torcerem para as coisas darem certo. Fico muito feliz de ter uma família tão querida como a nossa, que se preocupa com o bem estar de todos e faz os almoços de domingo serem tão gostosos.

**“Toda a nossa ciência,
comparada com a realidade, é
primitiva e infantil - e, no
entanto, é a coisa mais
preciosa que temos.”**

Albert Einstein

RESUMO

Magdalon J. A ativação constitutiva de mTORC1 em adipócitos aumenta a capacidade oxidativa mitocondrial e reduz a adiposidade visceral em camundongos. [Tese (Fisiologia Humana)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

A atividade do complexo 1 da proteína alvo mecanístico da rapamicina (mTORC1), um importante regulador da adiposidade e do metabolismo de lipídeos, está aumentada no tecido adiposo de camundongos obesos. A inibição de mTORC1 pelo tratamento com rapamicina ou deleção de Raptor reduz a adiposidade, enquanto que sua inibição parcial potencializa a obesidade induzida por dieta. Assim, hipotetizamos que um nível ótimo de ativação de mTORC1 é necessário para que este complexo promova suas ações pró-lipogênicas de aumento da adiposidade, de forma que sua super-ativação seria tão inibitória para a deposição de gordura quanto sua inibição completa. Para testar esta hipótese, investigamos no presente estudo os efeitos da ativação constitutiva de mTORC1 especificamente em adipócitos na adiposidade *in vivo*. Para isto, camundongos com ativação constitutiva de mTORC1 em adipócitos induzida pela deleção de *Tsc1*, um inibidor *upstream* de mTORC1, foram produzidos através do cruzamento de camundongos *Tsc1^{Lox/Lox}* com camundongos que expressam a enzima recombinase-Cre sob o controle do promotor da adiponectina (sistema Cre-Lox). Ambos animais controle (ATscWT) e com deleção de *Tsc1* no tecido adiposo (ATscKO) foram alimentados com dieta *chow* Nuvilab padrão (63% carboidrato, 25% proteína, 12% gordura, em Kcal), ou dietas purificadas com baixo teor de gordura (LFD; 70% carboidrato, 20% proteína, 10% gordura, em Kcal) e hiperlipídica (HFD; 20% carboidrato, 20% proteína, 60% gordura, em Kcal). Os animais foram avaliados para peso corporal e de diferentes tecidos, gasto energético, metabolismo de glicose e de lipídeos, função mitocondrial, expressão gênica e proteica. Na dieta padrão, a deleção de *Tsc1* reduziu a massa, assim como o número e o diâmetro, dos adipócitos do tecido adiposo retroperitoneal (visceral), mas não do inguinal (subcutâneo), fenótipos que foram associados ao aumento da lipólise e do conteúdo de UCP-1 (*browning*). A deleção de *Tsc1* também promoveu em ambos tecidos adiposos visceral e subcutâneo aumento na massa mitocondrial, respiração basal, oxidação de ácidos graxos e expressão de PGC-1 α e PPAR α . Por outro lado, a deleção de *Tsc1* não alterou a expressão de UCP-1 e a respiração basal no tecido adiposo marrom. Nas dietas purificadas com baixo e alto teor de gordura, a deleção de *Tsc1* reduziu a adiposidade visceral e melhorou a tolerância à glicose, a sinalização da insulina no fígado e músculo e os níveis séricos de adiponectina. Assim, a deleção de *Tsc1* especificamente em adipócitos aumenta a atividade oxidativa mitocondrial, induz *browning* e reduz a adiposidade visceral em camundongos. Esses dados apoiam nossa hipótese de que é necessário um nível ótimo de ativação de mTORC1 para que este complexo exerça ações pró-lipogênicas de aumento da adiposidade.

Palavras-chave: mTOR. Tecido adiposo. Adiposidade. Metabolismo oxidativo. Mitocôndria. UCP-1. *Browning*. Células beges.

ABSTRACT

Magdalon J. Constitutive adipocyte mTORC1 activation enhances mitochondrial oxidative capacity and reduces visceral adiposity in mice. [Ph.D. Thesis (Human Physiology)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

The activity of mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1), an important regulator of adiposity and lipid metabolism, is increased in adipose tissue of obese mice. mTORC1 inhibition by treatment with rapamycin or Raptor deletion reduces adiposity, whereas partial mTORC1 inhibition enhances diet-induced obesity. Therefore, we hypothesized that an optimal level of mTORC1 activity is required for the positive, pro-lipogenic actions of this complex upon adiposity, in such a manner that mTORC1 overactivation would be as inhibitory to fat deposition as its complete inhibition. To test this hypothesis, we investigated herein the effects of constitutive mTORC1 activation specifically in adipocytes on adiposity *in vivo*. For this, mice with constitutive mTORC1 activation in adipocytes induced by the deletion of tuberous sclerosis complex (*Tsc1*), an upstream mTORC1 inhibitor, were produced by crossing *Tsc1*^{Lox/Lox} mice with mice expressing Cre-recombinase under control of adiponectin promoter (Cre-Lox system). Both control (ATscWT) and mice with adipose tissue *Tsc1* knockout (ATscKO) were fed with a standard chow diet (63% carbohydrate, 25% protein, 12% fat, in Kcal), or purified low-fat (LFD; 70% carbohydrate, 20% protein, 10% fat, in Kcal) and high-fat (HFD; 20% carbohydrate, 20% protein, 60% fat, in Kcal) diets and evaluated for body and tissue masses, energy expenditure, glucose and lipid metabolism, mitochondrial function, mRNA and protein expression. On a chow diet, *Tsc1* deletion reduced retroperitoneal (visceral), but not inguinal (subcutaneous), fat mass, as well as adipocyte number and diameter, phenotypes that were associated with increased lipolysis and UCP-1 content (browning). *Tsc1* deletion also enhanced mitochondrial mass, basal respiration, fatty acid oxidation and the expression of PGC-1 α and PPAR α in both visceral and subcutaneous fat. In brown adipose tissue, however, *Tsc1* deletion did not affect UCP-1 content and basal respiration. Adipocyte *Tsc1* deletion also reduced visceral adiposity and enhanced glucose tolerance, liver and muscle insulin signaling and adiponectin secretion in mice fed with the purified low- or high-fat diets. In conclusion, adipocyte-specific *Tsc1* deletion enhances mitochondrial oxidative activity, induces browning and reduces visceral adiposity in mice. These data support our hypothesis that an optimal level of mTORC1 activation is necessary for its pro-lipogenic actions upon adiposity.

Keywords: mTOR. Adipose tissue. Adiposity. Oxidative metabolism. Mitochondria. UCP-1. Browning. Beige cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diferentes depósitos de tecido adiposo em camundongo	21
Figura 2 - Via da síntese de TAG	23
Figura 3 - Metabolismo mitocondrial associando a β -oxidação com a síntese de ATP pela cadeia de transporte de elétrons	24
Figura 4 - Regiões de tecido adiposo marrom encontradas em humanos.....	26
Figura 5 - Visão geral da sinalização da via de mTORC1.....	29
Figura 6 - Hipótese sobre relação entre atividade de mTORC1 e adiposidade	32
Figura 7 - Esquema dos cruzamentos dos camundongos pelo sistema Cre-Lox para obtenção dos animais utilizados neste projeto: ATscWT e ATscKO.....	34
Figura 8 - Padrão de bandas dos géis de genotipagem para adiponectin-cre e $Tsc1^{Lox/Lox}$	35
Figura 9 - A deleção de <i>Tsc1</i> induz ativação de mTORC1 e inibição de mTORC2..	47
Figura 10 - A deleção de <i>Tsc1</i> reduz o rWAT em machos.....	48
Figura 11 - A deleção de <i>Tsc1</i> reduz pWAT, rWAT e iWAT em fêmeas.....	49
Figura 12 - A deleção de <i>Tsc1</i> estimula a oxidação de ácido graxo e a lipólise no rWAT	51
Figura 13 - A deleção de <i>Tsc1</i> estimula a expressão de genes lipogênicos.....	52
Figura 14 - A deleção de <i>Tsc1</i> em machos estimula o <i>browning</i> no rWAT e a atividade mitocondrial em ambos rWAT e iWAT	54
Figura 15 - A deleção de <i>Tsc1</i> em fêmeas estimula o <i>browning</i> em ambos rWAT e iWAT	55
Figura 16 - A deleção de <i>Tsc1</i> estimula a expressão de fatores de transcrição envolvidos no <i>browning</i>	58
Figura 17 - A deleção de <i>Tsc1</i> reduz o rWAT e o eWAT em machos alimentados com LFD	59
Figura 18 - A deleção de <i>Tsc1</i> melhorou a tolerância à glicose em machos alimentados com LFD.....	60
Figura 19 - A deleção de <i>Tsc1</i> estimula o <i>browning</i> e a expressão de enzimas mitocondriais apenas no rWAT de machos alimentados com LFD.....	61

Figura 20 - A deleção de <i>Tsc1</i> reduz o rWAT e o eWAT em machos alimentados com HFD	62
Figura 21 - A deleção de <i>Tsc1</i> melhorou a tolerância à glicose em machos alimentados com HFD	62
Figura 22 - A deleção de <i>Tsc1</i> estimula a expressão de enzimas mitocondriais apenas no rWAT de machos alimentados com HFD	63
Figura 23 - Resumo dos achados do nosso estudo	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Ingredientes das dietas com pouco teor de gordura (LFD) e hiperlipídica (HFD).....	36
Tabela 2 - Composição de ácidos graxos (mg/g) das dietas com pouco teor de gordura (LFD) e hiperlipídica (HFD).....	37
Tabela 3 - Primers utilizados no PCR em tempo real	43
Tabela 4 - Visão geral dos fenótipos associados à deleção de <i>Tsc1</i> em adipócitos no rWAT e iWAT de machos alimentados com a dieta <i>chow</i>	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4E-BP - proteínas de ligação ao fator de iniciação eucariótico 4E

ACC - acetil-CoA carboxilase

AG - ácido(s) graxo(s)

AGPAT - 1-acilglicerol-3-fosfato aciltransferase

AMPC - monofosfato cíclico de adenosina

ANOVA - análise de variância

ATGL - lipase de TAG do tecido adiposo

ATP - adenosina trifosfato

ATscKO - *adipose-specific Tsc knockout*, i.e., animais $Tsc1^{Lox/Lox}$ na presença de *adiponectin-cre*

ATscWT - *adipose-specific Tsc wild type*, i.e., animais $Tsc1^{Lox/Lox}$ na ausência de *adiponectin-cre*

BP - pares de base

BSA - albumina sérica bovina

C/EBP - proteína estimuladora de ligação a CCAAT

CG - cromatografia gasosa

CO₂ - gás carbônico

CPT I - carnitina-acil transferase I

CT - tomografia computadorizada

CYC1 - citocromo c-1

DAG - diacilglicerol

Deptor - proteína de interação a mTOR contendo o domínio DEP

DGAT - diacilglicerol aciltransferase

DMSO - dimetilsulfóxido

DTNB - 5,5'-ditiobis(2-ácido nitrobenzoico)

ER - receptor de estrógeno

ERK - quinase regulada por sinal extracelular

ERR - receptor relacionado a estrógeno

eWAT - *epididymal white adipose tissue*, i.e., tecido adiposo branco epididimal

FABP4 - proteína ligante de ácido graxo 4

FADH₂ - flavina adenina dinucleotídeo

FAME - ésteres de metil de AG

FAS - ácido graxo sintase

FATP - proteína transportadora de ácidos graxos

FKBP12 - proteína ligante de FK506 de 12 kDa

GAP - proteína ativadora de GTPase

GEF - fator de troca de nucleotídeo de guanina

GPAT - glicerol 3-fosfato aciltransferase

GTP - trifosfato de guanosina

HFD - *high-fat diet*, i.e., dieta hiperlipídica

HSL - lipase hormônio-sensível

iBAT - *interscapular brown adipose tissue*, i.e., tecido adiposo marrom interescapular

IRS1 - substrato do receptor de insulina 1

iWAT - *inguinal white adipose tissue*, i.e., tecido adiposo branco inguinal

LPL - lipase de lipoproteína

LFD - *low-fat diet*, i.e., dieta com pouco teor de gordura

MAG - monoacilglicerol

MAPK - proteína quinase ativada por mitógeno

MEF - fibroblastos embrionários de camundongos

mLST8 - proteína 8 letal em mamíferos com Sec13

mSIN1 - proteína de interação à proteína quinase ativada por estresse de mamíferos

mTOR - proteína alvo mecanístico da rapamicina

mTORC - complexo da mTOR

NADH - nicotinamida adenina dinucleotídeo

NDUFB - NADH desidrogenase [ubiquinona] 1 β

PAK - quinase ativada por p21

PBS - tampão fosfato-salino

PCR - reação em cadeia da polimerase

PDK1 - proteína quinase dependente de 3'-fosfatidil-inositol 1

PEPCK - fosfoenolpiruvato carboxiquinase

PET - tomografia de emissão de pósitrons

PGC-1 α - coativador de PPAR γ

PI3K - fosfatidil-inositol 3-quinase

PIP₃ - fosfatidil-inositol (3,4,5)-trifosfato

PKA - proteína quinase A

PKC - proteína quinase C

PPAR - receptor ativado por proliferadores de peroxissoma

PRAS40 - substrato rico em prolina da Akt de 40 kDa

PRDM16 - domínio de PR contendo 16

pWAT - *perigonadal white adipose tissue*, i.e., tecido adiposo branco perigonadal

Protor-1 - proteína observada com Rictor-1

Raptor - proteína reguladora associada a mTOR

RHEB - homóloga de Ras enriquecida no cérebro

Rictor - companheiro da mTOR não-sensível à rapamicina

rWAT - *retroperitoneal white adipose tissue*, i.e., tecido adiposo branco retroperitoneal

S6K - quinases de S6

SDHB - complexo da succinato desidrogenase, subunidade B

SESN - SESTRIN 1/2/3

SGK1 - proteína quinase induzida por soro e glicocorticoides

SREBP - proteína ligante aos elementos reguladores de esteroides

TAG - triacilglicerol

TAG-AG - ácidos graxos provenientes de triacilglicerol

TGF - fator de crescimento transformador

TSC - complexo da esclerose tuberosa

U.A. - unidades arbitrárias

UCP-1 - proteína desacopladora 1

VLDL - lipoproteína de densidade muito baixa

VO₂ - consumo de oxigênio

WT - wild type, i.e., selvagem

YY1 - yin yang 1

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 OBESIDADE E TECIDO ADIPOSEO	20
1.2 BIOLOGIA DA mTOR.....	27
1.3 mTORC1 E ADIPOSIDADE	30
1.4 JUSTIFICATIVA DO TRABALHO.....	31
1.5 HIPÓTESE	32
2 OBJETIVOS	32
3 MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 ANIMAIS.....	33
3.2 GENOTIPAGEM.....	35
3.3 DESENHO EXPERIMENTAL.....	36
3.4 WESTERN BLOT	38
3.5 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA	39
3.6 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE TAG	39
3.7 HISTOLOGIA.....	39
3.8 CALORIMETRIA INDIRETA.....	40
3.9 TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE.....	40
3.10 METABOLISMO DE GLICOSE E ÁCIDOS GRAXOS.....	40
3.11 LIPÓLISE.....	41
3.12 ANÁLISE DO SORO	42
3.13 EXTRAÇÃO DE RNA E TRANSCRIÇÃO REVERSA	42
3.14 PCR EM TEMPO REAL	42
3.15 ATIVIDADE DA CITRATO SINTASE	44
3.16 ATIVIDADE DA CADEIA DE TRANSPORTE DE ELÉTRONS	44
3.17 CONSUMO DE O ₂ TECIDUAL.....	44
3.18 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	44
3.19 ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
4 RESULTADOS	46
5 DISCUSSÃO	64
6 CONCLUSÃO	71
REFERÊNCIAS	72
APÊNDICE A - ARTIGO PUBLICADO	84

1 INTRODUÇÃO

1.1 OBESIDADE E TECIDO ADIPOSEO

O aumento contínuo da prevalência da obesidade é um fato alarmante para a saúde pública mundial devido à sua associação com a incidência de diversas doenças, como o diabetes tipo II (1), doenças cardiovasculares (2), doença crônica renal (3), esteatose hepática (4) e alguns tipos de câncer (5). De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2013), aproximadamente 56,9% dos brasileiros adultos apresentam sobrepeso (índice de massa corpórea ou IMC ≥ 25 kg/m²), sendo que 20,8% deles são obesos (IMC ≥ 30 kg/m²). A Organização Mundial de Saúde classifica a obesidade como uma pandemia mundial que exige uma urgente intervenção global (6).

A obesidade é definida como o aumento excessivo da massa do tecido adiposo que resulta de equilíbrio energético positivo gerado por períodos prolongados de ingestão calórica maior que gasto energético. O equilíbrio entre o consumo e gasto energético é influenciado por um complexo conjunto de fatores genéticos (responsável por dois terços da variabilidade do IMC (7)), ambientais e sociais, sendo o tecido adiposo o principal responsável por estocar ou liberar substratos energéticos de acordo com o estado nutricional do organismo. Na presença de equilíbrio energético positivo, ocorre acúmulo de gordura no tecido adiposo na forma de triacilglicerol (TAG), provocando aumento no diâmetro dos adipócitos (hipertrofia). A hipertrofia dos adipócitos é geralmente seguida de proliferação de células progenitoras e sua diferenciação em adipócitos maduros, aumentando o número de adipócitos disponíveis para estoque do excesso de energia (hiperplasia). Além de atuar como depósito de energia, o tecido adiposo tem importante participação na homeostase corporal como órgão endócrino, secretando diversos hormônios denominados de adipocinas (proteínas) e lipocinas (lipídeos) que atuam em outros tecidos modulando diversos processos metabólicos. O tecido adiposo é geralmente dividido entre depósitos viscerais e subcutâneos, sendo os primeiros associados às doenças metabólicas decorrentes da obesidade e os segundos à proteção a tais doenças. Essa divisão é, entretanto, simplificada, visto que há diversos depósitos viscerais ou subcutâneos com diferentes propriedades (8-

10). Os diferentes depósitos de tecido adiposo em camundongo podem ser encontrados na Figura 1.

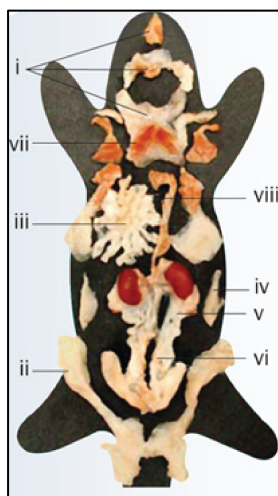


Figura 1 - Diferentes depósitos de tecido adiposo em camundongo. Tecido adiposo branco subcutâneo: i. Anterior; ii. Inguinal. Tecido adiposo branco visceral: iii. Mesentérico; iv. Retroperitoneal; v. Perirrenal; vi. Epididimal. Tecido adiposo marrom: vii. Interescapular; viii. Mediastinal. Adaptado de (11).

Os ácidos graxos (AG) esterificados na forma de TAG no tecido adiposo podem ser produzidos pela síntese local denominada de lipogênese *de novo* ou captados da circulação sanguínea. A lipogênese *de novo* é o processo pelo qual AG são sintetizados a partir de aminoácidos, glicose e outros substratos. Inicialmente, esses substratos, por vias metabólicas distintas, são metabolizados a acetil-CoA na mitocôndria, que reage com oxaloacetato pela ação da citrato sintase, formando citrato. Quando há acúmulo mitocondrial de citrato, este é transportado para o citosol onde sofre clivagem pela enzima ATP-citrato-liase, formando novamente acetil-CoA e oxaloacetato. O acetil-CoA citosólico pode sofrer carboxilação pela acetil-CoA carboxilase (ACC), que é ativada por citrato e insulina, gerando malonil-CoA. O malonil-CoA, por sua vez, serve como intermediário para a síntese de AG pela ação da ácido graxo sintase (FAS) (12). A lipogênese *de novo* é responsável por aproximadamente 20% dos ácidos graxos estocados como TAG no tecido adiposo em humanos (13), sendo o restante composto por ácidos graxos pré-formados obtidos da dieta ou sintetizados no fígado, que são transportados para o tecido adiposo na forma livre não-esterificada pela albumina, ou na forma esterificada como TAG por quilomícrons ou lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL). À medida que passam pelos capilares do tecido adiposo, os TAG são hidrolisados em AG e

monoacilglicerol pela ação da lipase de lipoproteínas (LPL) presente no endotélio. A absorção dos AG é então facilitada pela ação das proteínas transportadoras de AG (FATP) e CD36. Uma vez captado pelos adipócitos, os AG são novamente incorporados em TAG. Alternativamente, eles se ligam à proteína ligante de AG 4 (FABP4), que os direciona para diferentes vias metabólicas ou para o núcleo, protegendo as células dos danos provocados pelo acúmulo intracelular de AG livres (14).

A síntese de TAG compreende a esterificação dos três carbonos de uma molécula de glicerol 3-fosfato com acil-CoA, processo denominado acilação. Os AG formados pelo processo de lipogênese *de novo* ou captados da circulação podem sofrer ação da acil-CoA sintetase, gerando acil-CoA. Já o glicerol 3-fosfato, pode ser gerado tanto pelas vias glicolítica ou gliceroneogênica, tendo como precursor comum a diidroxiacetona 3-fosfato, quanto pela fosforilação direta do glicerol catalisada pela gliceroquinase. A gliceroneogênese converte, via reversão parcial de glicólise, substratos de três carbonos como lactato, piruvato e aminoácidos em glicerol 3-fosfato, um processo que tem como enzima chave a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) (15). Inicialmente, a via de síntese de TAG envolve a acilação de glicerol 3-fosfato na mitocôndria ou retículo endoplasmático pela ação da glicerol 3-fosfato aciltransferase (GPAT), formando o ácido lisofosfatídico. Em seguida, já no retículo endoplasmático, o ácido lisofosfatídico sofre uma segunda acilação na posição sn-2 pela ação da 1-acilglicerol-3-fosfato aciltransferase (AGPAT), formando o ácido fosfatídico. Além de ser o precursor de fosfatidilglicerol, fosfatidil-inositol e cardiolipina, o ácido fosfatídico pode sofrer a retirada do grupamento fosfato ligado ao carbono três pela ação da fosfatase de fosfatídeos, denominada de lipina, formando diacilglicerol (DAG). DAG pode então ser tanto direcionado para a síntese de fosfolípídeos quanto esterificado pela DAG aciltransferase (DGAT) formando, por fim, TAG (16, 17) (Figura 2).

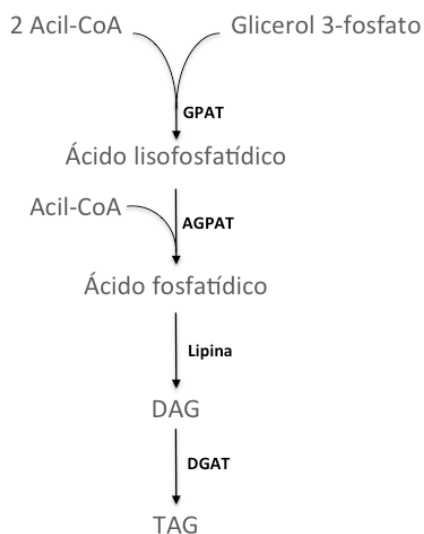


Figura 2 - Via da síntese de TAG.

Os TAG são armazenados nos adipócitos até sofrerem lipólise em situações de jejum e exercício físico, por exemplo, liberando AG e glicerol que podem ser utilizados localmente ou por outros tecidos como fonte de energia. O processo de lipólise envolve três etapas consecutivas: hidrólise de TAG a DAG catalisada pela lipase de TAG do tecido adiposo (ATGL); hidrólise de DAG a monoacilglicerol (MAG) catalisada pela lipase hormônio-sensível (HSL); e hidrólise de MAG a AG e glicerol catalisada pela lipase de MAG (MGL). A lipólise é estimulada principalmente pelas catecolaminas e glucagon através de uma cascata de sinalização intracelular que envolve o aumento de monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) e ativação da proteína quinase A (PKA). Esta então fosforila tanto a enzima HSL, promovendo sua translocação para a gota lipídica, quanto a perilipina-1, liberando o gene comparativo de identificação-58 (CGI-58), que interage e ativa a ATGL (18).

Os AG produzidos pela lipólise podem ser liberados na circulação sanguínea, ser novamente incorporados a moléculas de TAG pelo processo de re-esterificação ou oxidados na mitocôndria dos adipócitos. Para serem oxidados, os AG são convertidos a acil-CoA e transportados para o interior das mitocôndrias na forma de acil-carnitina, gerada pela ação da carnitina-acil transferase I (CPT I), que é ativada em situações de queda de malonil-CoA. O acil-CoA é então oxidado na matriz mitocondrial por uma via cíclica denominada β -oxidação, onde a cada ciclo é liberado um acetil-CoA, uma flavina adenina dinucleotídeo (FADH₂), uma

nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) e um acil-CoA com dois carbonos a menos, que recomeça o ciclo até ser totalmente convertido a acetil-CoA. O acetil-CoA produzido neste processo é então oxidado no ciclo de Krebs, liberando três NADH, um FADH_2 e um trifosfato de guanosina (GTP). Subsequentemente, as coenzimas reduzidas (NADH e FADH_2) são oxidadas pela cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria, onde seus elétrons são transferidos através dos complexos I, II, III e IV até por fim reduzir o O_2 a H_2O . A passagem dos elétrons pelos complexos I, III e IV favorece o bombeamento de prótons para o espaço intermembranas da mitocôndria, formando um gradiente de prótons. O retorno dos prótons à matriz mitocondrial se faz através da passagem pela adenosina trifosfato (ATP)-sintase, a qual se utiliza da energia do gradiente de prótons para sintetizar ATP (19, 20) (Figura 3). A oxidação de um ácido graxo rende, portanto, mais ATP que a oxidação da glicose.

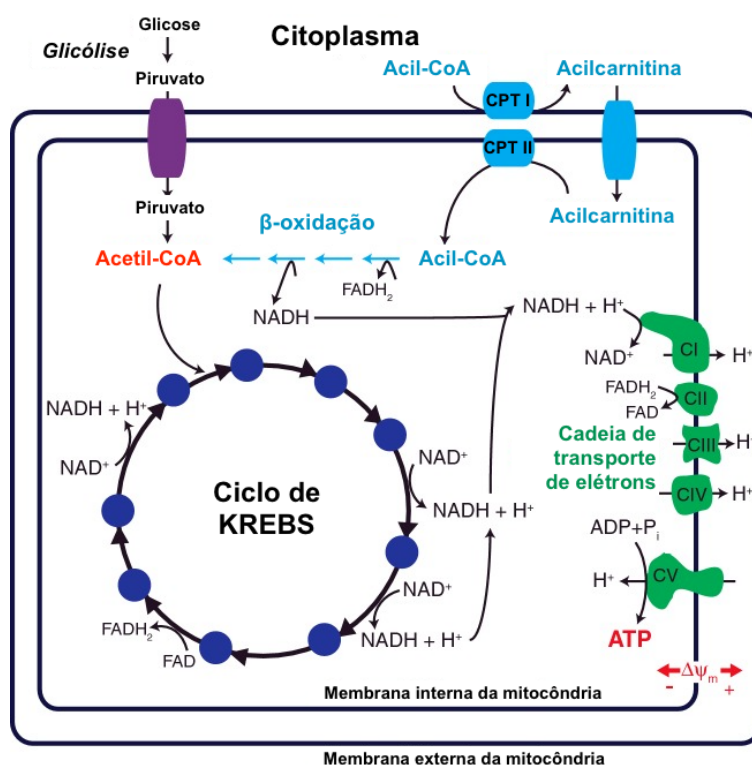


Figura 3 - Metabolismo mitocondrial associando a β -oxidação com a síntese de ATP pela cadeia de transporte de elétrons. Adaptado de (20).

O tecido adiposo é um órgão heterogêneo composto por diversos tipos celulares incluindo fibroblastos, pré-adipócitos, células endoteliais, macrófagos, células nervosas e os adipócitos, que são classificados de acordo com sua função e

características morfológicas em três tipos: branco, marrom e bege. Os adipócitos brancos possuem uma única grande gotícula de gordura intracelular (unilocular), poucas mitocôndrias e tem como função principal o armazenamento/liberação de energia e a secreção de adipocinas/lipocinas. Já os adipócitos marrons são multiloculares, ricos em mitocôndrias e tem como função principal a produção de calor pelo processo de termogênese independente do tremor muscular (21). Este processo é catalisado pela proteína desacopladora mitocondrial 1 (UCP-1), que, após ativação alostérica por AG oriundos da lipólise dos estoques intracelulares de TAG, promove o desacoplamento mitocondrial e assim a liberação da energia do gradiente de prótons na forma de calor (22).

Recentemente foi identificado nos depósitos de tecido adiposo branco um terceiro tipo de adipócito, denominado bege, que apresenta características mistas de adipócitos brancos e marrons. Estes adipócitos, dependendo do estímulo vigente, podem se comportar funcionalmente como adipócito branco clássico atuando no armazenamento de gordura ou como adipócito marrom na produção de calor. O recrutamento destes adipócitos para o fenótipo termogênico, processo denominado *browning*, ocorre principalmente na presença de estímulo β -adrenérgico (23), como na exposição ao frio, por exemplo, ou pela ativação farmacológica do receptor ativador da proliferação de peroxissomas (PPAR) γ (24). O *browning* é caracterizado pelo aumento do conteúdo de mitocôndrias, UCP-1 e outras proteínas envolvidas no processo de termogênese, bem como predominância do perfil multilocular de depósito de TAG (25). Há evidências de que os adipócitos beges podem se originar diretamente da transdiferenciação de adipócitos brancos (26) ou de células precursoras presentes no tecido adiposo (27). Embora boa parte dos adipócitos marrons seja derivada da linhagem *Myf5*⁺, bem como os miócitos esqueléticos, as células beges podem se originar de células precursoras *Myf5*⁺ ou *Myf5*⁻ dependendo do depósito de tecido adiposo branco (28, 29). A linhagem exata que dá origem às células beges ainda não está totalmente estabelecida, mas há evidências de que pelo menos parte destas células é derivada de um precursor em comum com células do músculo liso (30). Por outro lado, vários estudos já demonstraram que a expressão do corregulador domínio de PR contendo 16 (PRDM16) é fundamental para o recrutamento dos adipócitos beges (31-33).

A recente identificação de quantidades razoáveis de tecido adiposo marrom e bege (Figura 4) com atividade inversamente proporcional à temperatura e à adiposidade em humanos adultos (34-36) aumentou o interesse no estudo destes tecidos como alternativa para o tratamento de doenças metabólicas. Antes disso, acreditava-se que o tecido adiposo marrom estaria presente em humanos somente em recém-nascidos, sofrendo desta forma regressão nos primeiros anos de vida (37). A tomografia de emissão de pósitrons (PET) com fluorodeoxiglicose permite a identificação de regiões do organismo com intensa atividade metabólica, sendo assim altamente utilizada no diagnóstico de tumores malignos. Por muito tempo o uso clínico de PET identificou pontos simétricos nas regiões torácicas e dos ombros com alta captação de fluorodeoxiglicose. Como tumores não estariam distribuídos simetricamente, acreditava-se que essas regiões seriam músculos tensionados (38). Com o uso do PET associado à tomografia computadorizada (CT), que possibilitou a visualização da densidade e composição dos tecidos, foi possível identificar esses pontos como sendo na realidade tecido adiposo marrom (39-41). Subsequentemente, foi demonstrado que o "tecido adiposo marrom" humano é composto por células com características moleculares parecidas com os adipócitos beges e marrons dos camundongos (42).

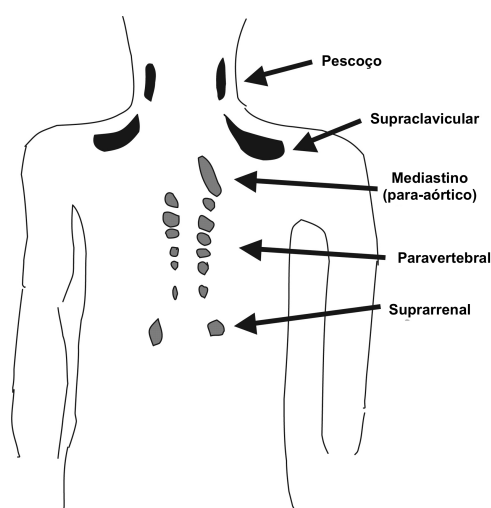


Figura 4 - Regiões de tecido adiposo marrom encontradas em humanos. Adaptado de (38).

1.2 BIOLOGIA DA mTOR

A insulina é um dos principais hormônios que estimula a deposição de gordura no tecido adiposo. Suas ações são essencialmente anabólicas estimulando a biossíntese e o estoque de lipídeos neste tecido. As ações da insulina nos adipócitos são mediadas por uma complexa via de sinalização intracelular. A interação da insulina com seu receptor promove alteração conformacional, aumento da atividade tirosina quinase intrínseca do mesmo, autofosforilação, bem como, a fosforilação do substrato do receptor de insulina 1 (IRS1), que por sua vez ativa alostericamente a fosfatidil-inositol 3-quinase (PI3K) e a produção de fosfatidil-inositol (3,4,5)-trifosfato (PIP3). O aumento do conteúdo de PIP3 promove o recrutamento e ativação da proteína quinase dependente de 3'-fosfatidil-inositol 1 (PDK1) e do complexo 2 da proteína alvo mecanístico da rapamicina (mTORC2), os quais recrutam e ativam a AKT através da fosforilação em resíduos de Thr308 e Ser473, respectivamente (43, 44). Após sua ativação, a AKT fosforila e inibe TSC2, que em conjunto com TSC1 e TBC1D7, forma o complexo da esclerose tuberosa (TSC). Quando na membrana de lisossomos, TSC atua como ativador de GTPases (GAP), promovendo a atividade GTPase da proteína homóloga de Ras enriquecida no cérebro (RHEB), estimulando assim a conversão de RHEB-GTP para RHEB-GDP. A fosforilação de TSC2 pela AKT promove a dissociação do complexo TSC da membrana do lisossomo, impossibilitando sua ação em RHEB (45). O RHEB-GTP interage fisicamente e ativa o complexo 1 da mTOR (mTORC1), o qual também fica ancorado à membrana de lisossomos na presença de aminoácidos (46). A insulina também pode estimular mTORC1 através da ativação da via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK)/quinase regulada por sinal extracelular (ERK), que também acaba por fosforilar e inibir o complexo TSC (47). Desta forma, a sinalização da insulina reduz a atividade inibidora do complexo TSC e ativa mTORC1 (Figura 5).

O mecanismo pelo qual os aminoácidos promovem o recrutamento de mTORC1 para os lisossomos é bastante complexo e ainda não completamente compreendido. O complexo RAG GTPase é o regulador chave desta sinalização. Ele se localiza na membrana dos lisossomos ancorado a outro complexo denominado RAGULATOR e, na presença de aminoácidos, é ativado por diversas vias, recrutando mTORC1 do citoplasma para os lisossomos (48). O complexo RAG GTPase é um heterodímero formado por RAGA ou RAGB (RAGA/B) e RAGC ou

RAGD (RAGC/D). A forma ativa deste complexo se dá quando RAGA/B está ligado ao GTP e RAGC/D está ligado ao GDP. Na presença de aminoácidos, o complexo RAGULATOR interage com a v-ATPase do lisossomo e atua como fator de troca de nucleotídeo de guanina (GEF), catalisando a troca de RAGA/B-GDP para RAGA/B-GTP (46). Há também outros complexos e proteínas importantes regulando o RAG GTPase (49), como o GATOR1 e GATOR2. Na presença de aminoácidos, GATOR2 está ativo e inibe GATOR1, que possui atividade GAP no RAGA/B e estimula sua conversão para RAGA/B-GDP, inativando o complexo RAG GTPase (50). Na ausência de aminoácidos, GATOR2 interage e é inibido por SESTRIN 1/2/3 (SESN) e CASTOR1, sendo esta inibição interrompida quando SESN é ligado à leucina e CASTOR 1 à arginina (49, 51).

O mTORC1 é formado por quatro proteínas além da própria mTOR, que pertence à família de quinases relacionadas à PI3K: proteína reguladora associada a mTOR (Raptor) e proteína 8 letal em mamíferos com Sec13 (mLST8), que são essenciais para o funcionamento de mTORC1, e substrato rico em prolina da AKT de 40 kDa (PRAS40) e proteína de interação a mTOR contendo o domínio DEP (Deptor), que inibem a atividade do mTORC1. mTORC1 possui ações essencialmente anabólicas e assim estimula a síntese de proteínas e lipídeos e inibe a autofagia. Sua sinalização ocorre principalmente através da fosforilação das quinases de S6 (S6K1 e S6K2) e das proteínas de ligação ao fator de iniciação eucariótico 4E (4E-BP1 e 4E-BP2), ativando-as e inibindo-as, respectivamente (Figura 5). Após sua fosforilação e ativação por mTORC1, a S6K1 catalisa o *feedback* negativo na via de sinalização da insulina através da fosforilação de resíduos de serina em IRS-1. Dentre os sinais que regulam a atividade de mTORC1, temos: fatores de crescimento, concentração de ATP intracelular, glicose, aminoácidos e oxigênio. Assim, pode-se dizer que mTORC1 é responsável por manter a homeostase celular e do organismo coordenando processos anabólicos e catabólicos (43, 52).

De maneira similar ao complexo 1, mTORC2 é também formado pela mTOR, mLST8 e Deptor, que estão, entretanto, associadas a três proteínas únicas: companheiro da mTOR não-sensível à rapamicina (Rictor), proteína de interação à proteína quinase ativada por estresse de mamíferos (mSIN1) e proteína observada com Rictor-1 (Protor-1). Além da AKT, o mTORC2 fosforila e ativa a proteína

quinase induzida por soro e glicocorticoides (SGK1) e a proteína quinase C (PKC) (Figura 5). Dessa forma, mTORC2 está envolvido no controle do anabolismo, ciclo e sobrevivência celular.

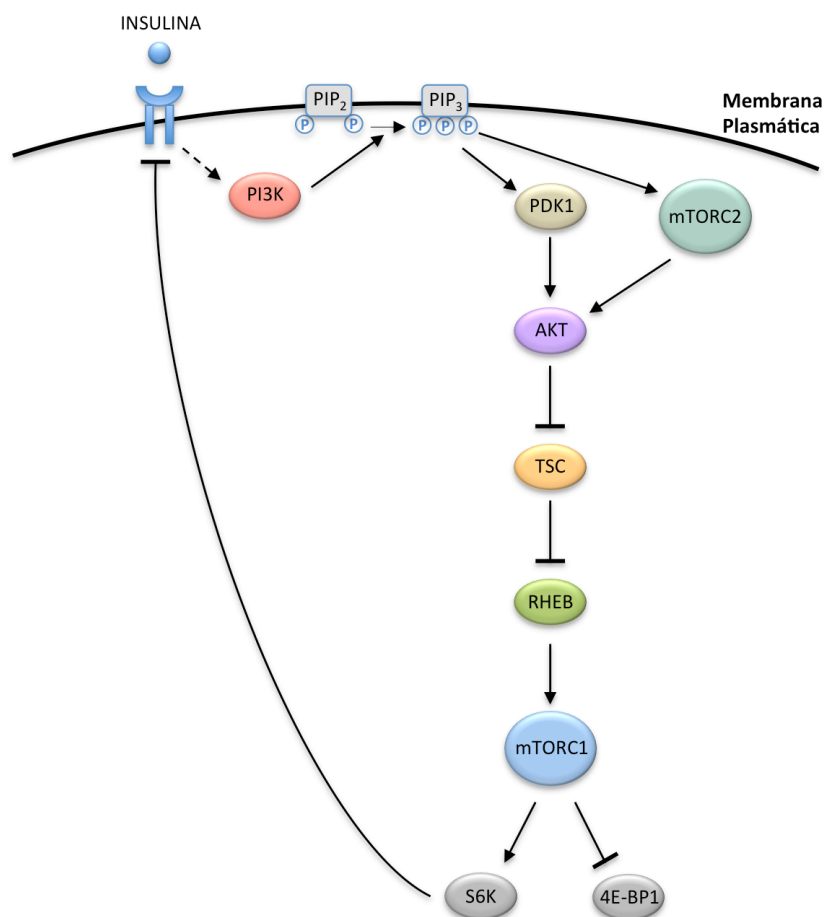


Figura 5 - Visão geral da sinalização da via de mTORC1.

A descoberta de TOR (homólogo de mTOR em levedura) (53, 54) e subsequentemente de mTOR (55), como o próprio nome sugere, se deu pelo interesse em identificar o alvo da rapamicina, um metabólito antifúngico produzido por *Streptomyces hygroscopicus* no solo da Ilha de Páscoa (também conhecida como Rapa Nui). A rapamicina forma um complexo com a proteína ligante de FK506 de 12 kDa (FKBP12), que interage e inibe alostericamente mTORC1, exercendo assim potentes efeitos imunossupressores e antiproliferativos (56). A rapamicina é um inibidor parcial de mTORC1, ou seja, bloqueia a fosforilação de substratos que apresentam menor afinidade pelo complexo, como a S6K, e não afeta a fosforilação

de substratos com maior afinidade, como a 4E-BP (57). Diferentemente de mTORC1, somente o tratamento prolongado com rapamicina em alguns tipos específicos de células inibe a atividade de mTORC2 (52). Recentemente um novo inibidor de mTOR denominado Torina1 foi desenvolvido. Torina1, que compete com o ATP pelo seu sítio de interação na quinase mTOR, inibe completamente a atividade de mTORC1 e mTORC2 e assim prejudica o crescimento e proliferação celular de forma muito mais potente que a rapamicina (58).

1.3 mTORC1 E ADIPOSIDADE

mTORC1 é um regulador essencial da adiposidade devido ao seu envolvimento direto no controle do metabolismo de lipídeos e diversos outros processos envolvidos na formação e manutenção do tecido adiposo (59). Diversos estudos encontraram, por exemplo, que a inibição farmacológica de mTORC1 com rapamicina inibe a diferenciação de fibroblastos 3T3-L1 em adipócitos maduros (adipogênese) através da redução da expressão e atividade de PPAR γ e da proteína estimuladora de ligação a CCAAT (C/EBP) α , fatores de transcrição essenciais para o processo de adipogênese (60-63). Subsequentemente, foi também demonstrado que a ativação constitutiva de mTORC1 pela deleção de *Tsc2* aumenta a adipogênese de 3T3-L1 e de fibroblastos embrionários de camundongos (MEF) (64), bem como, a atividade da proteína ligante aos elementos reguladores de esteroides (SREBP)1 via S6K1 (65). As SREBPs são fatores de transcrição que residem no retículo endoplasmático em sua forma inativa e, após ativação por clivagem proteolítica, são translocados para o núcleo, onde ativam a transcrição de genes envolvidos na síntese *de novo* de AG (44).

As primeiras evidências experimentais sugerindo a participação de mTORC1 no controle da adiposidade *in vivo* foram os achados que camundongos deficientes do substrato de mTORC1 S6K1 apresentam menor massa corporal e adiposa e proteção contra o desenvolvimento da obesidade induzida por dieta hiperlipídica (HFD) (66). Este mesmo estudo demonstrou que a atividade de mTORC1 estava aumentada no tecido adiposo de três modelos de obesidade diferentes: induzidos pela ingestão de HFD e geneticamente por mutações no locus agouti (*K/K A^y*) e pela deleção de leptina (*ob/ob*) (66). Neste mesmo sentido, um estudo posterior demonstrou que camundongos deficientes de 4E-BP1 e 4E-BP2, proteínas que são

fosforiladas e inibidas por mTORC1, apresentavam maior adipogênese e acúmulo de TAG e obesidade exacerbada quando alimentados com HFD (67). Da mesma forma, a deleção de *Raptor* no tecido adiposo reduz a adiposidade pelo aumento do gasto energético associado ao aumento da expressão de UCP-1 e termogênese principalmente no depósito epididimal (68). Além disso, a inibição farmacológica de mTORC1 pelo tratamento com rapamicina reduz a massa adiposa, efeito este que foi associado à menor expressão de proteínas envolvidas na captação de AG, como LPL, FATP1 e CD36, e sua esterificação a TAG, como lipina e PEPCCK, além da menor expressão de PPAR γ (69).

Apesar de todos os estudos acima indicando que a inibição completa ou quase completa de mTORC1 reduz, por diversos mecanismos, a adiposidade, um estudo recente encontrou que a inibição moderada de mTORC1 pela super-expressão do seu inibidor endógeno Deptor aumentou, ao invés de reduzir, a adiposidade de camundongos (70). Esta exacerbação da adiposidade induzida pela expressão de Deptor foi associada à redução do *feedback* negativo exercido pela S6K na atividade de IRS1 e da sinalização da insulina (70). Corroborando com estes achados, a redução parcial de mTOR aumentou a adipogênese em células 3T3-L1 *in vitro* (71). Em conjunto, estes dados sugerem a hipótese inédita que, similarmente à inibição completa, a ativação constitutiva de mTORC1 pode estar associada à redução da adiposidade.

1.4 JUSTIFICATIVA DO TRABALHO

Considerando os crescentes índices de obesidade no mundo e sua relação com o desenvolvimento de diversas doenças, torna-se indispensável a compreensão dos mecanismos responsáveis pela formação e manutenção do tecido adiposo com o objetivo de gerar novos agentes terapêuticos capazes de regular o número e a função dos adipócitos em indivíduos adultos.

Evidências apontam para o mTORC1 como importante modulador da adipogênese e metabolismo de adipócitos. Diversos estudos demonstram que a inibição total de mTORC1 está associada à redução da adiposidade enquanto que sua inibição parcial apresenta efeito oposto. Dessa forma, hipotetizamos que as ações de mTORC1 na adiposidade seguem um padrão em U-invertido, onde

atividade muito alta ou extremamente baixa deste complexo reduzem, enquanto atividade ótima de mTORC1 promove o aumento de adiposidade (Figura 6). Para testar esta hipótese, investigamos neste trabalho se a ativação constitutiva de mTORC1 (região direita da curva) está, de fato, relacionado à redução da massa do tecido adiposo.

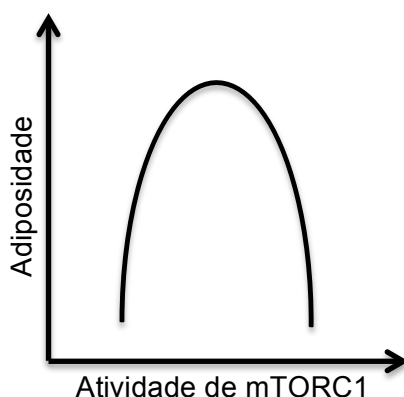


Figura 6 - Hipótese sobre relação entre atividade de mTORC1 e adiposidade.

1.5 HIPÓTESE

A ativação constitutiva de mTORC1 *in vivo* reduz a adiposidade.

2 OBJETIVOS

Nosso objetivo geral foi investigar os efeitos da ativação constitutiva de mTORC1 em adipócitos *in vivo*.

Como objetivos específicos, avaliamos os efeitos da ativação constitutiva de mTORC1 em adipócitos no ganho de peso corporal, adiposidade, consumo de O₂, metabolismo de glicose e lipídeos, função mitocondrial e sinalização da via da mTOR utilizando três dietas diferentes: dieta padrão do tipo *chow* e dietas purificadas com pouco teor de gordura e hiperlipídica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (Protocolo 098/CEUA). Animais com deleção de *Tsc1* especificamente em adipócitos maduros foram produzidos pelo sistema Cre-Lox, através do cruzamento com camundongos que expressam a enzima recombinase-cre sob controle do promotor da adiponectina, uma proteína expressa exclusivamente em adipócitos maduros. A recombinase-cre promove a recombinação e, conseqüentemente, a deleção de regiões específicas do genoma que estejam flanqueadas por sequências LoxP (ATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTAT), neste caso, os éxons 17 e 18 do gene do *Tsc1* (Figura 7). Camundongos *Tsc1*^{Lox/Lox} (*Tsc1*^{tm1Djk}/J, Jackson Laboratories, com *background* misto de C57BL/6J, BALB/cJ e 129/SvJae) foram cruzados com camundongos *adiponectin-cre* (B6;FVB-Tg(Adipoq-cre)1Evd/J, Jackson Laboratories, *background* C57BL/6J) para obter descendentes heterozigotos *Tsc1*^{Lox/WT}*adiponectin-cre* (WT indicando *wild type*, i.e., selvagem) na geração F1. Estes animais foram então cruzados com camundongos *Tsc1*^{Lox/Lox} para gerar descendentes com genótipo *Tsc1*^{Lox/Lox}*adiponectin-cre* (a partir daqui chamados de ATscKO, do inglês *Adipose-specific Tsc KnockOut*) e *Tsc1*^{Lox/Lox} (a partir daqui chamados de ATscWT) (Figura 7). Os animais foram mantidos a 25 ± 2 °C com ciclo claro/escuro de 12 horas/ 12 horas (ciclo claro com início às 06h00) no biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

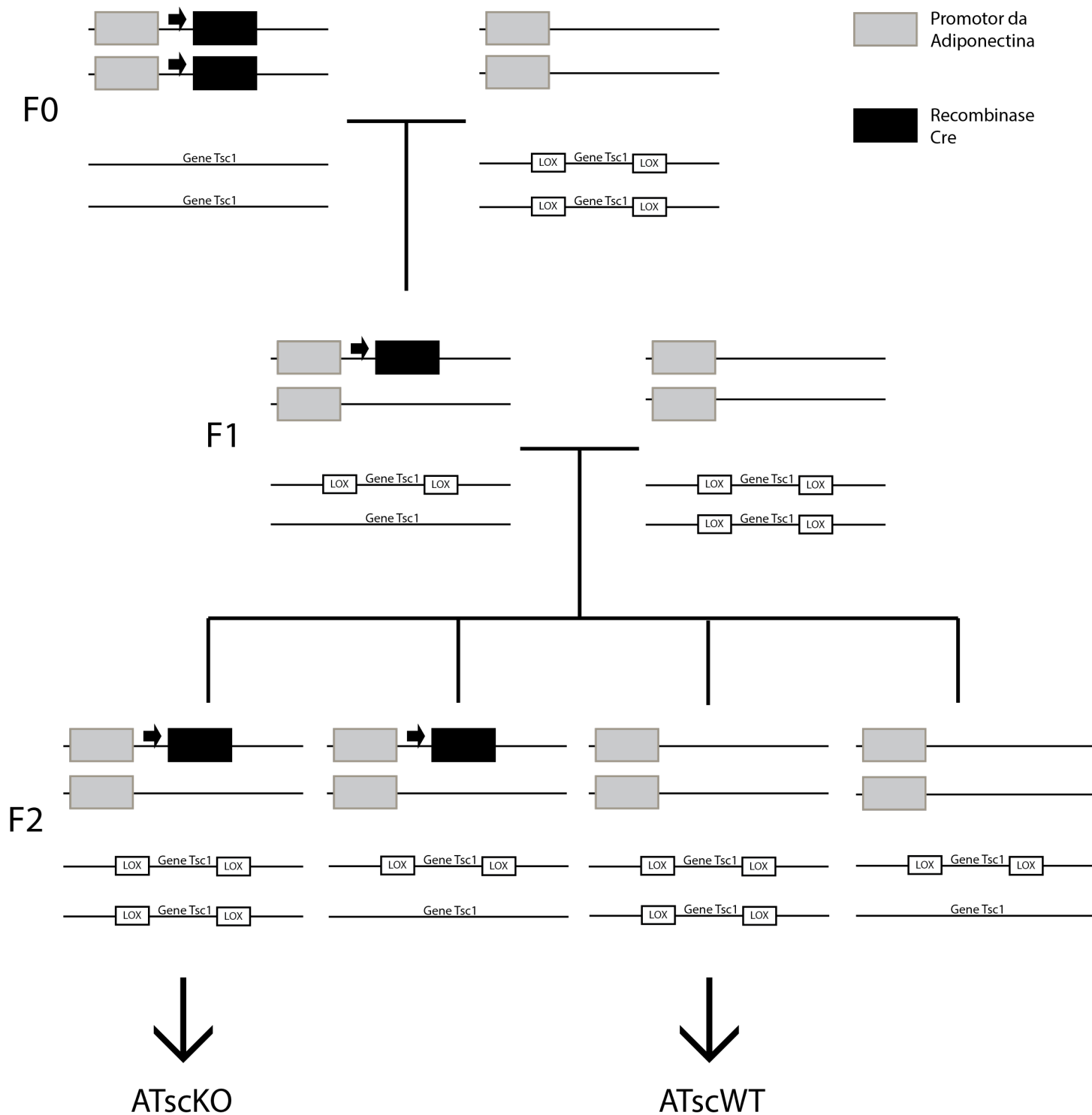


Figura 7 - Esquema dos cruzamentos dos camundongos pelo sistema Cre-Lox para obtenção dos animais utilizados neste projeto: ATscWT e ATscKO.

3.2 GENOTIPAGEM

Para genotipagem, aproximadamente 0,2 cm da cauda de todos os animais foi cortada após anestesia com isoflurano. A extração do DNA caudal foi realizada por digestão com 50 mM NaOH por 12 minutos a 95 °C, seguido de neutralização com 1 M Tris-HCl (pH 6,8) e centrifugação por 15 minutos a 13000 rpm. Foi utilizado o sobrenadante para reação em cadeia da polimerase (PCR) com o kit Platinum Taq DNA Polymerase (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). Os primers utilizados para genotipagem do $Tsc1^{Lox/Lox}$ foram: GTCACGACCGTAGGAGAAGC e GAATCAACCCACAGAGCAT, sendo que a presença de apenas uma banda de tamanho 193 pares de base (bp) caracteriza o genótipo selvagem, a presença de apenas uma banda de tamanho 230 bp caracteriza o genótipo mutante ($Tsc1^{Lox/Lox}$) e a presença de ambas bandas caracteriza o heterozigoto $Tsc1^{Lox/WT}$. Para genotipagem do *adiponectin-cre* foram utilizados os seguintes primers: CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT, GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC, ACGCGTTAATGGCTAATCGC, GGCGCTAAGGATGACTCTGG sendo que a banda de tamanho 324 bp é referente ao controle interno da reação e a banda de tamanho 225 bp ao transgene *adiponectin-cre*, quando presente. As amostras foram corridas em gel de agarose 2% para a separação dos produtos de PCR segundo o padrão da Figura 8.

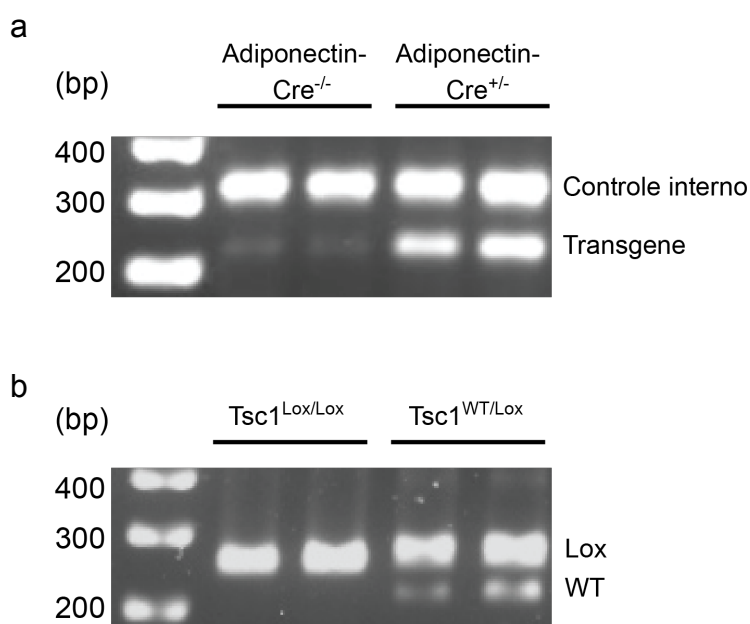


Figura 8 - Padrão de bandas dos géis de genotipagem para (a) *adiponectin-cre* e (b) $Tsc1^{Lox/Lox}$.

3.3 DESENHO EXPERIMENTAL

Camundongos ATscWT e ATscKO irmãos machos foram alimentados com dieta *chow* padrão (NUVILAB CR-1®-Sogorb Inc., São Paulo, Brasil; 63% carboidrato, 25% proteína, 12% gordura, em Kcal). Quando especificado, animais de oito semanas de idade também foram alimentados com dietas purificadas com baixo teor de gordura (LFD, do inglês *low-fat diet*; 70% carboidrato, 20% proteína, 10% gordura, em Kcal) e hiperlipídica (HFD, do inglês *high-fat diet*; 20% carboidrato, 20% proteína, 60% gordura, em Kcal) por 8 semanas. O conteúdo das dietas purificadas podem ser encontradas na Tabela 1 e a composição de ácidos graxos na Tabela 2. Quando especificado, animais ATscKO foram tratados por duas semanas com injeção intraperitoneal de inibidor de mTORC1 (rapamicina, 2 mg/ kg peso/ dia; LC Laboratories, Woburn, MA, EUA), inibidor do receptor relacionado a estrógeno (ERR) α (XCT 790, 5 mg/ kg peso/ dia; Tocris Bioscience, Minneapolis, MN, EUA) ou inibidor do receptor de estrógeno (ER) α (MPP, 1 mg/ kg peso/ dia; Tocris Bioscience) (72) e seus respectivos veículos para controle: para rapamicina, 0,2% metilcelulose, 0,1% Me₂SO; para XCT 790 e MPP, tampão fosfato-salino (PBS) 10% dimetilsulfóxido (DMSO). As doses das drogas foram escolhidas de acordo com a literatura (73-75).

Tabela 1 - Ingredientes das dietas com pouco teor de gordura (LFD) e hiperlipídica (HFD).

Ingrediente	LFD	HFD
	g/kg	
Caseína	189,6	258,4
L-cistina	2,8	3,9
Amido de milho	413,1	-
Maltodextrina	161,5	161,5
Sacarose	88,9	88,9
Celulose	54,6	74,1
Óleo de soja	23,7	32,3
Banha de porco	18,9	316,6
Mix mineral AIN93M	35,0	47,9
Mix vitamínico AIN93M	10,0	13,7
Bitartarato de colina	1,9	2,6

Tabela 2 - Composição de ácidos graxos (mg/g) das dietas com pouco teor de gordura (LFD) e hiperlipídica (HFD) (76).

Ácidos graxos	LFD	HFD
C14:0	nd	4 ± 0,2
C14:1	nd	nd
C15:0	nd	nd
C16:0	5 ± 0,1	73 ± 6
C16:1	nd	6 ± 0,4
C17:0	5 ± 0,5	6 ± 0,1
C17:1	nd	nd
C18:0	2 ± 0,05	37 ± 2,9
C18:1	10 ± 0,23	128 ± 9,8
C18:1n-7	1 ± 0,01	7 ± 0,5
C18:2n-6	11 ± 0,3	65 ± 5
C18:3n-3	1 ± 0,04	4 ± 0,3
C20:0	nd	1 ± 0,5
C20:1n-9	nd	3 ± 0,2
C20:2n-6	nd	2 ± 0,2
C20:3n-6	nd	nd
C20:4n-6	nd	nd
C20:5n-3	nd	nd
C22:0	nd	nd
C22:1n-9	nd	nd
C22:6n-3	nd	nd
C24:1	nd	nd
Somatório Saturados	12,8 ± 0,2 (37%)	120,6 ± 9 (36%)
Somatório Mono-insaturados	10,7 ± 0,2 (30%)	143,4 ± 11 (43%)
Somatório Poli-insaturados n-6	10,8 ± 0,3 (30%)	66,7 ± 5,2 (20%)
Somatório Poli-insaturados n-3	1 ± 0,1 (3%)	3,8 ± 0,3 (1%)
SOMATÓRIO	35 ± 1	334 ± 25

O peso corporal e o consumo alimentar foram medidos semanalmente. Os camundongos foram submetidos à eutanásia após jejum *overnight* para coleta e pesagem, quando apropriado, de sangue, fígado, músculo gastrocnêmio, depósitos

de tecido adiposo branco subcutâneo (inguinal, iWAT, do inglês *inguinal white adipose tissue*) e viscerais (retroperitoneal, rWAT, do inglês *retroperitoneal white adipose tissue*; epididimal nos machos, eWAT, do inglês *epididymal white adipose tissue*; perigonadal nas fêmeas, pWAT, do inglês *perigonadal white adipose tissue*) e tecido adiposo marrom interescapular (iBAT, do inglês *interscapular brown adipose tissue*). No caso dos tecidos não serem imediatamente usados para algum experimento, foram armazenados a -80 °C até sua utilização. O tamanho dos animais de 6 semanas de idade foi determinado por medida naso-anal.

3.4 WESTERN BLOT

Os tecidos adiposos, fígado e músculo gastrocnêmio foram homogeneizados em tampão contendo: 50 mM HEPES, 40 mM NaCl, 50 mM NaF, 2 mM EDTA, 10 mM pirofosfato de sódio, 10 mM glicerofosfato de sódio, 2 mM ortovanadato de sódio, 1% Triton-X 100 e inibidor de protease livre de EDTA (Roche Life Science, Pleasanton, CA, EUA). As amostras foram centrifugadas a 11000 g por 10 minutos a 4 °C e a concentração de proteínas quantificada pelo método *Pierce BCA Protein Assay Kit* (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Foram utilizadas 20 - 40 µg de proteína para separação em gel. Após transferência em membrana PVDF, esta foi bloqueada por 1 hora em tampão 5% leite e incubada durante a noite com o anticorpo primário de interesse (diluição 1:1000) em tampão 5% leite. Os seguintes anticorpos foram utilizados: anti- TSC1 (#6935s), AKT (#9685s), pAKT S473 (#9271s), pAKT T308 (#4056s), S6 (#2217L), pS6 S240/244 (#5364s), 4E-BP1 (#9452), UCP-1 (#14670), ERRα (#13826), PGC-1α (#2178), LC3A/B (#12741) (Cell Signaling, Beverly, MA, EUA); ERK (sc-292838), pERα S167 (sc-101676) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA); ERα (#04-1564) (Millipore, Billerica, MA, EUA). Após lavagem, a membrana foi incubada com anticorpo secundário conjugado à peroxidase (diluição 1:5000) em tampão 5% leite por 1 hora. A membrana foi novamente lavada e então revelada.

A densitometria das bandas foi obtida pelo software Image J. Para normalização dos blots, AKT total foi utilizada para os tecidos adiposos dos machos e ERK para os tecidos adiposos das fêmeas, fígado e músculo dos machos, já que não apresentaram diferenças significativas entre as amostras de ATscWT e ATscKO. A normalização foi realizada dividindo o valor bruto da densitometria da

banda de interesse pelo valor bruto da densitometria de AKT ou ERK da mesma amostra. Para estabelecer os valores dos controles para 1, foi calculada a média dos valores da densitometria normalizados de todos os animais do grupo ATscWT e esta média foi usada como fator de correção para todas as amostras. Após dividir os valores normalizados pelo fator de correção, foram calculadas a média e o erro padrão de cada grupo e os valores foram expressos como unidades arbitrárias (U.A.).

3.5 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA

O DNA foi extraído dos rWAT, iWAT e iBAT utilizando o *Illustra™ tissue and cells genomicPrep Mini Spin Kit* (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) e quantificado por PCR quantitativo em tempo real (qPCR) usando primers para Rpl13 genômico (*forward*: GAGATTGGCCGGACTCCCTA e *reverse*: GATGGACCACGATGGGACC) e uma curva padrão de concentração de DNA conhecida.

3.6 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE TAG

Os rWAT, iWAT e iBAT foram homogeneizados em 1,5 mL de clorofórmio-metanol 2:1 (v/v), seguido da adição de 250 µL de água (77). Após separação das fases por centrifugação a 3000 rpm por 5 minutos, os lipídeos foram obtidos da fase inferior. O conteúdo de TAG foi quantificado pelo kit enzimático de triglicérides (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brazil).

3.7 HISTOLOGIA

Os rWAT, iWAT e iBAT foram fixados em 4% paraformaldeído, com posterior inclusão em parafina. Os blocos foram cortados e montados em lâminas histológicas. Após a retirada da parafina, os cortes foram corados com hematoxilina/eosina. Imagens digitais foram obtidas em microscópio e foi estimada a área de aproximadamente 350 adipócitos/amostra utilizando o software Image J.

3.8 CALORIMETRIA INDIRETA

Camundongos ATscWT e ATscKO foram colocados em gaiolas metabólicas por dois dias consecutivos para adaptação. Em seguida, as medidas de consumo de oxigênio (VO_2), produção de gás carbônico (CO_2) e atividade motora espontânea foram realizadas durante 24 horas pelo *Comprehensive Laboratory Monitoring System* (Columbus Instruments, Columbus, OH, EUA), um calorímetro de circuito aberto integrado, equipado com um sistema de monitoramento de atividade por feixes ópticos. A contagem da atividade motora foi calculada somando o número de feixes atingidos nos eixos x, y e z. O quociente respiratório foi calculado como a razão VO_2/CO_2 .

3.9 TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE

Após jejum *overnight*, foi injetada glicose intraperitoneal (1 g/ kg peso corporal) em camundongos ATscWT e ATscKO. A glicemia foi determinada no sangue da veia caudal antes e após 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos da injeção da glicose usando o glicosímetro *OneTouch Johnson & Johnson*.

3.10 METABOLISMO DE GLICOSE E ÁCIDOS GRAXOS

As medidas de captação de glicose, conversão de glicose em TAG, ácidos graxos provenientes de TAG (TAG-AG) e CO_2 (oxidação) e conversão de ácido palmítico em TAG e CO_2 foram estimadas em fragmentos de aproximadamente 30 mg de rWAT e iWAT. Estes foram cortados em pequenos fragmentos (~ 5 mg) e incubados em tampão *Krebs-Ringer-Bicarbonate* (pH 7,4) com 2% albumina sérica bovina (BSA) livre de AG em tubos de ensaio de vidro hermeticamente fechados por 2 horas a 37 °C sob agitação.

Para o ensaio de captação de glicose, foram adicionados ao tampão 2 mM glicose, 0.2 μ Ci/mL [U- 14 C]deoxiglicose (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) e 500 pmol/L insulina. Após incubação, os tecidos foram lavados com PBS, digeridos com 1 M NaOH a 60 °C e destinados à contagem de radioatividade.

Para o ensaio de conversão de glicose a TAG, TAG-AG e CO_2 , foram adicionados ao tampão 5,5 mM glicose, 0,2 μ Ci/mL [U- 14 C]glicose (PerkinElmer) e

500 pM insulina. Para o ensaio de conversão de ácido palmítico a TAG e CO₂, foram adicionados ao tampão 100 μM ácido palmítico e 0,2 μCi/mL [U-¹⁴C]ácido palmítico (PerkinElmer). Para ambos ensaios, a reação foi interrompida com H₂SO₄ e o CO₂ foi capturado em pedaço de papel filtro umedecido com etanol:feniletilamina (1:1), o qual foi posteriormente destinado para contagem de radioatividade (78). A extração lipídica total dos tecidos foi realizada como descrito anteriormente e a fase lipídica foi destinada para contagem de radioatividade referente ao TAG. Para quantificação da conversão de glicose em TAG-AG, alíquotas de 0,5 mL da fase lipídica inferior foram transferidas para novos tubos de ensaio, onde foram adicionados 1 mL de etanol (95%) e 250 μL de KOH (40%). Os tubos foram frouxamente tampados e incubados a 60 °C por 1 hora. Em seguida o material foi resfriado à temperatura ambiente por aproximadamente 10 minutos e logo após adicionou-se 2 mL de HCl (3N) e 2 mL de n-heptano. Esta mistura foi homogeneizada em vórtex e deixada em repouso por 10 minutos. Uma amostra de 1 mL da fase superior de cada tubo de ensaio foi retirada para contagem de radioatividade (79). A todos os tubos destinados à contagem de radioatividade foram adicionados 2 mL de líquido de cintilação.

Os valores foram expressos por ng de DNA para correção do número de células. Para expressão por ng de DNA, os valores por mg de tecido foram multiplicados pela média de ng de DNA/ mg de tecido determinada para cada grupo ATscWT e ATscKO.

3.11 LIPÓLISE

Fragmentos de rWAT e iWAT (quatro pedaços de ~ 5 mg) foram pré-incubados por 10 minutos em tubos de ensaio de vidro com tampão *Krebs-Ringer-Bicarbonate* (pH 7,4) contendo 5,5 mM glicose e 2% BSA livre de AG. Posteriormente, foram transferidos para um novo tubo contendo o mesmo tampão suplementado com 2 μM isoproterenol e incubados a 37 °C por 1 hora. A solução do ensaio foi então retirada e quantificada para glicerol livre (*Free Glycerol Kit*, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Os valores foram expressos por ng de DNA, calculados como descrito anteriormente.

3.12 ANÁLISE DO SORO

O sangue coletado após eutanásia dos animais foi centrifugado a 2000 rpm por 15 minutos a 37 °C e o soro foi retirado e armazenado a -80 °C. Posteriormente, foram avaliados seguindo as instruções do fabricante: ácidos graxos livres (Wako Diagnostic, Richmond, VA, EUA), glicerol (*Free glycerol kit*, Sigma-Aldrich), TAG (Labtest) e adiponectina (Billerica, Millipore, MA, USA).

3.13 EXTRAÇÃO DE RNA E TRANSCRIÇÃO REVERSA

Para extração de RNA, aproximadamente 50 mg de tecido adiposo foi homogeneizado com 1 mL *Trizol Reagent* (Life Technologies, USA), seguido da adição de 0,2 mL clorofórmio, agitação por 15 segundos e centrifugação a 12000 g por 15 minutos a 4 °C. Após separação da fase superior aquosa, foi adicionado 0,5 mL de 100% isopropanol, seguido de incubação à temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugação a 12000 g por 15 minutos a 4 °C. O *pellet* de RNA foi então lavado com 75% etanol e centrifugado a 7500 g por 5 minutos. O *pellet* de RNA foi ressuspenso em água isenta de RNase e quantificado em espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, USA) a 260 nm. Para a reação de transcrição reversa, foram incubados a 65 °C por 5 minutos a mistura de 1 µg de RNA total diluído em água isenta de RNase totalizando 12 µL, 1 µL 10 mM dNTP e 1 µL 50 µM oligo-dT. Em seguida, foram adicionados 4 µL 5X *First Strand Buffer*, 1 µL 0,1 M DTT e 1 µL *Superscript III reverse transcriptase* (200 U/µL) (Life Technologies, USA). Seguiu-se com a incubação a 50 °C por 1 hora, 70 °C por 15 minutos e 4 °C por 10 minutos. O cDNA resultante foi então diluído 25 vezes em água isenta de RNase e estocado a -20 °C.

3.14 PCR EM TEMPO REAL

O PCR em tempo real foi utilizado para quantificação dos níveis de RNAm de proteínas de interesse e de DNA. Para cada reação de PCR, foram utilizados 3 µL cDNA ou DNA, 2,74 µL água isenta de RNase, 3,93 µL SYBR Green (Sigma-Aldrich) e 0,33 µL mistura de primer *forward* e *reverse* a 5 µM. As amostras foram então incubadas em PCR RotorGene (Qiagen) por 40 ciclos, seguido de *melting*. A análise da expressão gênica foi realizada por quantificação relativa pelo método de CT

comparativo ($\Delta\Delta C_t$). Os dados foram apresentados como a razão entre o gene alvo e a média de três genes de referência (B2m, Hprt1, Rb1), cujo valor não foi alterado pela deleção de *Tsc1* ou dieta. Os primers utilizados para esta análise estão na Tabela 3.

Tabela 3 - Primers utilizados no PCR em tempo real.

Gene	NCBI GenBank	Forward (5' - 3')	Reverse (3'-5')
<i>Agpat2</i>	NM_026212.2	CCTGGACATGATGGGTCTCA	GACACCCCCAAGGTACATGA
<i>B2m</i>	NM_009735.3	ACCGTCTACTGGGATCGAGA	TGCTATTTCTTTCTGCGTGCAT
<i>Cebpb</i>	NM_001287738.1	TTTCGGGACTTGATGCAAT	CCGCAGGAACATCTTTAAGT
<i>Cd36</i>	NM_001159555.1	TGAATGGTTGAGACCCCGTG	CGTGGCCCGGTTCTACTAAT
<i>Cyc1</i>	NM_025567.2	CAGCTACCCATGGTCTCATCGT	CACCTGCTTGTATACCTGGAAACC
<i>Dgat1</i>	NM_010046.2	GCTCCAGCCCATACCCGGGA	TGTCAGGGCACCCACTGCCA
<i>Dgat2</i>	NM_026384.3	GAAGCTGCCCGCAGCGAAAA	TCTTGGGCGTGTTCAGTCAA
<i>Esr1</i>	NM_007956.5	CTATCCACAGCCACCCAAGA	AACCACCATTCCAAAAA
<i>Esrra</i>	NM_007953.2	CAAGAGCATCCCAGGCTT	GCACTTCCATCCACACTC
<i>Fabp4</i>	NM_024406.2	TGAAATCACCGCAGACGACA	ACACATTCCACCACCAGCTT
<i>Fasn</i>	NM_007988.3	AGATGGAAGGCTGGGCTCTA	CATTGTGTGTGCCTGCTTGG
<i>Fatp1</i>	NM_011977.3	GGCCACCATTCTAGAGCAT	CGTGAGGATACGGCTGTTGA
<i>Gpat1</i>	NM_008149.3	GCCACAACATCAAGGCGCCG	TGGGCTTTCCCAACTGT
<i>Hprt1</i>	J00423.1	AGCAGTACAGCCCCAAAATG	ATCCAACAAAGTCTGGCCTGT
<i>Lipin</i>	NM_001130412.1	AGCCCCAGCCTGGTAGAT	AGCTCTTCGGCCACGGGTGA
<i>Lpl</i>	NM_008509.2	TGGAGGGTCAGGATGGCTGA	GGCCTATCGGTGCTTAGATC
<i>Ndfub5</i>	NM_025316.2	GCATCCGATATCAAGATGGATCG	CTTTAACCGTAACTCAGCCTTTTCA
<i>Pgc1a</i>	NM_008904.2	ACTCTGCATTTGGTTTTGCTGA	CCCAGCAACACAGCCTCTAA
<i>Ppara</i>	NM_001113418.1	CAGCCTCAGCCAAGTTGAAG	CACAGAGCGCTAAGCTGTGA
<i>Pparg</i>	NM_001127330.1	CGGGCTGAGAAGTCACGTT	TGTGTCAACCATGGTAATTTCACT
<i>Prdm16</i>	NM_027504.3	CAGCACGGTGAAGCCATTC	GCGTGCATCCGCTTGTG
<i>Rb1</i>	NM_009029.2	TCACGCTGCCAGGAGACCT	CGGCTCCCTCGATGTCAAAGCG
<i>Sdhb</i>	NM_023374.3	CCCAGGAGGGCAAGCAA	GTACAGCCCGTCCAGCTTCT
<i>Ucp1</i>	NM_009463.3	AGGCTTCCAGTACCATTAGGT	CTGAGTGAGGCAAAGCTGATTT
<i>Yy1</i>	NM_009537.3	CCCTCATAAAGGCTGCACAAA	TCTCAACGAACGCTTTGCCA

3.15 ATIVIDADE DA CITRATO SINTASE

A atividade da citrato sintase foi utilizada como marcador de massa mitocondrial nos rWAT e iWAT (80, 81). Aproximadamente 50 mg dos tecidos foram homogeneizados em 50 mM tampão fosfato e centrifugados a 13000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e incubado com 0,1 M Tris-HCl, 500 μ M oxaloacetato, 200 μ M 5,5'-ditiobis(2-ácido nitrobenzoico) (DTNB), 100 μ M acetil-CoA e 0,1% Triton-X por 5 minutos a 30 °C. A redução do DTNB foi acompanhada a 412 nm (82). Os valores foram expressos por ng de DNA, calculados como descrito anteriormente.

3.16 ATIVIDADE DA CADEIA DE TRANSPORTE DE ELÉTRONS

A atividade dos complexos II e III da cadeia de transporte de elétrons foi avaliada nas mesmas amostras de sobrenadante do ensaio da atividade da citrato sintase. O sobrenadante foi incubado então com 10 mM succinato e 300 μ M KCN por 5 minutos a 37 °C, seguido da adição de 50 μ M citocromo C. A redução do citocromo C foi acompanhada a 550 nm (83). Os valores foram expressos por ng de DNA, calculados como descrito anteriormente.

3.17 CONSUMO DE O₂ TECIDUAL

A análise de consumo de O₂ basal foi realizada em fragmentos de rWAT, iWAT e iBAT (seis fragmentos de ~ 5 mg), os quais foram incubados em DMEM-4% BSA a 37 °C sob agitação. O consumo de O₂ foi medido no Oroboros Oxygraph-2K por aproximadamente 15 minutos (84). Os valores foram expressos por ng de DNA e tecido inteiro, calculados como descrito anteriormente.

3.18 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Aproximadamente 1 mm³ de rWAT e iWAT foram fixados com 2% glutaraldeído por 2 horas, seguido de incubação com 1% tetróxido de ósmio por 2 horas e 0,5% acetato de uranilo *overnight*. Após desidratação e inclusão em resina, cortes ultrafinos (90 nm) foram corados com acetato de uranilo e citrato de prata e analisados em microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1010.

3.19 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores estão apresentados como média \pm erro padrão. Para a comparação entre os genótipos, foi utilizado Teste t de *Student* não pareado. Quando mais de dois grupos foram comparados (no caso do tratamento dos animais com drogas), foi utilizada análise de variância (ANOVA) com pós-teste *Newman-Keuls*. Estabelecemos um nível de significância de 5%, ou seja, os resultados só foram considerados estatisticamente diferentes quando $P < 0,05$. Os dados foram analisados no *Statistical Graph Prism 5.0*[®] (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, EUA). Na legenda das figuras, n significa o número de animais por genótipo. A maior parte dos experimentos foi replicada no mínimo duas vezes.

4 RESULTADOS

Inicialmente, foi confirmada a redução de TSC1 nos depósitos de tecido adiposo branco rWAT e iWAT, e tecido adiposo marrom iBAT (Figura 9a-c). Como esperado, a deleção de *Tsc1* aumentou a atividade de mTORC1, conforme demonstrado pelo maior conteúdo de S6 fosforilado (pS6) e p4E-BP1, e inibiu mTORC2, como evidenciado pelo menor conteúdo de seu produto pS473AKT em todos os depósitos de tecido adiposo investigados (Figura 9a-c). Além disso, a deleção de *Tsc1* aumentou o conteúdo total de S6 no rWAT e iWAT, mas não no iBAT (Figura 9a-c). Assim, a deleção de *Tsc1* promoveu ativação constitutiva de mTORC1 e redução da atividade de mTORC2 em adipócitos.

Animais ATscKO tenderam a ter menor tamanho naso-anal (ATscWT $9,7 \pm 0,09$, n=4 verso ATscKO $9,3 \pm 0,15$ cm, n=7; P = 0.1) e, no geral, apresentaram menor peso corporal e rWAT em comparação aos ATscWT (Figura 10a, b). Por outro lado, a deleção de *Tsc1* não alterou o ganho de peso dos animais (ATscWT $3,6 \pm 0,69$, n=7 verso ATscKO $3,4 \pm 0,83$, n = 7; P = 0,85). Não houve alterações significativas nas massas dos tecidos adiposos iWAT e eWAT, fígado e músculo gastrocnêmio (Figura 10b, c). Já o peso do iBAT foi maior nos ATscKO (Figura 10b). Associado à redução na massa do rWAT, a deleção de *Tsc1* diminuiu o conteúdo total de TAG (Figura 10d) e DNA (Figura 10e), sendo este um indicador de redução no número de células teciduais. A deleção de *Tsc1* também reduziu o diâmetro dos adipócitos do rWAT, como demonstrado pelo aumento no conteúdo de DNA por mg de tecido (Figura 10f), menor conteúdo de TAG por ng de DNA (Figura 10g) e menor área dos adipócitos (Figura 10h). Nenhuma alteração nessas variáveis foi encontrada nos iWAT e iBAT (Figura 10d-j). Por outro lado, a deleção de *Tsc1* aumentou o conteúdo de RNA (Figura 10k) e proteína (Figura 10l) nas células de ambos rWAT e iWAT. Importante notar, entretanto, que a redução do peso corporal e de rWAT encontrada nos ATscKO não foi associada a alterações no gasto energético (consumo de O₂), expresso tanto por animal (Figura 10m) quanto por peso corporal (Figura 10n), bem como consumo alimentar (Figura 10o) e atividade motora espontânea (Figura 10p). Curiosamente, os ATscKO apresentaram menor quociente respiratório no período noturno (Figura 10q), indicando uso preferencial por AG como fonte energética. Em resumo, a deleção de *Tsc1* em adipócitos de machos reduz o peso corporal e de rWAT e aumenta a de iBAT.

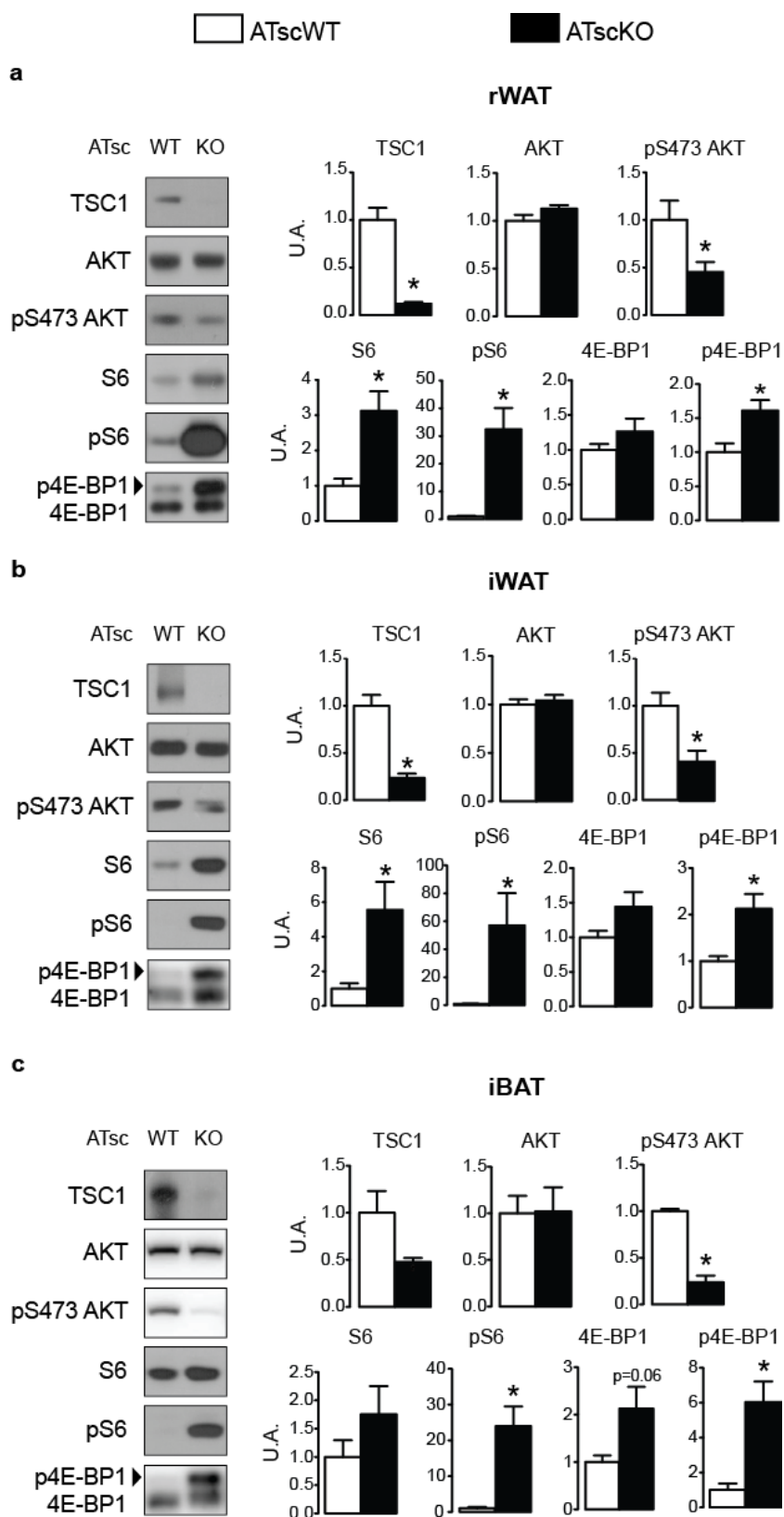


Figura 9 - A deleção de *Tsc1* induz ativação de mTORC1 e inibição de mTORC2. Sinalização de mTOR em (a) rWAT (n=7-9), (b) iWAT (n=7-9) e (c) iBAT (n=3-4) em camundongos machos ATscWT e ATscKO alimentados com dieta *chow*. * P<0,05 comparado ao ATscWT.

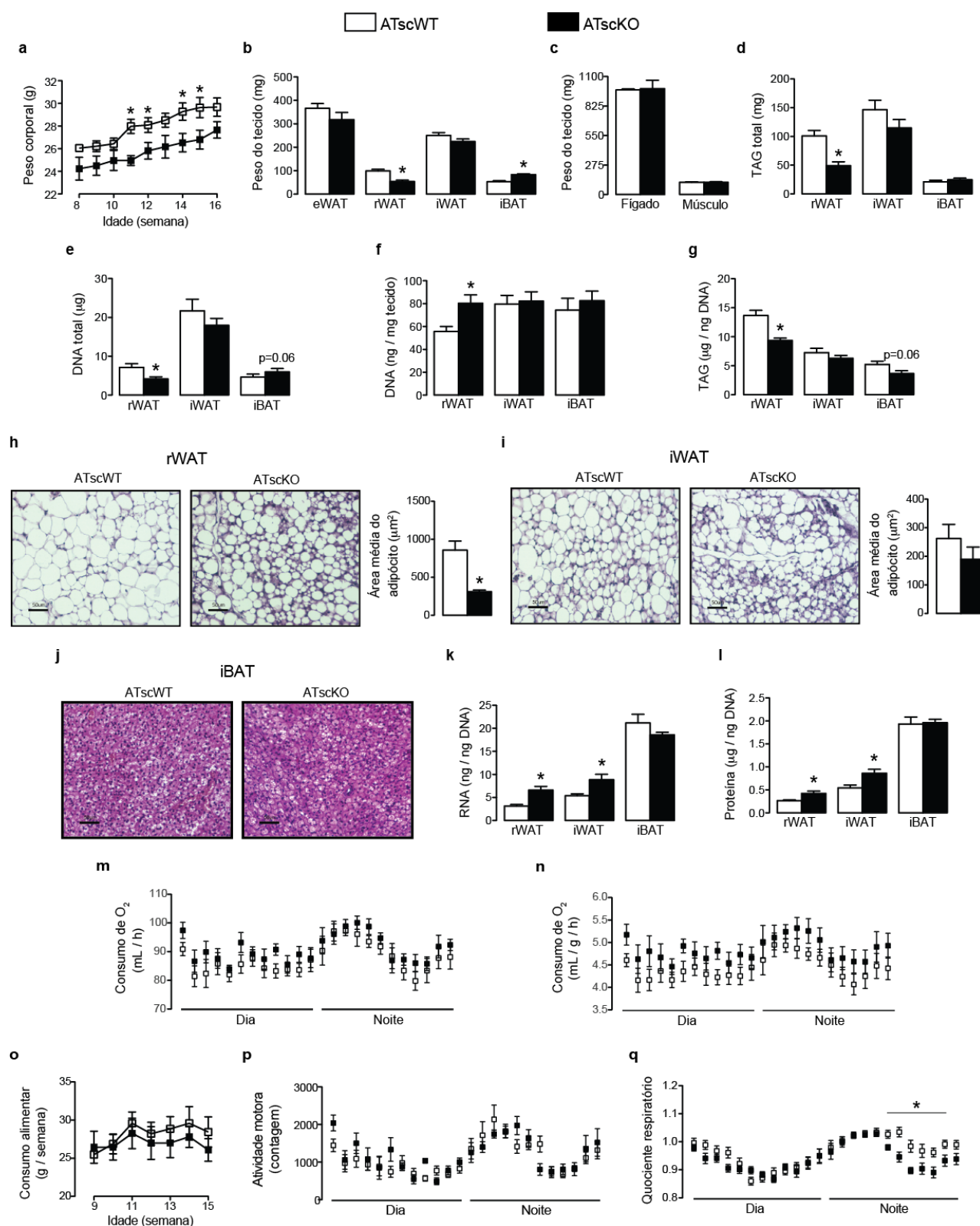


Figura 10 - **A deleção de *Tsc1* reduz o rWAT em machos.** (a) Peso corporal (n=7); peso dos (b) tecidos adiposos (n=7) e (c) não-adiposos (n=7) com 16 semanas de idade; conteúdo total de (d) TAG (n=4-6) e (e) DNA (n=5-9) dos tecidos adiposos; (f) conteúdo de DNA por mg de tecido (n=5-9); (g) conteúdo de TAG por ng de DNA; imagens representativas e médias da área dos adipócitos de (h) rWAT, (i) iWAT e (j) iBAT (n=3-4) corados com hematoxilina/eosina, barra da escala = 50 µM; conteúdo de (k) RNA (n=6-7) e (l) proteína (n=8-13) por ng DNA; consumo de O₂ (m) por animal e (n) por peso de animal (n=8); (o) consumo alimentar (n=4); (p) atividade motora espontânea (n=8); (q) quociente respiratório (n=8) de camundongos machos ATscWT e ATscKO alimentados com dieta *chow*. * P<0,05 comparado ao ATscWT.

Já em camundongos fêmeas, a deleção de *Tsc1* não afetou o peso corporal (Figura 11a), embora tenha reduzido os pesos dos pWAT, rWAT e iWAT, aumentado do iBAT (Figura 11b) e não alterado os pesos de fígado e músculo gastrocnêmio (Figura 11c). Além disso, a deleção de *Tsc1* em fêmeas não alterou o consumo de O_2 por animal (Figura 11d) ou por peso de animal (Figura 11e), consumo alimentar (Figura 11f) e atividade motora (Figura 11g). Semelhante aos machos, o quociente respiratório foi reduzido no período noturno (Figura 11h). Dessa forma, a deleção de *Tsc1* em adipócitos de fêmeas reduz ambos tecidos adiposos brancos viscerais (pWAT, rWAT) e subcutâneo (iWAT) e aumenta o iBAT.

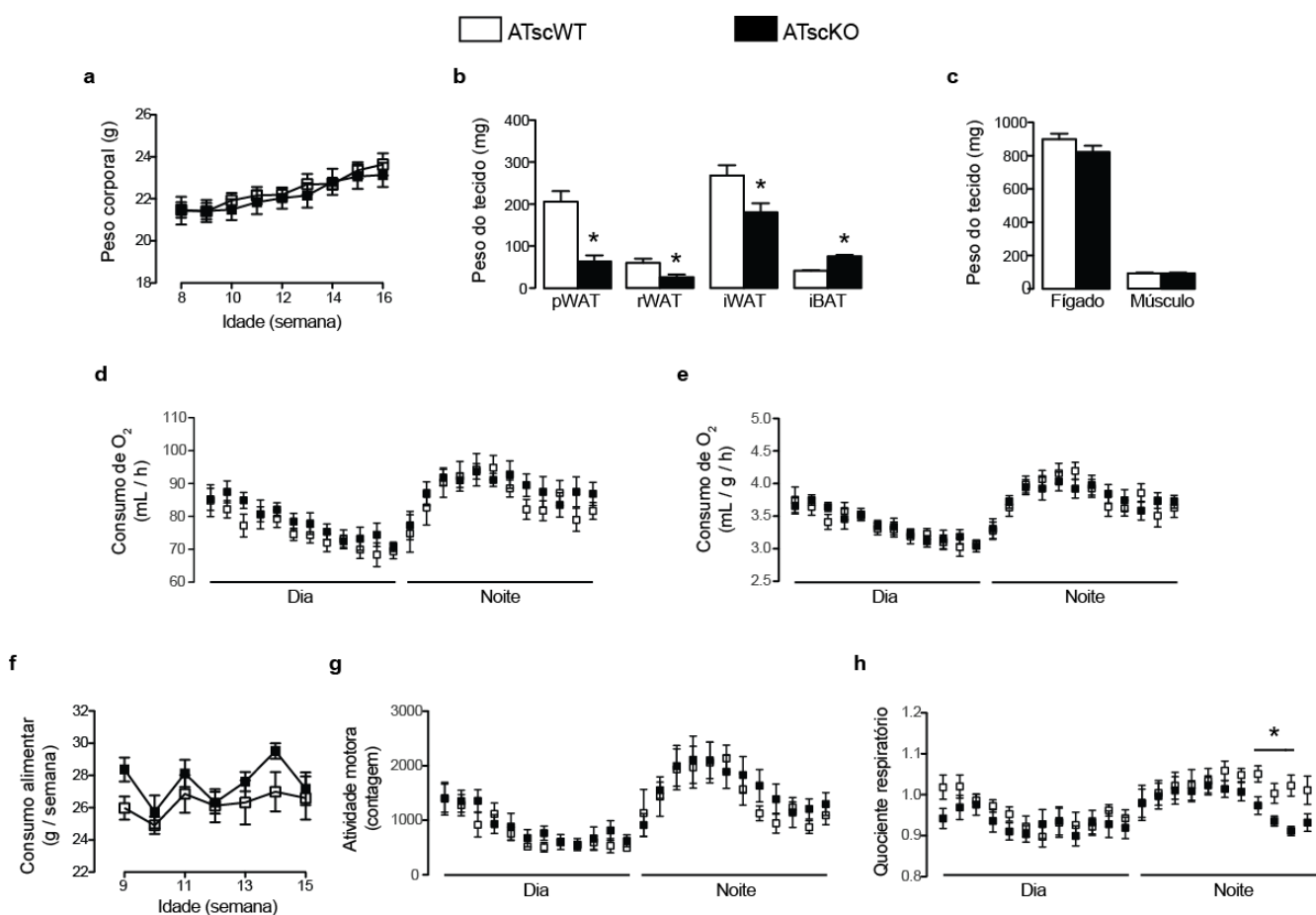


Figura 11 - **A deleção de *Tsc1* reduz pWAT, rWAT e iWAT em fêmeas.** (a) Peso corporal (n=7); peso dos (b) tecidos adiposos (n=7) e (c) não-adiposos (n=7) com 16 semanas de idade; consumo de O_2 (d) por animal e (e) por peso de animal (n=6); (f) consumo alimentar (n=4); (g) atividade motora espontânea (n=6); (h) quociente respiratório (n=6) de camundongos fêmeas ATscWT e ATscKO alimentadas com dieta *chow*. * P<0,05 comparado ao ATscWT.

A maior parte dos resultados apresentados subsequentemente, com algumas exceções devidamente indicadas, foi obtida em experimentos com camundongos machos. Para determinar o mecanismo pelo qual a deleção de *Tsc1* afeta a adiposidade, foram investigados os metabolismos de glicose e lipídeos nos rWAT e iWAT. Nenhuma diferença foi observada na tolerância à glicose (Figura 12a). Para avaliar o metabolismo tecidual, os dados foram apresentados corrigidos por DNA, o que possibilita a comparação entre os animais ATscWT e ATscKO a nível celular, corrigindo uma possível influência da alteração no número de adipócitos por mg de tecido induzida pela deleção de *Tsc1*. Não houve alteração na captação de glicose (Figura 12b) e sua conversão à TAG (Figura 12c), TAG-AG (Figura 12d), CO₂ (Figura 12e) e lactato (Figura 12f). Por outro lado, a deleção de *Tsc1* aumentou a incorporação de ácido palmítico em TAG apenas no iWAT (Figura 12g) e sua oxidação em ambos rWAT e iWAT (Figura 12h). Já a lipólise foi estimulada pela deleção de *Tsc1* apenas no rWAT (Figura 12i). Os animais ATscKO também apresentaram aumento nos níveis séricos de glicerol (Figura 12j), mas não de AG livre (Figura 12k) e TAG (Figura 12l).

Para melhor compreender as alterações no metabolismo de glicose e lipídeos, analisamos a expressão de enzimas importantes para esses processos. A deleção de *Tsc1* em adipócitos aumentou significativamente os níveis de RNAm de *Lpl* apenas no iWAT, proteína envolvida na hidrólise de TAG circulante e liberação de AG para os adipócitos. Para facilitar o transporte de AG através da membrana plasmática, os adipócitos contam com os transportadores *Fatp1* e *Cd36*. Ambos tiveram sua expressão aumentada pela deleção de *Tsc1* no rWAT e iWAT. Uma vez dentro da célula, os AGs podem ser esterificados em TAG através de várias reações. Ambos rWAT e iWAT dos animais ATscKO apresentaram aumento nos níveis de RNAm de enzimas deste processo, como *Gpat1*, *Agpat2* e *Lipina*, porém nenhuma alteração na expressão de *Dgat1*, *Dgat2* e *Pepck*, enzimas envolvidas na última etapa da esterificação e gliceroneogênese, respectivamente. Já em relação à lipogênese *de novo*, a deleção de *Tsc1* não alterou em nenhum dos tecidos a expressão de *Fasn*, a qual codifica a enzima FAS que catalisa a síntese de AG, embora haja uma tendência a aumento no rWAT. Os ATscKO também apresentaram tendência a aumento e aumento significativo nos rWAT e iWAT, respectivamente, nos níveis de RNAm da *Fabp4*, proteína importante para o

transporte intracelular de AG. A expressão de diversas enzimas envolvidas na síntese lipídica e função dos adipócitos é controlada pelo fator de transcrição PPAR γ . Entretanto, a deleção de *Tsc1* não alterou a expressão de *Pparg* em nenhum dos tecidos (Figura 13a, b).

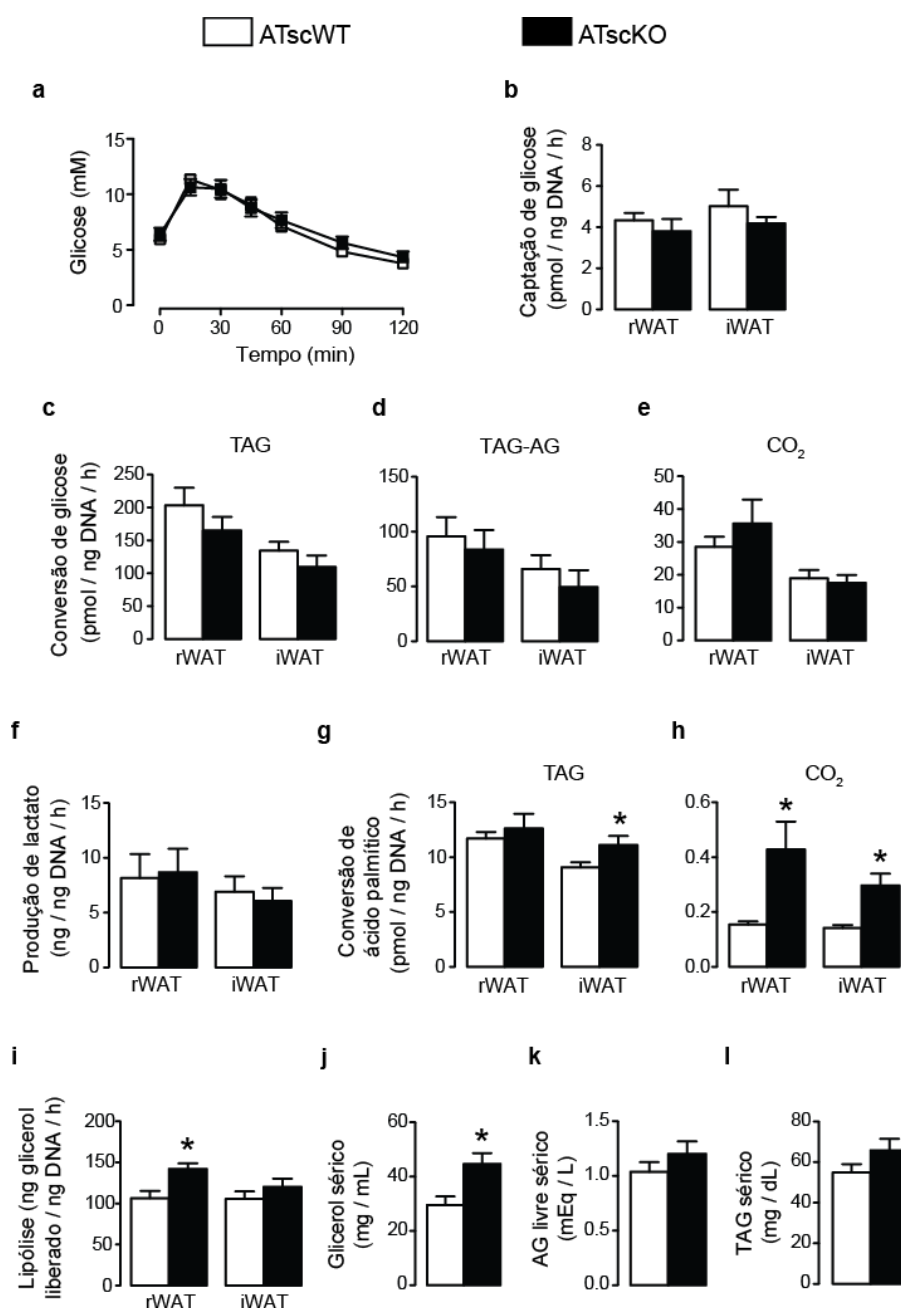


Figura 12 - **A deleção de *Tsc1* estimula a oxidação de ácido graxo e a lipólise no rWAT.** (a) Tolerância à glicose (n=8); (b) captação de glicose (n=5); conversão de glicose em (c) TAG, (d) TAG-AG, (e) CO₂ e (f) lactato (n=7) quando estimulados com insulina; incorporação de ácido palmítico em (g) TAG e (h) sua oxidação a CO₂ (n=9); (i) lipólise estimulada por isoproterenol (n=7); níveis séricos no jejum de (j) glicerol, (k) AG livre e (l) TAG (n=7) de camundongos machos ATscWT e ATscKO alimentados com dieta *chow*. * P<0,05 comparado ao ATscWT.

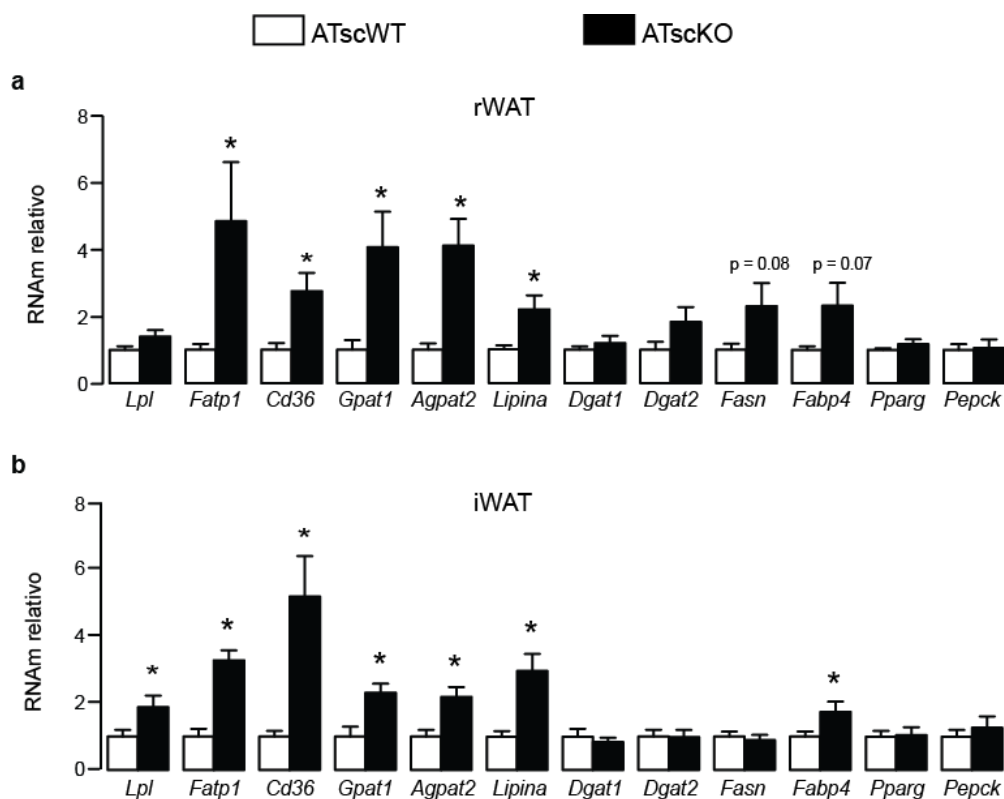


Figura 13 - **A deleção de *Tsc1* estimula a expressão de genes lipogênicos.** Níveis relativos de RNAm de genes lipogênicos no (a) rWAT (n=5-6) e (b) iWAT (n=6-7) de camundongos machos ATscWT e ATscKO alimentados com dieta *chow*. * $P < 0,05$ comparado ao ATscWT.

Achados anteriores mostrando que mTORC1 é um importante regulador da função mitocondrial (85) e os efeitos da deleção de *Tsc1* na oxidação de AG nos motivou a investigar o envolvimento da mitocôndria na redução do rWAT associada à deleção de *Tsc1*. Animais ATscKO apresentaram maiores níveis de RNAm de subunidades mitocondriais dos complexos da cadeia de transporte de elétrons I (NADH desidrogenase [ubiquinona] 1 beta subcomplexo 5, NDUFB5), II (complexo succinato desidrogenase, subunidade B, SDHB) e III (citocromo c-1, CYC1) (Figura 14a-c). Além disso, a deleção de *Tsc1* induziu aumento na expressão de RNAm e proteína de UCP-1 no rWAT, mas não no iWAT (Figura 14d-f). Quando normalizado para conteúdo de proteína no tecido inteiro, o iWAT dos ATscKO também apresentou tendência a expressar mais UCP-1 (Figura 14f). Por outro lado, a deleção de *Tsc1* aumentou a massa mitocondrial, medido pela atividade da citrato sintase (Figura 14g), a atividade dos complexos II e III (Figura 14h) e o consumo de O_2 tanto normalizado por DNA (Figura 14i) como por tecido inteiro (Figura 14j) em ambos rWAT e iWAT. A maior densidade e atividade mitocondrial encontrada nos

rWAT e iWAT de animais ATscKO foi confirmada por microscopia eletrônica, onde as mitocôndrias aparentavam ter cristas mais pronunciadas e mais organizadas (Figura 14k). Diferentemente dos rWAT e iWAT, a deleção de *Tsc1* no iBAT não alterou os níveis de RNAm e proteína de UCP-1, embora a normalização tenha demonstrado maior conteúdo proteico de UCP-1 no tecido inteiro (Figura 14l, m), provavelmente pela maior massa deste tecido encontrada nos ATscKO. Da mesma forma, enquanto o consumo de O₂ expresso por DNA não foi alterado pela deleção de *Tsc1* no iBAT (Figura 14n), a contribuição do tecido inteiro é significativamente maior (Figura 14o). Para verificar se o *browning* também ocorria especificamente no rWAT em fêmeas, verificamos o conteúdo proteico de UCP-1 em ambos rWAT e iWAT e, surpreendentemente, ambos tecidos apresentaram aumento em sua expressão (Figura 15a). Assim, a deleção de *Tsc1* em camundongos machos estimula a massa e atividade mitocondrial em ambos rWAT e iWAT, mas induz a expressão de UCP-1 apenas no rWAT. O resumo dos fenótipos encontrados nos machos alimentados com dieta *chow* pode ser encontrado na Tabela 4.

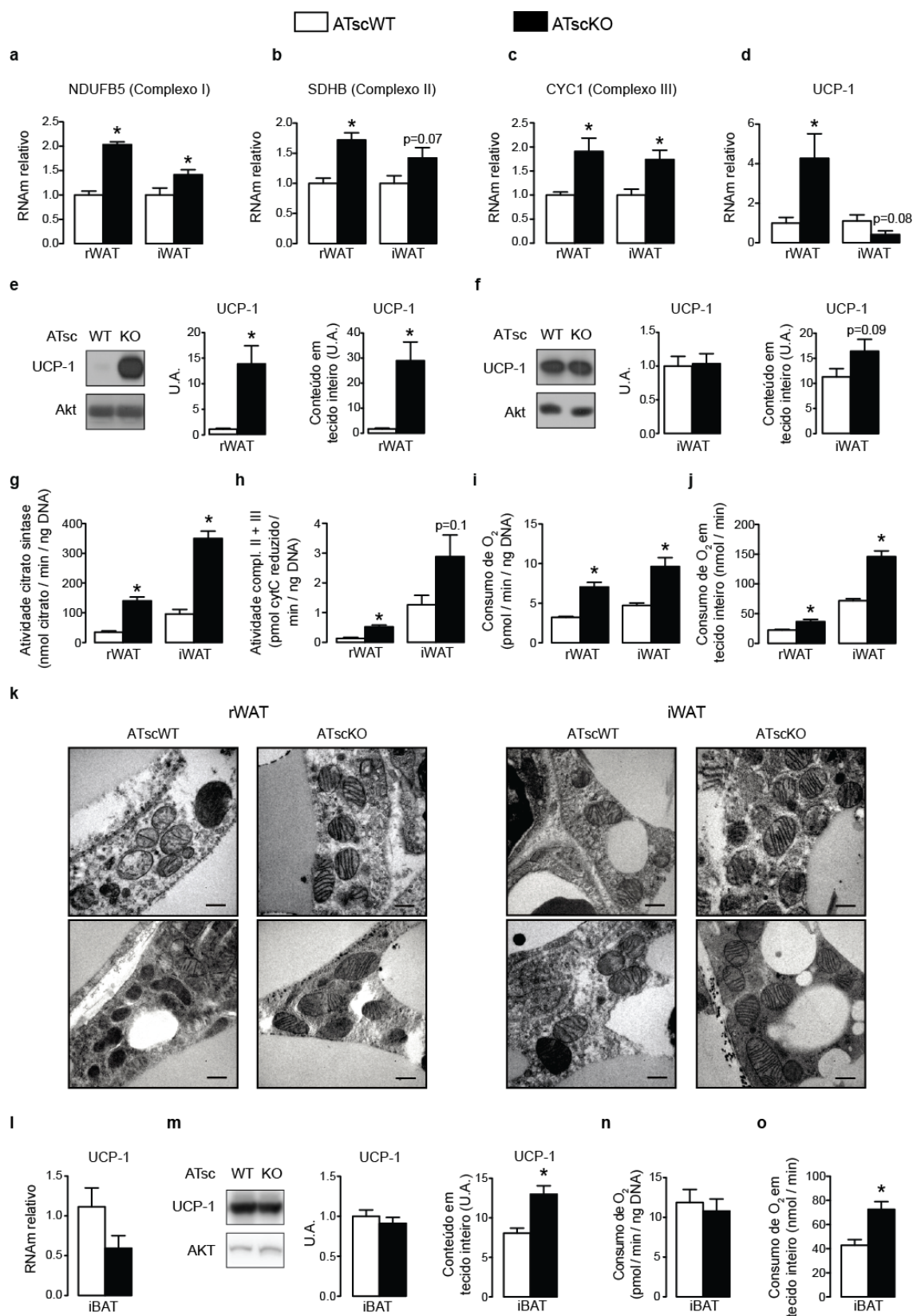


Figura 14 - A deleção de *Tsc1* em machos estimula o *browning* no rWAT e a atividade mitocondrial em ambos rWAT e iWAT. Níveis relativos de RNAm de subunidades dos complexos mitocondriais (a) I, (b) II e (c) III e (d) UCP-1 no rWAT e iWAT (n=4-7); conteúdo proteico relativo e total de UCP-1 no (e) rWAT e (f) iWAT (n=7); atividade da (g) citrato sintase (n=6) e dos (h) complexos II + III (n=4), consumo de O₂ normalizado (i) por DNA e (j) no tecido inteiro de rWAT e iWAT (n=4); (k) imagens representativas de microscopia eletrônica dos rWAT e iWAT (n=3), barra da escala = 200 nm; conteúdo de (l) RNAm e (m) proteico relativo e total de UCP-1 no iBAT; consumo de O₂ normalizado (n) por DNA e (o) no tecido inteiro de iBAT de camundongos machos ATscWT e ATscKO alimentados com dieta *chow*. * P<0,05 comparado ao ATscWT.

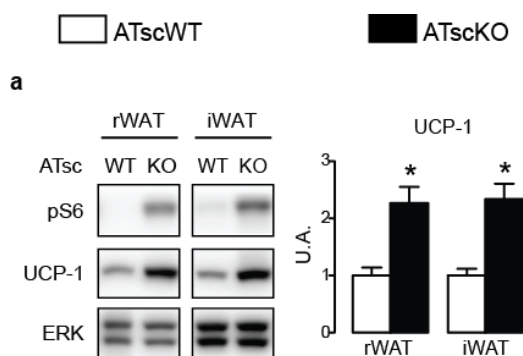


Figura 15 - A deleção de *Tsc1* em fêmeas estimula o *browning* em ambos rWAT e iWAT. (a) Conteúdo proteico de UCP-1 no rWAT e iWAT (n=6) de camundongos fêmeas ATscWT e ATscKO alimentadas com dieta *chow*. * P<0,05 comparado ao ATscWT.

Tabela 4 - Visão geral dos fenótipos associados à deleção de *Tsc1* em adipócitos no rWAT e iWAT de machos alimentados com a dieta *chow*.

Parâmetro	rWAT	iWAT
Peso tecidual	menor	não alterou
Diâmetro do adipócito	menor	não alterou
Captação de glicose	não alterou	não alterou
Glicose em TAG	não alterou	não alterou
Oxidação de glicose	não alterou	não alterou
AG em TAG	não alterou	aumentou
Oxidação de AG	aumentou	aumentou
Lipólise	aumentou	não alterou
Massa mitocondrial	aumentou	aumentou
Consumo de O₂	aumentou	aumentou
Expressão e atividade da cadeia de transporte de elétrons	aumentou	aumentou
Conteúdo de UCP-1	aumentou	não alterou

Para confirmar que mTORC1 é responsável pela indução de *browning* no rWAT, animais ATscKO foram tratados com rapamicina por duas semanas e avaliados para conteúdo proteico de UCP-1. A inibição farmacológica de mTORC1 com rapamicina bloqueou completamente o aumento de UCP-1 induzido pela deleção de *Tsc1* (Figura 16a). Para tentar compreender os mecanismos pelos quais mTORC1 induz o *browning*, testamos o envolvimento da inervação simpática e de alguns fatores de transcrição já conhecidos por estimular a atividade mitocondrial e expressão de UCP-1 (21). A desnervação simpática unilateral do rWAT reduziu a expressão de UCP-1 nos animais ATscWT, mas não nos ATscKO (Figura 16b), sugerindo que a deleção de *Tsc1* aumenta o conteúdo de UCP-1 independentemente da atividade simpática. Em seguida, verificamos a expressão de fatores de transcrição importantes para este processo. A deleção de *Tsc1* aumentou os níveis de RNAm de *Cebpb* e *Esrra* (codifica $ERR\alpha$) especificamente em rWAT, enquanto que de *Pgc1a* (codifica coativador de $PPAR\gamma$ 1 α , PGC-1 α) e *Ppara* foram aumentados em ambos rWAT e iWAT (Figura 16c, d). A deleção de *Tsc1* também reduziu os níveis de RNAm de *Prdm16* (codifica PRDM16) especificamente no iWAT, enquanto não afetou a expressão gênica de *Esr1* (codifica $ER\alpha$) e *Yy1* (codifica yin yang 1, YY1) (Figura 16c, d).

Nem sempre há uma relação direta entre níveis de RNAm e proteína (86). Além disso, mTORC1/S6K1 pode fosforilar e estimular o $ER\alpha$ (87) e induzir a expressão e atividade de $ERR\alpha$ (88), os quais podem levar à redução da adiposidade (89) e indução da UCP-1 (90), respectivamente. Assim decidimos testar o envolvimento de $ER\alpha$ e $ERR\alpha$ na expressão de UCP-1 através do tratamento com seus inibidores. O aumento na expressão de RNAm de *Esrra* pela deleção de *Tsc1* no rWAT não refletiu em aumentos da proteína $ERR\alpha$ e tampouco o tratamento com seu inibidor XCT 790 inibiu o aumento de expressão de UCP-1 induzido pela deleção de *Tsc1* (Figura 16e). Por outro lado, enquanto os níveis de RNAm de *Esr1* não foram alterados no rWAT de ATscKO, o conteúdo proteico de $ER\alpha$ foi aumentado (Figura 16e). Entretanto, o tratamento com seu inibidor MPP não alterou o aumento da expressão de UCP-1 induzido pela deleção de *Tsc1* no rWAT (Figura 16e), e também não foi observado aumento no conteúdo de p $ER\alpha$ como seria esperado pela ativação de mTORC1 (Figura 16f). Com isso, descartamos a possível participação de $ERR\alpha$ ou $ER\alpha$ na indução do *browning* associado à deleção de

Tsc1. Importante notar que o aumento na expressão de RNAm de *Pgc1a* pela deleção de *Tsc1* foi associada ao aumento proteico de PGC-1 α , o qual não foi alterado pelos tratamentos com XCT 790 e MPP (Figura 16e). Outro possível mecanismo pelo qual mTORC1 poderia induzir o *browning* seria através da inibição da autofagia (91), já que animais com deleção de *Atg7* especificamente no tecido adiposo apresentam maior expressão de UCP-1 e atividade mitocondrial (92). Entretanto, inesperadamente, a ativação constitutiva de mTORC1 promoveu aumento da autofagia, como demonstrado pelo maior conteúdo proteico de LC3-II (Figura 16g).

Para investigar se a deleção de *Tsc1* protege os animais da obesidade induzida pela dieta, alimentamos os camundongos ATscWT e ATscKO com dieta com baixo teor de gordura (LFD) e hiperlipídica (HFD) por oito semanas. A LFD foi preparada com os mesmos ingredientes, vitaminas e minerais que a HFD e assim foi usada como controle. Semelhantemente à dieta *chow*, animais ATscKO alimentados com LFD tiveram, de forma geral, menor peso corporal porém nenhuma alteração no consumo alimentar (Figura 17a, b). Além disso, apresentaram redução nos eWAT e rWAT, mas nenhuma alteração nas massas dos iWAT, iBAT, fígado e músculo (Figura 17c, d). Ao avaliar a área dos adipócitos, foi observado que, embora não houvesse alteração na área média dos adipócitos entre animais ATscWT e ATscKO, a deleção de *Tsc1* promoveu maior porcentagem de adipócitos de área até 250 μm^2 no rWAT e menor porcentagem de adipócitos de área entre 500 e 750 μm^2 no iWAT (Figura 17e, f).

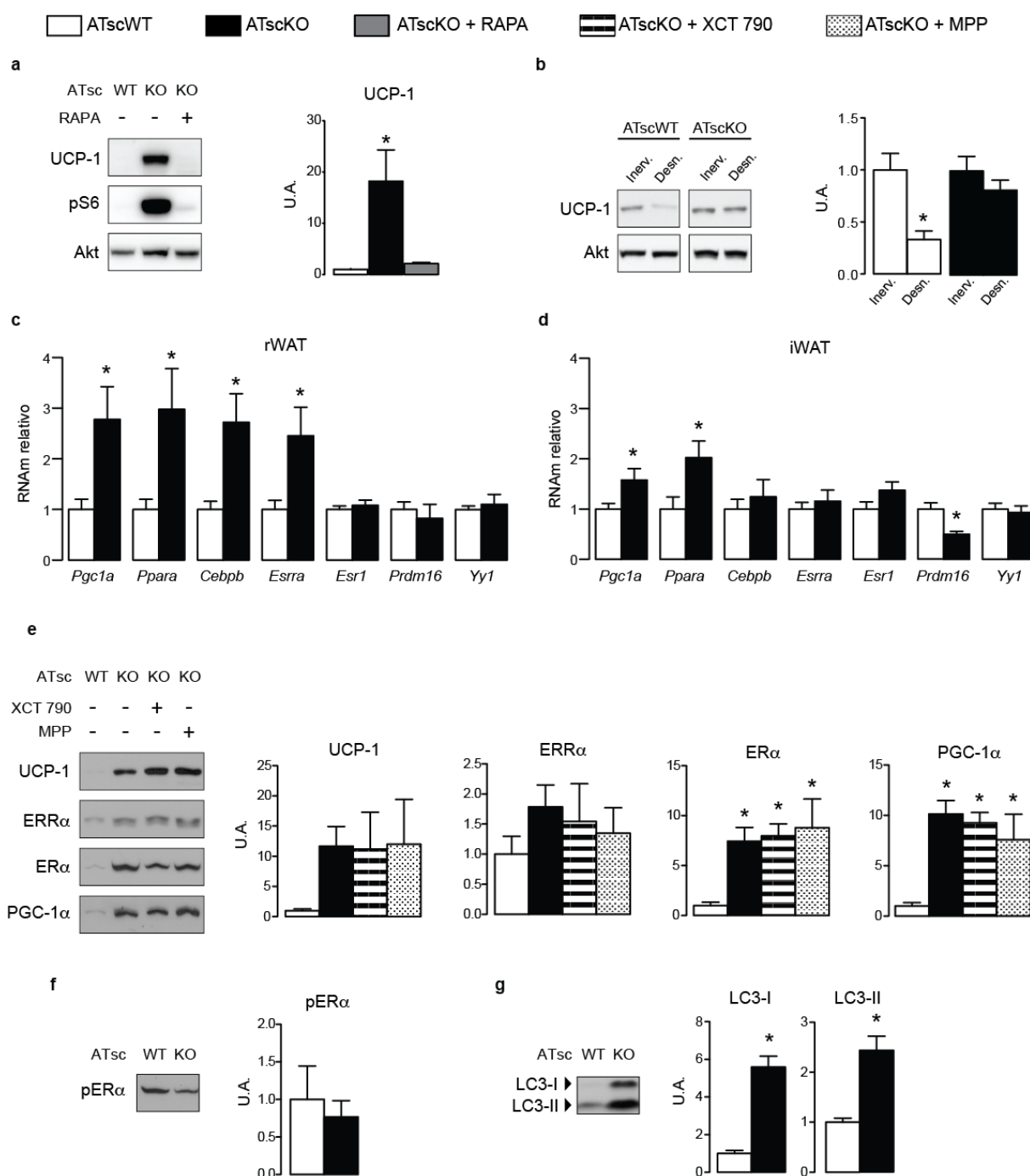


Figura 16 - A deleção de *Tsc1* estimula a expressão de fatores de transcrição envolvidos no *browning*. (a) Conteúdo de UCP-1 no rWAT de animais ATscKO tratados com veículo ou rapamicina (n=3), (b) conteúdo de UCP-1 em rWAT inervado e desnervado (n=3); níveis relativos de RNAm de fatores de transcrição e correguladores envolvidos no *browning* no (c) rWAT e (d) iWAT (n=6); (e) conteúdo proteico de UCP-1 e fatores de transcrição no rWAT de animais ATscKO tratados com veículo, XCT 790 ou MPP (n=3); (f) conteúdo proteico de pERα no rWAT (n=3); (g) conteúdo proteico da proteína envolvida na autofagia LC3 no rWAT de camundongos machos ATscWT e ATscKO alimentados com dieta *chow*. * P<0,05 comparado ao ATscWT.

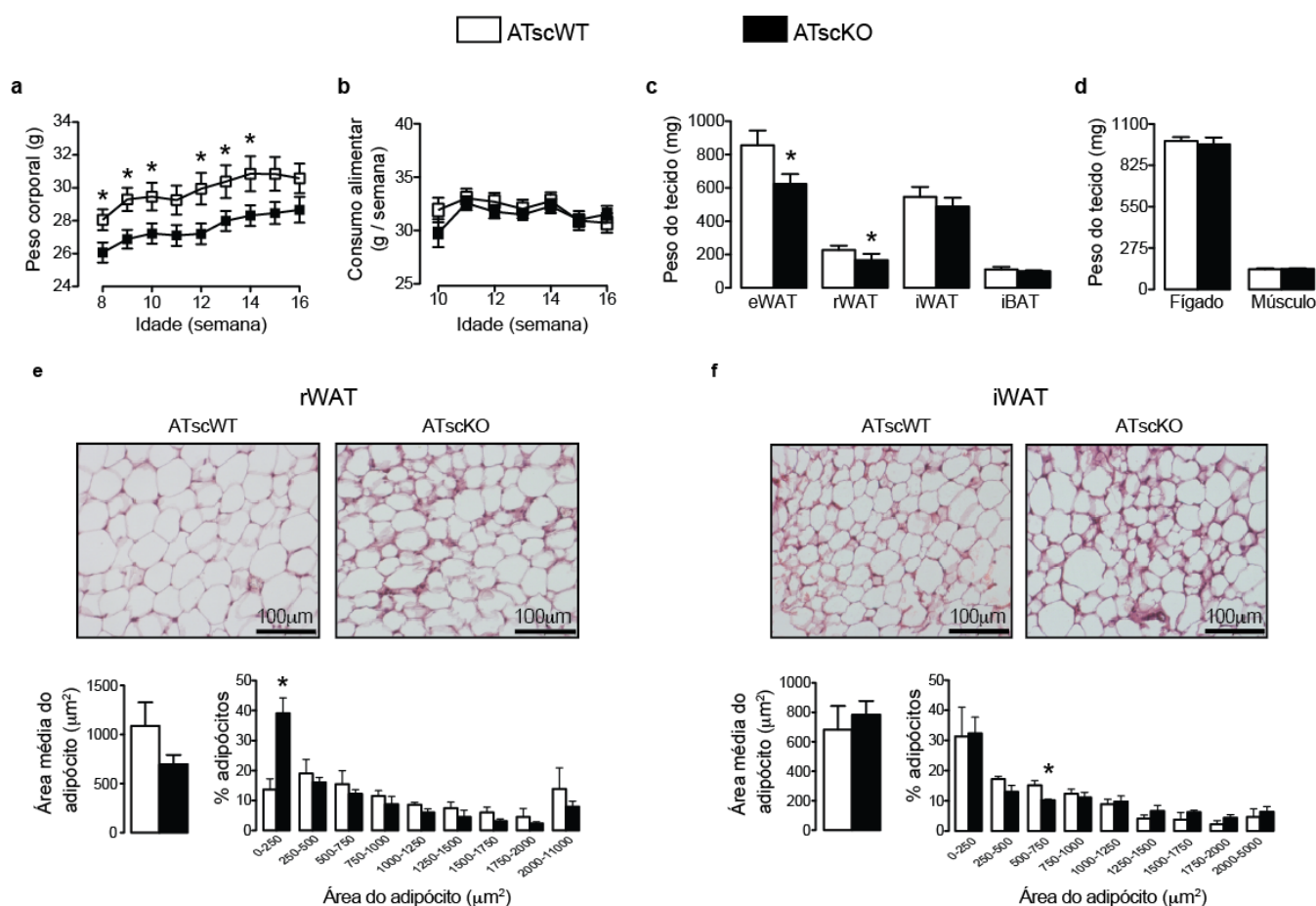


Figura 17 - A deleção de *Tsc1* reduz o rWAT e o eWAT em machos alimentados com LFD. (a) Peso corporal (n=18-20); (b) consumo alimentar (n=16-17); peso dos (c) tecidos adiposos (n=16-23) e (d) não-adiposos (n=9-10) com 16 semanas de idade; (e) rWAT e (f) iWAT (n=3) corados com hematoxilina/eosina e áreas dos adipócitos, barra da escala = 100 μM , de camundongos machos ATscWT e ATscKO alimentados com LFD. * $P < 0,05$ comparado ao ATscWT.

Em animais alimentados com a LFD, a deleção de *Tsc1* melhorou a tolerância à glicose, como visto pela menor área sob a curva e menor glicemia em diferentes pontos do GTT (Figura 18a). Essa melhora foi associada a maiores níveis séricos de adiponectina (Figura 18b), assim como maior conteúdo de pS473AKT no fígado e no músculo e de pT308AKT no fígado (Figura 18c, d). Além disso, a deleção de *Tsc1* aumentou a expressão de RNAm de *Fatp1*, *Cd36* e *Gpat1* e reduziu a de *Pepck* no rWAT, enquanto no iWAT, aumentou os níveis de RNAm de diversas enzimas envolvidas em todos os processos de transporte de AG e síntese de TAG, como *Fatp1*, *Cd36*, *Gpat1*, *Lipin*, *Dgat1* e *FABP4*. Em nenhum dos tecidos, entretanto, a deleção de *Tsc1* alterou a expressão de *Pparg* (Figura 18e, f).

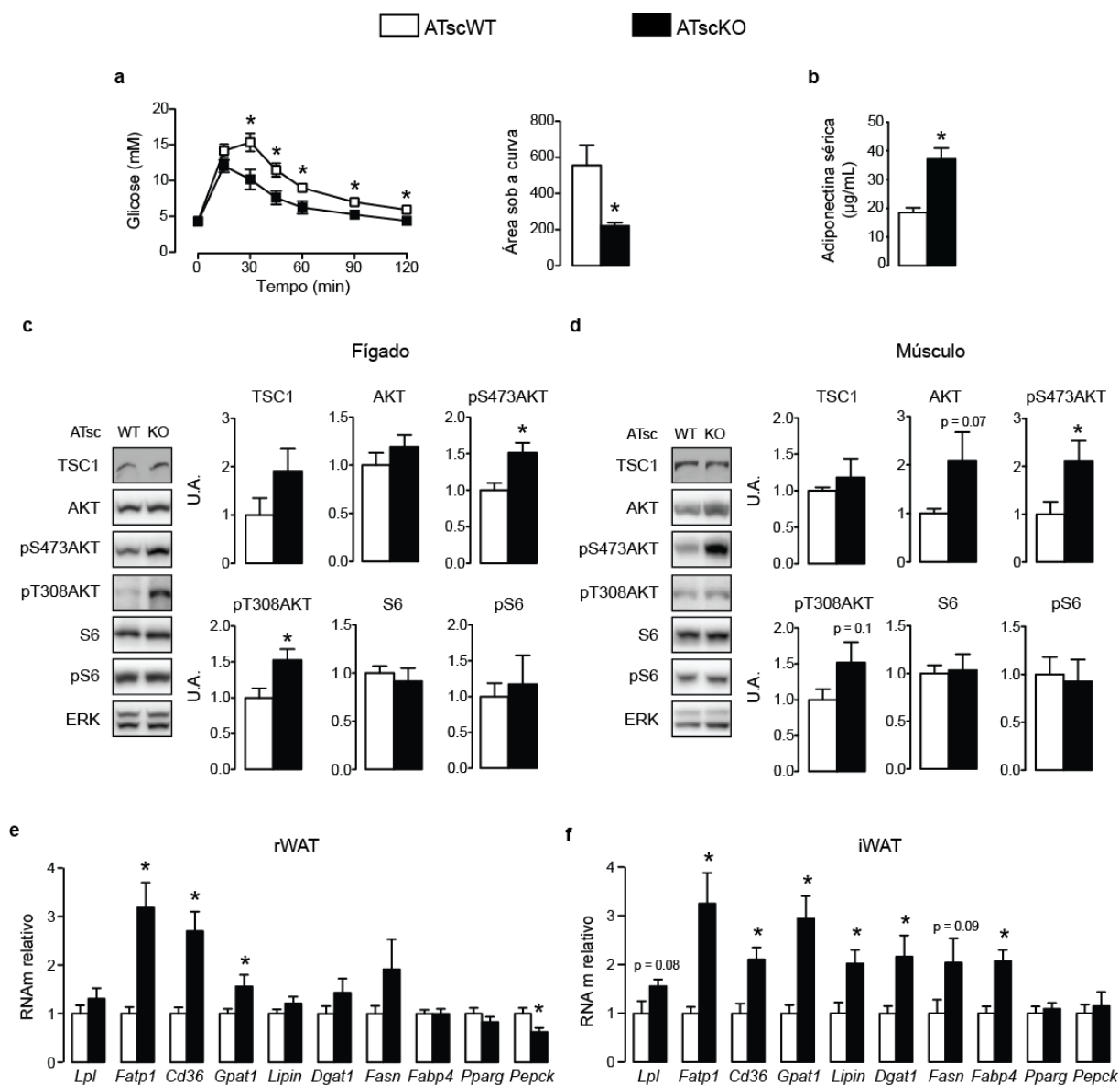


Figura 18 - A deleção de *Tsc1* melhorou a tolerância à glicose em machos alimentados com LFD. (a) Tolerância à glicose (n=7); níveis séricos no jejum de (b) adiponectina (n=13-14); sinalização de mTORC1 no (c) fígado e (d) músculo gastrocnêmio (n=5); níveis relativos de RNAm de genes lipogênicos no (e) rWAT e (f) iWAT (n=7-10) de camundongos machos ATscWT e ATscKO alimentados com LFD. * P<0,05 comparado ao ATscWT.

Para verificar se animais ATscKO na LFD também apresentam aumento na atividade mitocondrial e *browning*, analisamos a expressão de RNAm de diversas proteínas envolvidas nesses processos. A deleção de *Tsc1* aumentou os níveis de RNAm de uma subunidade do complexo I e tendeu a aumentar de subunidades dos complexos II e III especificamente no rWAT (Figura 19a-c). Já a expressão de UCP-1 foi aumentada pela deleção de *Tsc1* no rWAT e reduzida no iWAT (Figura 19d). Por outro lado, ambos rWAT e iWAT dos ATscKO tiveram aumento nos níveis de

RNAm dos fatores de transcrição *Pgc1a*, *Ppara*, *Cebpb* e *Esrra* (Figura 19e, f). Em resumo, a deleção de *Tsc1* nos animais alimentados com LFD promoveu redução da adiposidade visceral, o que foi associada à melhor tolerância à glicose, maior expressão de proteínas envolvidas na função mitocondrial e UCP-1.

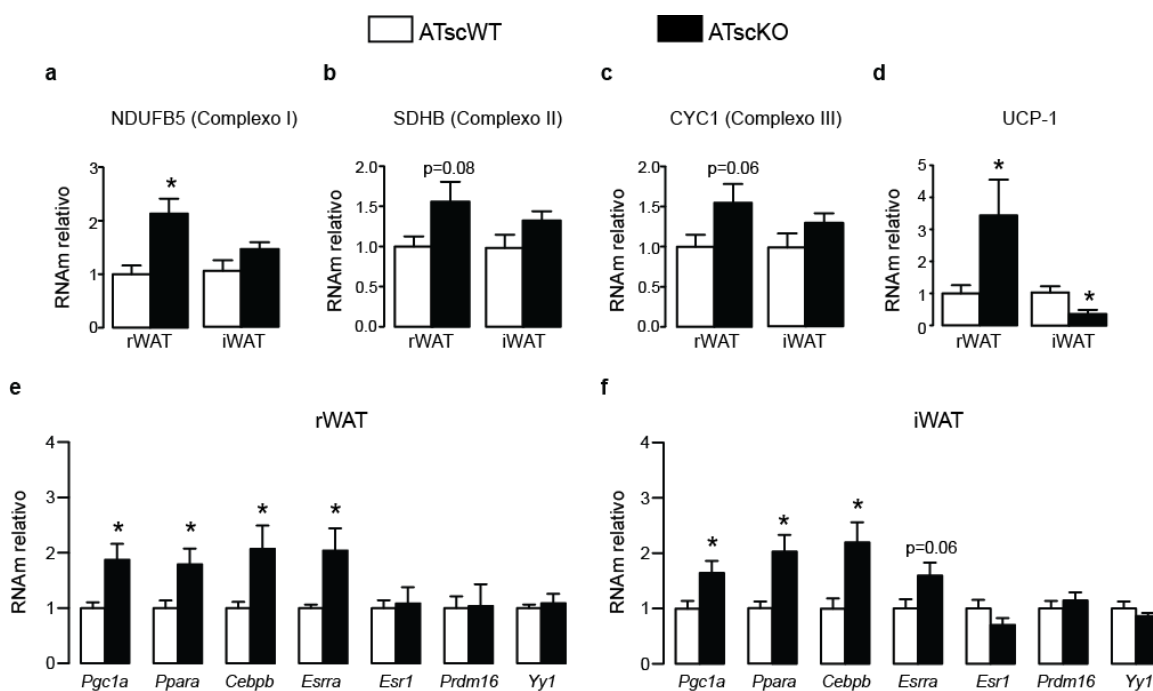


Figura 19 - A deleção de *Tsc1* estimula o *browning* e a expressão de enzimas mitocondriais apenas no rWAT de machos alimentados com LFD. Níveis relativos de RNAm de subunidades dos complexos mitocondriais (a) I, (b) II e (c) III e (d) UCP-1 no rWAT e iWAT (n=6-10) e de fatores de transcrição e correguladores no (e) rWAT e (f) iWAT (n=8-10) de camundongos machos ATscWT e ATscKO alimentados com dieta LFD. * P<0,05 comparado ao ATscWT.

Diferente da dieta *chow* ou LFD, a deleção de *Tsc1* não alterou o peso corporal dos animais alimentados com HFD (Figura 20a) e tampouco mudou o consumo alimentar (Figura 20b). Por outro lado, os eWAT e rWAT foram também reduzidos nos animais ATscKO, enquanto que o iWAT e o iBAT foram aumentados e o fígado e músculo não foram alterados (Figura 20c, d). Com isso, animais ATscKO na HFD também demonstraram melhora na tolerância à glicose comparados aos ATscWT (Figura 21a), além de aumento nos níveis séricos de adiponectina (Figura 21b). Dentre os genes envolvidos na síntese de TAG, somente os transportadores de AG *Fatp1* e *Cd36* apresentaram aumento ou tendência a aumento nos níveis de RNAm, respectivamente, no rWAT com a deleção de *Tsc1* (Figura 21c, d).

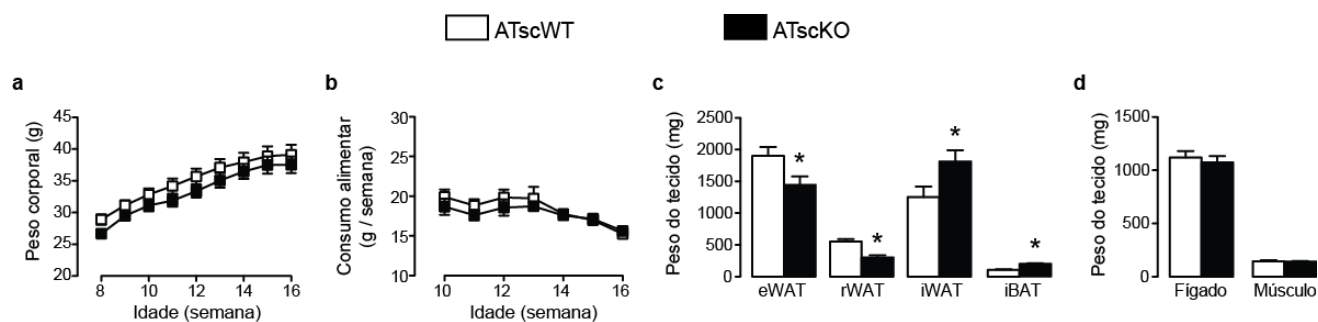


Figura 20 - A deleção de *Tsc1* reduz o rWAT e o eWAT em machos alimentados com HFD. (a) Peso corporal (n=18); (b) consumo alimentar (n=15); peso dos (c) tecidos adiposos (n=18) e (d) não-adiposos (n=9) de camundongos com 16 semanas de idade machos ATscWT e ATscKO alimentados com HFD. * $P < 0,05$ comparado ao ATscWT.

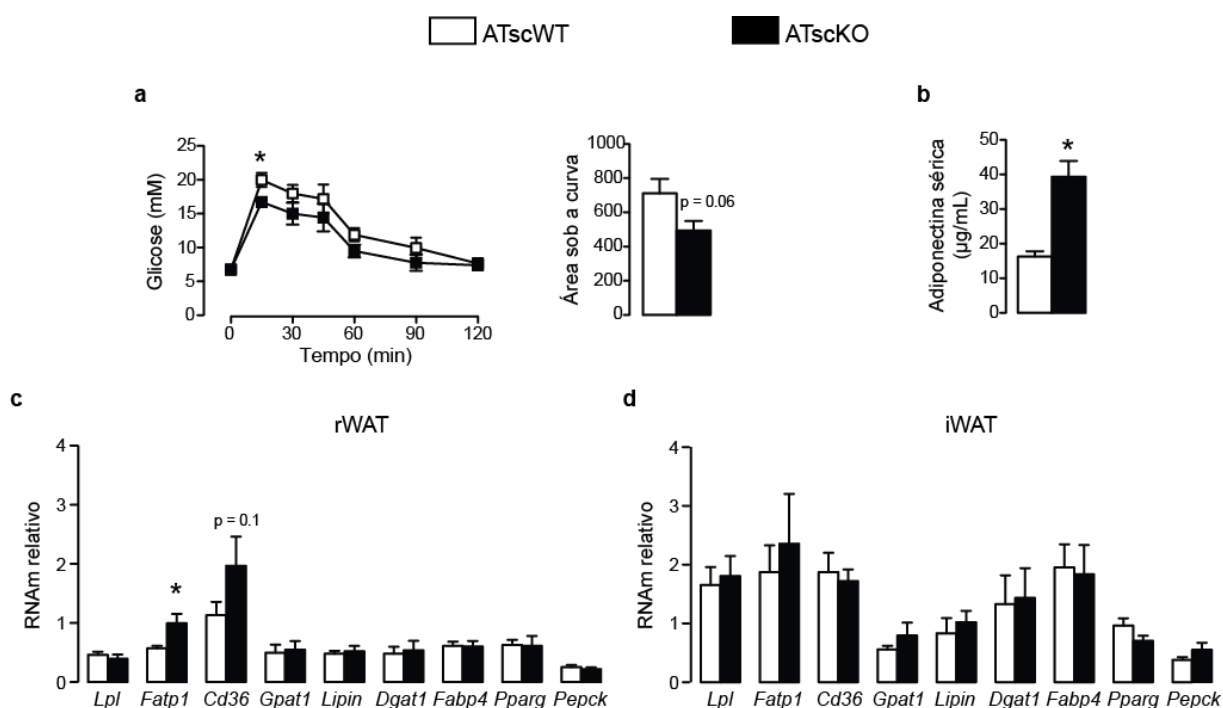


Figura 21 - A deleção de *Tsc1* melhorou a tolerância à glicose em machos alimentados com HFD. (a) Tolerância à glicose (n=8); níveis séricos no jejum de (b) adiponectina (n=12-13); níveis relativos de RNAm de genes lipogênicos no (c) rWAT e (d) iWAT (n=6-9), sendo a média do mesmo gene do mesmo tecido do ATscWT na dieta LFD igual a 1, de camundongos machos ATscWT e ATscKO alimentados com HFD. * $P < 0,05$ comparado ao ATscWT.

Já a expressão das subunidades dos complexos mitocondriais I e III foi também aumentada apenas no rWAT, enquanto a do complexo II não sofreu alteração nos animais ATscKO alimentados com HFD (Figura 22a-c). Os níveis de RNAm de UCP-1 foram indetectáveis nos rWAT e iWAT de ambos ATscWT e ATscKO na HFD, sugerindo que não tenha tido participação na mudança de adiposidade ocorrida nesta dieta. Por outro lado, a deleção de *Tsc1* ainda aumentou os níveis de RNAm de *Pgc1a* e tendeu a aumentar de *Ppara* no rWAT, assim como reduziu de *Esr1* e *Prdm16* no iWAT (Figura 22d, e). Em resumo, animais ATscKO na HFD apresentaram menor adiposidade visceral, o que foi associada à melhor tolerância à glicose e maior expressão de enzimas mitocondriais.

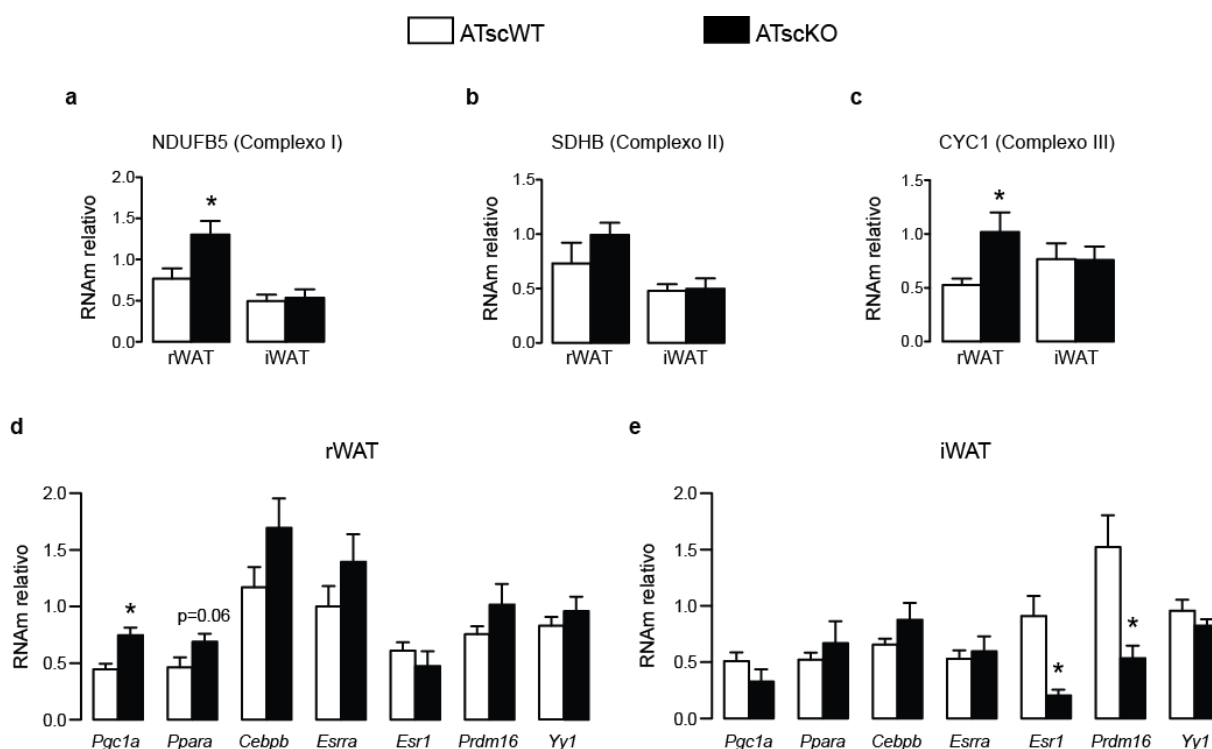


Figura 22 - A deleção de *Tsc1* estimula a expressão de enzimas mitocondriais apenas no rWAT de machos alimentados com HFD. Níveis relativos de RNAm de subunidades dos complexos mitocondriais (a) I, (b) II e (c) III e (d) UCP-1 no rWAT e iWAT (n=6-10) e de fatores de transcrição e corre reguladores no (e) rWAT e (f) iWAT (n=8-10) de camundongos machos ATscWT e ATscKO alimentados com dieta LFD. * P<0,05 comparado ao ATscWT.

5 DISCUSSÃO

Evidências recentes demonstrando que a inibição moderada de mTORC1, em oposição à inibição completa, exacerba a obesidade induzida por dieta e a adipogênese *in vitro* (70, 71) nos motivou a testar a hipótese de que a ativação constitutiva de mTORC1 em adipócitos reduz a adiposidade. De fato, a ativação constitutiva de mTORC1 em adipócitos maduros reduziu a adiposidade visceral em machos, bem como a visceral e a subcutânea em fêmeas. Mecanicamente, esta menor adiposidade, caracterizada pela redução do tamanho e número de adipócitos, parece ter sido desencadeada, pelo menos em parte, por aumento da lipólise, atividade oxidativa mitocondrial e *browning* (termogênese).

Ainda que contra-intuitivo ao efeito anabólico de mTORC1 na síntese de lipídeos (44) e adipogênese (64), nossos achados mostrando que a deleção de *Tsc1* em adipócitos maduros pode reduzir a adiposidade visceral está de acordo com a hipótese da curva em U-invertido, ou seja, de que a ativação constitutiva de mTORC1 é tão inibitória para a deposição de lipídeos e adiposidade como é a inibição completa farmacológica ou genética deste complexo (68, 69), embora nesses estudos a redução na adiposidade não tenha sido tecido-específica. Esta relação de "dose-resposta" em forma de U ou U-invertido já foi demonstrada em diversos fenômenos biológicos e farmacológicos e acredita-se que seja um mecanismo de proteção do organismo contra um eventual distúrbio na homeostase (93). Similar aos adipócitos, a deleção de *Tsc1* em hepatócitos também reduz a deposição lipídica e protege contra a esteatose hepática induzida por dieta (94). Assim, baseados nesses dados podemos sugerir que um nível ótimo de ativação de mTORC1 é necessário para que este complexo promova efeitos anabólicos sobre a adiposidade. Esta hipótese é apoiada não apenas pela exacerbação da adipogênese e obesidade induzida pela dieta devido à inibição parcial de mTORC1 pela superexpressão de Depton (70), mas também pela maior adipogênese e acúmulo de TAG das células 3T3-L1 induzidos pelo *knockdown* parcial de mTOR (71). Importante notar que em ambos estudos, o aumento na adipogênese e adiposidade foram atribuídos ao menor *feedback* negativo catalisado pela S6K1 na via IRS1-PI3K-AKT, a qual estimula a lipogênese de forma dependente e independente de mTORC1 (95). Visto que a deleção de *Tsc1* reduziu a atividade de AKT em todos os tecidos adiposos investigados, mesmo naqueles que não apresentaram alteração na massa,

sugerimos que outros mecanismos além da inibição de AKT estejam envolvidos na redução da adiposidade visceral. Importante ressaltar que o nível de ativação de mTORC1 provocado pela deleção de *Tsc1* é provavelmente muito maior que o encontrado espontaneamente na obesidade, que provavelmente deve estar mais próximo ao pico da curva e assim aos efeitos positivos deste complexo na adiposidade.

A redução da massa do rWAT induzida pela deleção de *Tsc1* envolve redução tanto do tamanho quanto do número de adipócitos. Embora os mecanismos pelos quais a deleção de *Tsc1* reduz o número de adipócitos sejam ainda desconhecidos, este fenótipo resulta geralmente da inibição da formação de novos adipócitos (adipogênese) e/ou aumento da morte celular. A menor área média dos adipócitos, por outro lado, que reflete o conteúdo intracelular de TAG, parece estar relacionada ao aumento da lipólise, como evidenciado pela maior taxa de lipólise no rWAT e maior concentração sérica de glicerol nos animais ATscKO. Esses resultados se opõem ao de um estudo *in vitro*, onde a ativação de mTORC1 pela expressão constitutiva de RHEB reduziu a lipólise basal e estimulada por isoproterenol em células 3T3-L1 diferenciadas em adipócitos (96). Esta discrepância pode ser devido ao uso de linhagem de células ou diferentes níveis de ativação de mTORC1, como verificado pelo conteúdo de pS6 (97).

Além da lipólise, hipotetizamos que mTORC1 poderia estar alterando a síntese de lipídeos. Entretanto, em oposição ao bem estabelecido envolvimento de mTORC1 na ativação do fator de transcrição SREBP1 (98), a deleção de *Tsc1* não aumentou a lipogênese *de novo* dos adipócitos, como avaliado pela incorporação de glicose em AG de TAG. Dentre os genes cuja transcrição é ativada por SREBP1, somente o *Gpat1* foi aumentado pela deleção de *Tsc1* enquanto o *Fasn*, que codifica a enzima lipogênica chave FAS, não foi alterada no rWAT. Se SREBP1 estava realmente mais ativado nos adipócitos dos animais ATscKO ainda precisa ser investigado. Além disso, a maior expressão das enzimas envolvidas na captação, transporte e esterificação de AG induzida pela deleção de *Tsc1* só acarretou em maior incorporação de AG em TAG no iWAT, e não no rWAT, ajudando a explicar a manutenção da massa deste depósito de tecido adiposo. Interessante notar que, nos animais alimentados com LFD, a deleção de *Tsc1* reduziu os níveis de RNAm de

Pepck no rWAT, sugerindo que essas células sintetizavam menos glicerol 3-fosfato via gliceroneogênese, que pode, portanto, prejudicar a síntese de TAG.

Curiosamente, a deleção de *Tsc1* aumentou a oxidação de AG no período noturno, verificado pela redução no quociente respiratório, bem como aumentou nos rWAT e iWAT a oxidação de AG, respiração basal, transcrição gênica e atividade dos complexos II e III da cadeia de transporte de elétrons e da citrato sintase, indicando que a ativação constitutiva de mTORC1 aumenta a massa mitocondrial e a capacidade oxidativa de adipócitos. Estes resultados estão de acordo com dados da literatura indicando que mTORC1 é um importante regulador da biogênese e função mitocondrial através do controle da transcrição gênica e tradução de RNAm de proteínas mitocondriais codificadas pelo núcleo (85, 88, 99, 100). Além disso, este aumento na função mitocondrial foi associada à maior expressão de PGC-1 α e PPAR α , sendo o primeiro um coativador de diversos genes envolvidos na biogênese mitocondrial, metabolismo oxidativo e *browning* e o segundo um fator de transcrição importante para a oxidação de AG e regulação da expressão de PGC-1 α (101, 102).

Além de estimular o metabolismo oxidativo mitocondrial, a ativação constitutiva de mTORC1 em adipócitos aumentou a expressão de UCP-1 em machos especificamente no rWAT, e não nos iWAT e iBAT, enquanto que nas fêmeas induziu o *browning* em ambos tecidos adiposos brancos. O padrão de *browning* encontrado nos machos e fêmeas está, neste caso, diretamente associado à adiposidade, ou seja, os depósitos em que a deleção de *Tsc1* aumentou a expressão de UCP-1 também apresentaram redução em suas massas. Estes achados estão de acordo com evidências indicando que o aumento do metabolismo oxidativo de adipócitos somente leva a uma redução na adiposidade quando associado ao desacoplamento mitocondrial e a dissipação de energia na forma de calor (103). Entretanto, se consideramos o tecido todo, ambos rWAT e iBAT dos machos ATsckKO apresentam maior conteúdo de UCP-1, refletindo em um menor peso corporal e em uma tendência a aumento no consumo de O₂ corporal. Importante ressaltar que nas análises de *western blot* e qPCR, foram utilizadas as mesmas quantidades de proteína ou RNA para os diferentes grupos, mesmo que nos rWAT e iWAT tenha sido encontrado maior conteúdo total de proteína e de RNA por ng de DNA. Isso implica que os aumentos encontrados nos parâmetros com a deleção de *Tsc1* foram, na realidade, subestimados se considerarmos o conteúdo de

determinada proteína ou RNA de cada célula individualmente. Da mesma forma, o que pareceu não ter sido diferente entre os grupos ATscWT e ATscKO, como no caso do conteúdo proteico de UCP-1 no iWAT, pode ser maior no grupo ATscKO se considerados cada célula individualmente ou o tecido como um todo.

O mecanismo pelo qual a ativação de mTORC1 induz o *browning* ainda não foi elucidado, mas poderia envolver C/EBP β e ERR α , fatores de transcrição que estimulam o metabolismo oxidativo e o *browning* (90, 101, 104) e cujos níveis de RNAm estavam aumentados especificamente no rWAT dos ATscKO alimentados com a dieta *chow*. Embora já tenha sido demonstrado a importância de mTORC1 no controle da transcrição, tradução e atividade de ERR α em hepatócitos (88), os dados em adipócitos demonstrando que o aumento nos níveis de RNAm *Esrra* não se traduziu em aumento no conteúdo proteico e que a inibição farmacológica deste fator de transcrição pelo tratamento com XCT 790 não interfere no aumento da expressão de UCP-1 excluem o envolvimento de ERR α no *browning* induzido pela deleção de *Tsc1*. Além disso, a transcrição de C/EBP β foi aumentada em ambos rWAT e iWAT dos ATscKO alimentados com a LFD, onde também foi encontrado *browning* especificamente no rWAT, sugerindo que este fator de transcrição não está envolvido neste processo.

Baseados nos estudos anteriores mostrando que a ativação de ER α induz *browning* (105), que animais *knockout* para ER α tem maior adiposidade (89) e que a atividade transcricional deste fator transcrição induzida por estrógeno é dependente de mTORC1 (106), nós testamos também um possível envolvimento de ER α no *browning* induzido pela deleção de *Tsc1* em adipócitos. Embora a deleção de *Tsc1* tenha realmente aumentado o conteúdo proteico de ER α , o tratamento com seu antagonista MPP não alterou a expressão de UCP-1. A atividade de ER α , todavia, pode ser também estimulada pela fosforilação de resíduos de S167 por mTORC1/S6K1 (87) por mecanismo que independe da ação de estrógenos. A hipótese de que mTORC1 estaria estimulando a atividade de ER α diretamente foi entretanto descartada, visto que não foi verificado aumento na fosforilação de S167 no rWAT com deleção de *Tsc1*. A influência dos outros fatores de transcrição não foi investigada, mas é interessante notar que a expressão de PRDM16, corregulador essencial para a indução do *browning* (31), foi reduzida no iWAT dos ATscKO

alimentados com a dieta *chow*, sugerindo que possa ter sido um dos fatores que impossibilitou a maior expressão de UCP-1 neste depósito.

Recentemente, dois estudos demonstraram a importância de mTORC1 para a indução de *browning* no frio e na estimulação β -adrenérgica (107, 108). Ambos utilizaram animais com baixa atividade de mTORC1 através do tratamento com rapamicina ou deleção de *Raptor* especificamente em adipócitos e os submeteram ao frio ou à estimulação β -adrenérgica através da injeção do agonista CL 316,243. Assim, verificaram que a inibição de mTORC1 bloqueava o *browning* induzido pela sinalização β -adrenérgica (107, 108). Um dos estudos ainda demonstrou que o aumento da expressão de UCP-1 é dependente da fosforilação direta de Raptor e mTOR pela PKA, cuja atividade é estimulada pelo aumento de AMPc provocado pela ativação do receptor β -adrenérgico (108). Curiosamente, a desnervação β -adrenérgica do rWAT não reduziu a expressão de UCP-1 nos ATsckKO, sugerindo que a ativação constitutiva de mTORC1 induz o *browning* independentemente da ativação β -adrenérgica. De qualquer forma, o mecanismo pelo qual mTORC1 induz a expressão dos genes termogênicos no tecido adiposo branco no frio ou na sua super-ativação é ainda desconhecido. Importante notar que tanto a inibição quanto a ativação constitutiva de mTORC1 não alterou a expressão de UCP-1 e respiração basal do iBAT (107, 108). Esses achados contrastam um estudo anterior demonstrando que a deleção de *Tsc1* reduz a expressão de genes termogênicos de adipócitos marrons (109). Essa discrepância deve estar relacionada ao uso da recombinase-Cre sob controle do promotor da FABP4, ao invés da adiponectina como em nossos estudos, o qual já foi demonstrado não ser específico para adipócitos (110). Assim a deleção de *Tsc1* em outras células deve ter sido a causa da morte prematura dos camundongos 48 horas após o nascimento (109), indicando não ser um modelo apropriado para a análise do iBAT.

Apesar de reduzir o peso corporal na LFD, a deleção de *Tsc1* não preveniu a obesidade induzida pela HFD. A ativação constitutiva de mTORC1 reduziu a gordura visceral, mas ao mesmo tempo aumentou a massa de tecido adiposo marrom e subcutâneo quando os animais foram alimentados com HFD. Diferentemente da dieta *chow*, a deleção de *Tsc1* aumentou a expressão de RNAm de subunidades da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial apenas no rWAT quando os animais foram alimentados com LFD ou HFD. Como a atividade oxidativa mitocondrial por si

não é suficiente para reduzir a adiposidade (103) e não foi detectado RNAm de UCP-1 no tecido adiposo dos animais alimentados com HFD, ainda é desconhecida a causa de menor adiposidade visceral pela deleção de *Tsc1* na obesidade induzida por dieta. A ativação constitutiva de mTORC1 induz então *browning* no rWAT dependentemente da dieta, o que pode sugerir o recrutamento de progenitores de adipócitos bipotenciais, que expressam o receptor do fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGFR) α (111). Esses progenitores podem se diferenciar em ambos adipócitos brancos ou beges, dependendo se são estimulados com HFD ou ativação β -adrenérgica, respectivamente (111). Embora estas células tenham sido encontradas apenas no tecido adiposo visceral no estudo acima citado (111), posteriormente um grupo observou que todos os precursores de adipócitos brancos expressam PDGFR α (112), dificultando possíveis conclusões no presente estudo.

Associada à menor adiposidade visceral, os animais ATscKO apresentaram melhora na tolerância à glicose e aumento da sinalização da insulina no fígado e no músculo, demonstrado pelo maior conteúdo de pS473AKT e pT308AKT. Entretanto, esta maior tolerância à glicose foi somente observada quando os animais foram alimentados com LFD e HFD, mas não com a dieta *chow*. De alguma forma, a LFD e a HFD induziram certa intolerância à glicose nos animais ATscWT comparado à dieta *chow* (o pico da glicemia foi de ~11 mM na *chow* vs ~15 mM na LFD e ~20 mM na HFD), a qual foi prevenida pela deleção de *Tsc1*. Os mecanismos pelos quais a deleção de *Tsc1* protege contra a intolerância à glicose e melhora a sinalização de insulina hepática e muscular não foram determinados, mas podem estar relacionados à maior concentração sérica de adiponectina, uma adipocina cuja secreção é estimulada por mTORC1 (113) e conhecida por inibir a gliconeogênese hepática (114, 115) e estimular a captação de glicose periférica (116).

Por fim, há dois aspectos a serem levados em consideração, entretanto, ao interpretar os resultados deste estudo. O primeiro deles diz respeito ao uso da deleção de *Tsc1* como meio de promover a ativação constitutiva de mTORC1. Embora a perda de função de TSC seja uma forma bastante utilizada para promover a ativação constitutiva de mTORC1 em diferentes tipos celulares (65, 94, 109, 117-119), dois estudos recentes demonstraram que TSC1/2 também sinaliza independentemente de mTORC1 através da quinase ativada por p21 (PAK)2 (120) e da via do fator de crescimento transformador (TGF) β -Smad2/3 (121), o que indica

que alguns dos resultados de nosso estudo possam não estar relacionados à ativação de mTORC1. No caso da indução do *browning* no rWAT, todavia, podemos com certeza afirmar ser dependente da ativação de mTORC1, visto que o tratamento com rapamicina bloqueou o aumento na expressão de UCP-1 provocado pela deleção de *Tsc1*. Um segundo aspecto importante a se considerar é o uso de fragmentos de tecido em todas as análises realizadas, onde são encontradas outras células além de adipócitos e, portanto, podem ter influenciado nos fenótipos encontrados.

6 CONCLUSÃO

Nossos achados demonstram que a ativação constitutiva de mTORC1 reduz a adiposidade visceral, apoiando a hipótese de que as ações anabólicas na adiposidade de mTORC1 não são lineares e seguem uma curva em U-invertido, onde sua super-ativação é tão inibitória para a adiposidade quanto sua inibição completa. Além disso, curiosamente, a redução na adiposidade provocada pela ativação constitutiva de mTORC1 tem como mecanismo a indução do *browning* e atividade mitocondrial oxidativa do tecido adiposo branco (Figura 23). A compreensão de como diferentes níveis de ativação de mTORC1 afeta a adiposidade e promove o *browning* pode revelar novos alvos terapêuticos e estratégias para potencialmente tratar a obesidade.

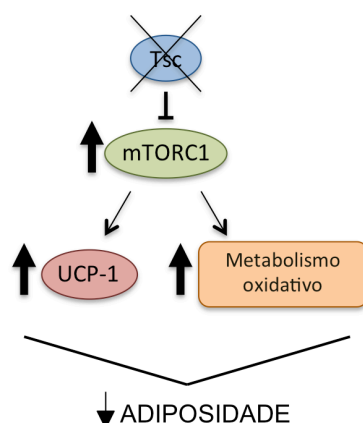


Figura 23 - **Resumo dos achados do nosso estudo.** O aumento da atividade de mTORC1 em adipócitos, provocado pela inibição do complexo TSC, induz a expressão de UCP-1 e o metabolismo oxidativo nas mitocôndrias, reduzindo a adiposidade.

REFERÊNCIAS*

1. Niswender K. Diabetes and obesity: therapeutic targeting and risk reduction - a complex interplay. *Diabetes Obes Metab.* 2010;12(4):267-87.
2. Zalesin KC, Franklin BA, Miller WM, Peterson ED, McCullough PA. Impact of obesity on cardiovascular disease. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2008;37(3):663-84, ix.
3. Ting SM, Nair H, Ching I, Taheri S, Dasgupta I. Overweight, obesity and chronic kidney disease. *Nephron Clin Pract.* 2009;112(3):c121-7; discussion c7.
4. Marchesini G, Moscatiello S, Di Domizio S, Forlani G. Obesity-associated liver disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(11 Suppl 1):S74-80.
5. Roberts DL, Dive C, Renehan AG. Biological mechanisms linking obesity and cancer risk: new perspectives. *Annu Rev Med.* 2010;61:301-16.
6. World Health Organization. Division of Noncommunicable Diseases., World Health Organization. Programme of Nutrition Family and Reproductive Health. Obesity : preventing and managing the global epidemic : report of a WHO Consultation on Obesity, Geneva, 3-5 June 1997. Geneva: World Health Organization; 1998. 276 p. p.
7. Ravussin E, Bogardus C. Energy balance and weight regulation: genetics versus environment. *Br J Nutr.* 2000;83 Suppl 1:S17-20.
8. Vernochet C, Peres SB, Farmer SR. Mechanisms of obesity and related pathologies: transcriptional control of adipose tissue development. *FEBS J.* 2009;276(20):5729-37.
9. Achike FI, To NH, Wang H, Kwan CY. Obesity, metabolic syndrome, adipocytes and vascular function: A holistic viewpoint. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2011;38(1):1-10.
10. Hausman DB, DiGirolamo M, Bartness TJ, Hausman GJ, Martin RJ. The biology of white adipocyte proliferation. *Obes Rev.* 2001;2(4):239-54.
11. Tran TT, Kahn CR. Transplantation of adipose tissue and stem cells: role in metabolism and disease. *Nature reviews Endocrinology.* 2010;6(4):195-213.

12. Solinas G, Boren J, Dulloo AG. De novo lipogenesis in metabolic homeostasis: More friend than foe? *Mol Metab.* 2015;4(5):367-77.
13. Strawford A, Antelo F, Christiansen M, Hellerstein MK. Adipose tissue triglyceride turnover, de novo lipogenesis, and cell proliferation in humans measured with 2H₂O. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2004;286(4):E577-88.
14. Voshol PJ, Rensen PC, van Dijk KW, Romijn JA, Havekes LM. Effect of plasma triglyceride metabolism on lipid storage in adipose tissue: studies using genetically engineered mouse models. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1791(6):479-85.
15. Reshef L, Olswang Y, Cassuto H, Blum B, Croniger CM, Kalhan SC, et al. Glyceroneogenesis and the triglyceride/fatty acid cycle. *J Biol Chem.* 2003;278(33):30413-6.
16. Coleman RA, Mashek DG. Mammalian triacylglycerol metabolism: synthesis, lipolysis, and signaling. *Chem Rev.* 2011;111(10):6359-86.
17. Takeuchi K, Reue K. Biochemistry, physiology, and genetics of GPAT, AGPAT, and lipin enzymes in triglyceride synthesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009;296(6):E1195-209.
18. Zechner R, Zimmermann R, Eichmann TO, Kohlwein SD, Haemmerle G, Lass A, et al. FAT SIGNALS--lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling. *Cell Metab.* 2012;15(3):279-91.
19. Houten SM, Wanders RJ. A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid beta-oxidation. *J Inher Metab Dis.* 2010;33(5):469-77.
20. Nsiah-Sefaa A, McKenzie M. Combined defects in oxidative phosphorylation and fatty acid beta-oxidation in mitochondrial disease. *Biosci Rep.* 2016;36(2).
21. Rosen ED, Spiegelman BM. What we talk about when we talk about fat. *Cell.* 2014;156(1-2):20-44.
22. Ricquier D. Uncoupling protein 1 of brown adipocytes, the only uncoupler: a historical perspective. *Frontiers in endocrinology.* 2011;2:85.
23. Wu J, Bostrom P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH, et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell.* 2012;150(2):366-76.

24. Petrovic N, Walden TB, Shabalina IG, Timmons JA, Cannon B, Nedergaard J. Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J Biol Chem*. 2010;285(10):7153-64.
25. Harms M, Seale P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat Med*. 2013;19(10):1252-63.
26. Rosenwald M, Perdikari A, Rulicke T, Wolfrum C. Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nature cell biology*. 2013;15(6):659-67.
27. Wang QA, Tao C, Gupta RK, Scherer PE. Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nat Med*. 2013;19(10):1338-44.
28. Seale P, Bjork B, Yang W, Kajimura S, Chin S, Kuang S, et al. PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature*. 2008;454(7207):961-7.
29. Sanchez-Gurmaches J, Guertin DA. Adipocytes arise from multiple lineages that are heterogeneously and dynamically distributed. *Nature communications*. 2014;5:4099.
30. Long JZ, Svensson KJ, Tsai L, Zeng X, Roh HC, Kong X, et al. A smooth muscle-like origin for beige adipocytes. *Cell Metab*. 2014;19(5):810-20.
31. Seale P, Conroe HM, Estall J, Kajimura S, Frontini A, Ishibashi J, et al. Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. *J Clin Invest*. 2011;121(1):96-105.
32. Cohen P, Levy JD, Zhang Y, Frontini A, Kolodin DP, Svensson KJ, et al. Ablation of PRDM16 and beige adipose causes metabolic dysfunction and a subcutaneous to visceral fat switch. *Cell*. 2014;156(1-2):304-16.
33. Ohno H, Shinoda K, Spiegelman BM, Kajimura S. PPARgamma agonists induce a white-to-brown fat conversion through stabilization of PRDM16 protein. *Cell Metab*. 2012;15(3):395-404.
34. Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med*. 2009;360(15):1509-17.

35. Saito M, Okamatsu-Ogura Y, Matsushita M, Watanabe K, Yoneshiro T, Nio-Kobayashi J, et al. High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity. *Diabetes*. 2009;58(7):1526-31.
36. Ouellet V, Routhier-Labadie A, Bellemare W, Lakhali-Chaieb L, Turcotte E, Carpentier AC, et al. Outdoor temperature, age, sex, body mass index, and diabetic status determine the prevalence, mass, and glucose-uptake activity of ¹⁸F-FDG-detected BAT in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(1):192-9.
37. Saito M. Brown adipose tissue as a regulator of energy expenditure and body fat in humans. *Diabetes Metab J*. 2013;37(1):22-9.
38. Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007;293(2):E444-52.
39. Cohade C, Osman M, Pannu HK, Wahl RL. Uptake in supraclavicular area fat ("USA-Fat"): description on ¹⁸F-FDG PET/CT. *J Nucl Med*. 2003;44(2):170-6.
40. Hany TF, Gharehpapagh E, Kamel EM, Buck A, Himms-Hagen J, von Schulthess GK. Brown adipose tissue: a factor to consider in symmetrical tracer uptake in the neck and upper chest region. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2002;29(10):1393-8.
41. Yeung HW, Grewal RK, Gonen M, Schoder H, Larson SM. Patterns of (¹⁸F)-FDG uptake in adipose tissue and muscle: a potential source of false-positives for PET. *J Nucl Med*. 2003;44(11):1789-96.
42. Cohen P, Spiegelman BM. Brown and Beige Fat: Molecular Parts of a Thermogenic Machine. *Diabetes*. 2015;64(7):2346-51.
43. Sengupta S, Peterson TR, Sabatini DM. Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress. *Mol Cell*. 2010;40(2):310-22.
44. Laplante M, Sabatini DM. An emerging role of mTOR in lipid biosynthesis. *Curr Biol*. 2009;19(22):R1046-52.
45. Menon S, Dibble CC, Talbott G, Hoxhaj G, Valvezan AJ, Takahashi H, et al. Spatial control of the TSC complex integrates insulin and nutrient regulation of mTORC1 at the lysosome. *Cell*. 2014;156(4):771-85.

46. Bar-Peled L, Sabatini DM. Regulation of mTORC1 by amino acids. *Trends Cell Biol.* 2014;24(7):400-6.
47. Jewell JL, Guan KL. Nutrient signaling to mTOR and cell growth. *Trends Biochem Sci.* 2013;38(5):233-42.
48. Sancak Y, Bar-Peled L, Zoncu R, Markhard AL, Nada S, Sabatini DM. Regulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell.* 2010;141(2):290-303.
49. Shimobayashi M, Hall MN. Multiple amino acid sensing inputs to mTORC1. *Cell Res.* 2016;26(1):7-20.
50. Bar-Peled L, Chantranupong L, Cherniack AD, Chen WW, Ottina KA, Grabiner BC, et al. A Tumor suppressor complex with GAP activity for the Rag GTPases that signal amino acid sufficiency to mTORC1. *Science.* 2013;340(6136):1100-6.
51. Chantranupong L, Scaria SM, Saxton RA, Gygi MP, Shen K, Wyant GA, et al. The CASTOR Proteins Are Arginine Sensors for the mTORC1 Pathway. *Cell.* 2016;165(1):153-64.
52. Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011;12(1):21-35.
53. Cafferkey R, Young PR, McLaughlin MM, Bergsma DJ, Koltin Y, Sathe GM, et al. Dominant missense mutations in a novel yeast protein related to mammalian phosphatidylinositol 3-kinase and VPS34 abrogate rapamycin cytotoxicity. *Mol Cell Biol.* 1993;13(10):6012-23.
54. Kunz J, Henriquez R, Schneider U, Deuter-Reinhard M, Movva NR, Hall MN. Target of rapamycin in yeast, TOR2, is an essential phosphatidylinositol kinase homolog required for G1 progression. *Cell.* 1993;73(3):585-96.
55. Sabers CJ, Martin MM, Brunn GJ, Williams JM, Dumont FJ, Wiederrecht G, et al. Isolation of a protein target of the FKBP12-rapamycin complex in mammalian cells. *J Biol Chem.* 1995;270(2):815-22.
56. Li J, Kim SG, Blenis J. Rapamycin: one drug, many effects. *Cell Metab.* 2014;19(3):373-9.

57. Kang SA, Pacold ME, Cervantes CL, Lim D, Lou HJ, Ottina K, et al. mTORC1 phosphorylation sites encode their sensitivity to starvation and rapamycin. *Science*. 2013;341(6144):1236-56.
58. Thoreen CC, Kang SA, Chang JW, Liu Q, Zhang J, Gao Y, et al. An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1. *J Biol Chem*. 2009;284(12):8023-32.
59. Ricoult SJ, Manning BD. The multifaceted role of mTORC1 in the control of lipid metabolism. *EMBO Rep*. 2013;14(3):242-51.
60. Yeh W, Bierer B, McKnight S. Rapamycin inhibits clonal expansion and adipogenic differentiation of 3T3-L1 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(24):11086-90.
61. Gagnon A, Lau S, Sorisky A. Rapamycin-sensitive phase of 3T3-L1 preadipocyte differentiation after clonal expansion. *J Cell Physiol*. 2001;189(1):14-22.
62. Cho HJ, Park J, Lee HW, Lee YS, Kim JB. Regulation of adipocyte differentiation and insulin action with rapamycin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;321(4):942-8.
63. Kim JE, Chen J. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity by mammalian target of rapamycin and amino acids in adipogenesis. *Diabetes*. 2004;53(11):2748-56.
64. Zhang HH, Huang J, Duvel K, Boback B, Wu S, Squillace RM, et al. Insulin stimulates adipogenesis through the Akt-TSC2-mTORC1 pathway. *PLoS One*. 2009;4(7):e6189.
65. Duvel K, Yecies JL, Menon S, Raman P, Lipovsky AI, Souza AL, et al. Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Mol Cell*. 2010;39(2):171-83.
66. Um SH, Frigerio F, Watanabe M, Picard F, Joaquin M, Sticker M, et al. Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature*. 2004;431(7005):200-5.
67. Le Bacquer O, Petroulakis E, Pagliarunga S, Poulin F, Richard D, Cianflone K, et al. Elevated sensitivity to diet-induced obesity and insulin resistance in mice lacking 4E-BP1 and 4E-BP2. *J Clin Invest*. 2007;117(2):387-96.

68. Polak P, Cybulski N, Feige JN, Auwerx J, Ruegg MA, Hall MN. Adipose-specific knockout of raptor results in lean mice with enhanced mitochondrial respiration. *Cell Metab.* 2008;8(5):399-410.
69. Houde VP, Brule S, Festuccia WT, Blanchard PG, Bellmann K, Deshaies Y, et al. Chronic rapamycin treatment causes glucose intolerance and hyperlipidemia by upregulating hepatic gluconeogenesis and impairing lipid deposition in adipose tissue. *Diabetes.* 2010;59(6):1338-48.
70. Laplante M, Horvat S, Festuccia WT, Birsoy K, Prevorsek Z, Efeyan A, et al. DEPTOR cell-autonomously promotes adipogenesis, and its expression is associated with obesity. *Cell Metab.* 2012;16(2):202-12.
71. Yoon MS, Zhang C, Sun Y, Schoenherr CJ, Chen J. Mechanistic target of rapamycin controls homeostasis of adipogenesis. *J Lipid Res.* 2013;54(8):2166-73.
72. Sun J, Huang YR, Harrington WR, Sheng S, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS. Antagonists selective for estrogen receptor alpha. *Endocrinology.* 2002;143(3):941-7.
73. Festuccia WT, Blanchard PG, Belchior T, Chimin P, Paschoal VA, Magdalon J, et al. PPARgamma activation attenuates glucose intolerance induced by mTOR inhibition with rapamycin in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2014;306(9):E1046-54.
74. Michalek RD, Gerriets VA, Nichols AG, Inoue M, Kazmin D, Chang CY, et al. Estrogen-related receptor-alpha is a metabolic regulator of effector T-cell activation and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(45):18348-53.
75. Chan KK, Leung TH, Chan DW, Wei N, Lau GT, Liu SS, et al. Targeting estrogen receptor subtypes (ERalpha and ERbeta) with selective ER modulators in ovarian cancer. *J Endocrinol.* 2014;221(2):325-36.
76. Belchior T, Paschoal VA, Magdalon J, Chimin P, Farias TM, Chaves-Filho AB, et al. Omega-3 fatty acids protect from diet-induced obesity, glucose intolerance, and adipose tissue inflammation through PPARgamma-dependent and PPARgamma-independent actions. *Mol Nutr Food Res.* 2015;59(5):957-67.
77. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem.* 1957;226(1):497-509.

78. Festuccia WT, Blanchard PG, Turcotte V, Laplante M, Sariahmetoglu M, Brindley DN, et al. Depot-specific effects of the PPARgamma agonist rosiglitazone on adipose tissue glucose uptake and metabolism. *J Lipid Res.* 2009;50(6):1185-94.
79. Botion LM, Brito MN, Brito NA, Brito SR, Kettelhut IC, Migliorini RH. Glucose contribution to in vivo synthesis of glyceride-glycerol and fatty acids in rats adapted to a high-protein, carbohydrate-free diet. *Metabolism.* 1998;47(10):1217-21.
80. Kim MJ, Jardel C, Barthelemy C, Jan V, Bastard JP, Fillaut-Chapin S, et al. Mitochondrial DNA content, an inaccurate biomarker of mitochondrial alteration in human immunodeficiency virus-related lipodystrophy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(5):1670-6.
81. Larsen S, Nielsen J, Hansen CN, Nielsen LB, Wibrand F, Stride N, et al. Biomarkers of mitochondrial content in skeletal muscle of healthy young human subjects. *J Physiol.* 2012;590(14):3349-60.
82. Chausse B, Vieira-Lara MA, Sanchez AB, Medeiros MH, Kowaltowski AJ. Intermittent fasting results in tissue-specific changes in bioenergetics and redox state. *PLoS One.* 2015;10(3):e0120413.
83. Spinazzi M, Casarin A, Pertegato V, Salviati L, Angelini C. Assessment of mitochondrial respiratory chain enzymatic activities on tissues and cultured cells. *Nat Protoc.* 2012;7(6):1235-46.
84. Hutter E, Unterluggauer H, Garedew A, Jansen-Durr P, Gnaiger E. High-resolution respirometry--a modern tool in aging research. *Exp Gerontol.* 2006;41(1):103-9.
85. Schieke SM, Phillips D, McCoy JP, Jr., Aponte AM, Shen RF, Balaban RS, et al. The mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway regulates mitochondrial oxygen consumption and oxidative capacity. *J Biol Chem.* 2006;281(37):27643-52.
86. Liu B, Qian SB. Translational regulation in nutrigenomics. *Adv Nutr.* 2011;2(6):511-9.
87. Yamnik RL, Holz MK. mTOR/S6K1 and MAPK/RSK signaling pathways coordinately regulate estrogen receptor alpha serine 167 phosphorylation. *FEBS Lett.* 2010;584(1):124-8.
88. Chaveroux C, Eichner LJ, Dufour CR, Shatnawi A, Khoutorsky A, Bourque G, et al. Molecular and genetic crosstalks between mTOR and ERalpha are key

determinants of rapamycin-induced nonalcoholic fatty liver. *Cell Metab.* 2013;17(4):586-98.

89. Heine PA, Taylor JA, Iwamoto GA, Lubahn DB, Cooke PS. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor- α knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(23):12729-34.

90. Debevec D, Christian M, Morganstein D, Seth A, Herzog B, Parker M, et al. Receptor interacting protein 140 regulates expression of uncoupling protein 1 in adipocytes through specific peroxisome proliferator activated receptor isoforms and estrogen-related receptor α . *Mol Endocrinol.* 2007;21(7):1581-92.

91. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell.* 2012;149(2):274-93.

92. Singh R, Xiang Y, Wang Y, Baikati K, Cuervo AM, Luu YK, et al. Autophagy regulates adipose mass and differentiation in mice. *J Clin Invest.* 2009;119(11):3329-39.

93. Calabrese EJ, Baldwin LA. U-shaped dose-responses in biology, toxicology, and public health. *Annu Rev Public Health.* 2001;22:15-33.

94. Kenerson HL, Yeh MM, Yeung RS. Tuberous sclerosis complex-1 deficiency attenuates diet-induced hepatic lipid accumulation. *PLoS One.* 2011;6(3):e18075.

95. Yecies JL, Zhang HH, Menon S, Liu S, Yecies D, Lipovsky AI, et al. Akt stimulates hepatic SREBP1c and lipogenesis through parallel mTORC1-dependent and independent pathways. *Cell Metab.* 2011;14(1):21-32.

96. Chakrabarti P, English T, Shi J, Smas CM, Kandror KV. Mammalian target of rapamycin complex 1 suppresses lipolysis, stimulates lipogenesis, and promotes fat storage. *Diabetes.* 2010;59(4):775-81.

97. Chakrabarti P, Anno T, Manning BD, Luo Z, Kandror KV. The mammalian target of rapamycin complex 1 regulates leptin biosynthesis in adipocytes at the level of translation: the role of the 5'-untranslated region in the expression of leptin messenger ribonucleic acid. *Mol Endocrinol.* 2008;22(10):2260-7.

98. Caron A, Richard D, Laplante M. The Roles of mTOR Complexes in Lipid Metabolism. *Annu Rev Nutr.* 2015;35:321-48.

99. Cunningham JT, Rodgers JT, Arlow DH, Vazquez F, Mootha VK, Puigserver P. mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1alpha transcriptional complex. *Nature*. 2007;450(7170):736-40.
100. Morita M, Gravel SP, Chenard V, Sikstrom K, Zheng L, Alain T, et al. mTORC1 controls mitochondrial activity and biogenesis through 4E-BP-dependent translational regulation. *Cell Metab*. 2013;18(5):698-711.
101. Fan W, Evans R. PPARs and ERRs: molecular mediators of mitochondrial metabolism. *Curr Opin Cell Biol*. 2015;33:49-54.
102. Handschin C, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 coactivators, energy homeostasis, and metabolism. *Endocr Rev*. 2006;27(7):728-35.
103. Hoehn KL, Turner N, Swarbrick MM, Wilks D, Preston E, Phua Y, et al. Acute or chronic upregulation of mitochondrial fatty acid oxidation has no net effect on whole-body energy expenditure or adiposity. *Cell Metab*. 2010;11(1):70-6.
104. Karamanlidis G, Karamitri A, Docherty K, Hazlerigg DG, Lomax MA. C/EBPbeta reprograms white 3T3-L1 preadipocytes to a Brown adipocyte pattern of gene expression. *J Biol Chem*. 2007;282(34):24660-9.
105. Hesselbarth N, Pettinelli C, Gericke M, Berger C, Kunath A, Stumvoll M, et al. Tamoxifen affects glucose and lipid metabolism parameters, causes browning of subcutaneous adipose tissue and transient body composition changes in C57BL/6NTac mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;464(3):724-9.
106. Alayev A, Salamon RS, Berger SM, Schwartz NS, Cuesta R, Snyder RB, et al. mTORC1 directly phosphorylates and activates ERalpha upon estrogen stimulation. *Oncogene*. 2015.
107. Tran CM, Mukherjee S, Ye L, Frederick DW, Kissig M, Davis JG, et al. Rapamycin Blocks Induction of the Thermogenic Program in White Adipose Tissue. *Diabetes*. 2016;65(4):927-41.
108. Liu D, Bordicchia M, Zhang C, Fang H, Wei W, Li JL, et al. Activation of mTORC1 is essential for beta-adrenergic stimulation of adipose browning. *J Clin Invest*. 2016;126(5):1704-16.
109. Xiang X, Lan H, Tang H, Yuan F, Xu Y, Zhao J, et al. Tuberous sclerosis complex 1-mechanistic target of rapamycin complex 1 signaling determines brown-to-white adipocyte phenotypic switch. *Diabetes*. 2015;64(2):519-28.

110. Lee KY, Russell SJ, Ussar S, Boucher J, Vernochet C, Mori MA, et al. Lessons on conditional gene targeting in mouse adipose tissue. *Diabetes*. 2013;62(3):864-74.
111. Lee YH, Petkova AP, Mottillo EP, Granneman JG. In vivo identification of bipotential adipocyte progenitors recruited by beta3-adrenoceptor activation and high-fat feeding. *Cell Metab*. 2012;15(4):480-91.
112. Berry R, Rodeheffer MS. Characterization of the adipocyte cellular lineage in vivo. *Nature cell biology*. 2013;15(3):302-8.
113. Blumer RM, van Roomen CP, Meijer AJ, Houben-Weerts JH, Sauerwein HP, Dubbelhuis PF. Regulation of adiponectin secretion by insulin and amino acids in 3T3-L1 adipocytes. *Metabolism*. 2008;57(12):1655-62.
114. Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE. The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med*. 2001;7(8):947-53.
115. Combs TP, Berg AH, Obici S, Scherer PE, Rossetti L. Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. *J Clin Invest*. 2001;108(12):1875-81.
116. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med*. 2002;8(11):1288-95.
117. Ozcan U, Ozcan L, Yilmaz E, Düvel K, Sahin M, Manning BD, et al. Loss of the tuberous sclerosis complex tumor suppressors triggers the unfolded protein response to regulate insulin signaling and apoptosis. *Mol Cell*. 2008;29(5):541-51.
118. Cornu M, Oppliger W, Albert V, Robitaille AM, Trapani F, Quagliata L, et al. Hepatic mTORC1 controls locomotor activity, body temperature, and lipid metabolism through FGF21. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(32):11592-9.
119. Taneike M, Nishida K, Omiya S, Zarrinpashneh E, Misaka T, Kitazume-Taneike R, et al. mTOR Hyperactivation by Ablation of Tuberous Sclerosis Complex 2 in the Mouse Heart Induces Cardiac Dysfunction with the Increased Number of Small Mitochondria Mediated through the Down-Regulation of Autophagy. *PLoS One*. 2016;11(3).
120. Alves MM, Fuhler GM, Queiroz KC, Scholma J, Goorden S, Anink J, et al. PAK2 is an effector of TSC1/2 signaling independent of mTOR and a potential therapeutic target for Tuberous Sclerosis Complex. *Sci Rep*. 2015;5:14534.

121. Thien A, Prentzell MT, Holzwarth B, Klasener K, Kuper I, Boehlke C, et al. TSC1 activates TGF-beta-Smad2/3 signaling in growth arrest and epithelial-to-mesenchymal transition. *Dev Cell*. 2015;32(5):617-30.