

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR E BIOAGENTES  
PATOGENICOS

PAULO HENRIQUE CAVALCANTI DE ARAÚJO

A via de sinalização RANK-RANKL-OPG na dinâmica mitocondrial e *switch* de fibras  
no músculo esquelético

Ribeirão Preto  
2022

PAULO HENRIQUE CAVALCANTI DE ARAÚJO

A via de sinalização RANK-RANKL-OPG na dinâmica mitocondrial e *switch* de fibras  
no músculo esquelético

Tese apresentada à Faculdade de Medicina  
de Ribeirão Preto da Universidade de São  
Paulo para obtenção do título de Doutor em  
Ciências

Área de concentração: Biologia Celular e  
Molecular

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mariana Kiomy Osako

Ribeirão Preto

2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Araújo, Paulo Henrique Cavalcanti de.

A via de sinalização RANK-RANKL-OPG na dinâmica mitocondrial e switch de fibras no músculo esquelético. Ribeirão Preto, 2022.

136 p : il.; 30 cm

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Mariana Kiomy Osako

1. Sistema RANK-RANKL-OPG.
2. Unidade osso-músculo.
3. Músculo esquelético.
4. Mitocôndria;
5. *Switch* de fibras.

ARAUJO, P. H. C. **A via de sinalização RANK-RANKL-OPG na dinâmica mitocondrial e switch de fibras no músculo esquelético.** 2022. 136 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2022.

Aprovado em: \_\_\_\_\_

Banca examinadora:

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

**Dedico este trabalho:**

Aos meus Pais, Paulo Gomes e Rosimere Cavalcanti, por me incentivarem a sempre lutar pelos meus sonhos.

À minha esposa, Lays Trajano, pelo companheirismo e incentivo nos momentos mais importantes.

## AGRADECIMENTOS

*À Profa Dr<sup>a</sup> Mariana Kiomy Osako,*

pela receptividade e confiança ao me aceitar em seu laboratório, por todos os ensinamentos profissionais e pessoais. Agradeço imensamente a todas experiências vividas ao longo desses seis anos, sempre buscando o melhor de cada um e proporcionando um ambiente de crescimento para todos e que foi essencial para o meu crescimento.

*Ao Departamento de Biologia Celular e Molecular,*

pela disponibilidade da infra-estrutura em laboratórios parceiros, permitiu a realização de diversas etapas do projeto.

*Ao corpo técnico,*

pelo apoio especializado e, especialmente à Silvia, Vani, Roberta, Tânia por serem extremamente solícitos mediante qualquer dúvida ou necessidade.

*À agência de fomento,*

Ao CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil, pela bolsa de estudo concedida para a realização deste trabalho, e à FAPESP, CAPES e FAEPA pelo suporte financeiro ao desenvolvimento de diversas etapas do projeto.

*À Profa Dra Luciane Alberici e Dr. Anderson Vulczak,*

Por aceitarem a colaboração com os experimentos bioquímicos de respiração tecidual e sempre contribuírem com discussões ricas que ajudaram a construir um novo olhar sobre nosso projeto.

*Aos amigos do RANKLab,*

Todos foram muito importantes, desde a primeira geração, quando crescemos juntos e dividimos momentos inesquecíveis dentro e fora do laboratório. Por todas as discussões, sanduíches e momentos de confraternização que nos unia ainda mais. De uma maneira especial, à Flávia e Ryerson, por termos formados o primeiro grupo de pós graduandos do laboratório e compartilhado tantas experiências durante este período, inúmeras risadas, viagens e conversas que levarei comigo para sempre. Agradeço também aos mais novos integrantes, à Madu e Júlia, que talvez nem imaginem o quanto foram importantes na minha formação como pessoa e profissional, com quem pude perceber que de fato, aprendemos algo quando conseguimos ensinar para alguém; por isso, espero ter contribuído um pouco na formação de vocês e estarei sempre torcendo e vibrando muito com cada conquista de vocês. Agradeço também à Bia, pela parceria em experimentos e conversas que deixaram ensinamentos que levarei comigo.

*Aos amigos do Taste Made,*

Felipe, Andréia, Luíz e Karol, que formaram nossa família em Ribeirão Preto e tornaram esse período na cidade muito mais divertido e leve. Com vocês pude aprender a enxergar a vida com outros olhos e entender que as experiências que vivemos e o que construímos como pessoa tem um valor incalculável. Muito obrigado por todo apoio ao longo desses anos, por todos os churrascos, jantares, viagens e confraternizações que pudemos fazer, não mudaria em nada o que fizemos.

*Aos grandes amigos da vida,*

De forma especial aqueles em Recife, Flávio, Diego, Igor, Lili, Mayra, Bianca, Erwelly, Débora, Mary, João, Leylla, Vinicius e Wadja que, apesar de estarem distantes fisicamente, agradeço imensamente pela amizade, apoio e momentos de descontração quando nos encontramos e que são fundamentais para tornar a vida mais leve e fácil.

*A minha segunda família,*

Paula, João, Eduardo, Orlando e Luana, que sempre me acolheram e incentivaram ao longo desses anos. Agradeço imensamente a oportunidade de poder compartilhar bons momentos ao lado de vocês.

*Aos meus tios e primos,*

Rosa Maria, Fabriano, Felipe e Gustavo, que talvez nem imaginem o quanto o apoio e alegria nos nossos reencontros ajudou a me fortalecer nesse período longe.

*A minha família,*

por todo o incentivo de uma história que começou a ser construída ainda na infância e reforçada durante toda a vida, com a qual eu aprendi que o nosso maior bem é o que estudamos e aprendemos. Agradeço muito a toda dedicação de uma vida dos meus pais, Paulo e Rosimere, que sempre buscaram as melhores oportunidades e transmitiram ensinamentos que vão muito além do que podemos encontrar em qualquer sala de aula. Agradeço também ao meu irmão Pedro, com quem partilho vários sonhos, inclusive este. Apesar da distância física, a demonstração de apoio e alegria com cada pequena conquista foi essencial para continuar e realizar mais esse sonho com e por vocês. A nossa união é o combustível que alimenta a alma.

*A minha esposa,*

Lays Trajano, minha grande parceira, incentivadora, uma mulher de fibra com quem tenho muito orgulho em dividir todas as emoções, especialmente desta trajetória acadêmica, que iniciamos juntos na graduação e seguimos trilhando juntos na pós-graduação. Seu apoio durante todos esses anos foi fundamental para que eu conseguisse seguir em frente e avançar em cada passo. Agradeço imensamente por dividir todas essas experiências com você, todos os dias aprendo algo novo e admiro muito sua determinação e capacidade de inspirar quem convive com você e sei que continuaremos firmes em busca dos nossos sonhos. Te amo!

*A Deus,*

energias positivas e orações que me mantiveram firmes nesta caminhada em que pude viver experiências incríveis e de grande aprendizado pessoal e profissional.

*A todos,*

que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento desse projeto.



*“Tudo que já foi, é o começo do que vai vir, toda a hora a gente está num cômputo”*

*Grande Sertão: Veredas.*

*Guimarães Rosa.*

## RESUMO

ARAÚJO, P.H.C. **A via de sinalização RANK-RANKL-OPG na dinâmica mitocondrial e *switch* de fibras no músculo esquelético.** 2022. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2022.

A unidade osso-músculo refere-se à interação mecânica entre o tecido ósseo e muscular e a intercomunicação através de fatores solúveis que regulam o metabolismo de ambos de forma recíproca. O sistema RANK-RANKL-OPG é classicamente descrito na ativação de osteoclastos, e RANKL e OPG são exemplos de osteocinas. Entretanto, a contribuição deste sistema na fibra muscular saudável ainda necessita de maiores elucidações. Recentemente, nosso grupo demonstrou o papel da sinalização RANK-RANKL no aumento do retículo mitocondrial, gasto energético e diferenciação de adipócitos bege. O tecido muscular esquelético apresenta altos níveis de expressão de RANK, que é fundamental para a regulação da atividade do retículo sarcoplasmático. Dessa forma, a hipótese deste trabalho é que a sinalização RANK-RANKL aumenta a biogênese mitocondrial e contribui para a conversão das fibras para o perfil oxidativo. Os experimentos foram realizados em camundongos machos com 8 semanas de idade das linhagens C57BL/6J (selvagem), linhagem B6.129S4-Tnfrsf11b tm1Eac/J homozigoto *knockout* para proteína osteoprotegerina (OPG<sup>-/-</sup>) e heterozigotos para expressão de OPG (OPG<sup>+/-</sup>). Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FMRP/USP (CONCEA nº 0069/2020). A linhagem de mioblastos C2C12 diferenciada em miotubos foi utilizada nos ensaios *in vitro*. O sóleo de animais OPG<sup>-/-</sup> apresentou elevadas taxas de consumo de oxigênio quando comparado ao tecido de animais OPG<sup>+/-</sup> que, por sua vez, também apresentou valores maiores em relação ao selvagem, indicando o efeito do aumento de RANKL circulante na capacidade de respiração muscular. Miotubos da linhagem C2C12 estimulados com RANKL demonstram maior expressão de marcadores mitocondriais como ATP sintase, Citrato sintase, NRF-2, MFN-2 e OPA-1 quantificados por RT-qPCR, além de aumento do DNA mitocondrial, maior atividade de elementos responsivos a PPARs (PPRE) no ensaio de luciferase e aumento na marcação com Mitotracker<sup>®</sup>. O estímulo com RANKL induz a ativação das vias de sinalização ERK, p38 e CREB, que são associadas à adaptação metabólica, biogênese mitocondrial e metabolismo oxidativo. Miotubos estimulados com RANKL apresentaram maior capacidade respiratória de reserva (*spare*), sugerindo a potencial de adaptação dessas células ao aumento na demanda energética. A análise por RNA-Seq também demonstrou que miotubos estimulados com RANKL apresentam enriquecimento da via sinalização de ERK, assim como respostas envolvendo o remodelamento da matriz extracelular, homeostase da sinalização de cálcio e

regulação de fatores de crescimento endotelial vascular, que são fundamentais na adaptação a atividades que aumentam a demanda metabólica. Camundongos selvagens que receberam infusão de RANKL também apresentaram aumento nas taxas de respiração do sóleo. As análises histológicas revelaram fibras com menor área seccional, aumento da marcação com SDH e na proporção de fibras do perfil IIa no gastrocnêmio. Imagens de microscopia eletrônica mostram o aumento no número de mitocôndrias. Os animais tratados com RANKL e submetidos a atividade física por 21 dias também apresentaram maior marcação de SDH nas fibras do gastrocnêmio comparado ao grupo não tratado e exercitado. Dessa forma, os resultados indicam que RANKL aumenta a biogênese mitocondrial e conversão dos tipos de fibras, proporcionando novas abordagens sobre a comunicação osso-músculo em um contexto de tecido saudável.

Palavras-chave: Sistema RANK-RANKL-OPG. Unidade osso-músculo. Músculo esquelético. Mitocôndria, *Switch* de fibras.

## ABSTRACT

ARAÚJO, P.H.C **RANK-RANKL-OPG signaling in mitochondrial biogenesis and fiber switch in skeletal muscle.** 2022. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2022.

The operational unit bone-muscle refers to the mechanical interaction between bone and muscle and the communication via soluble factors that reciprocally regulate their metabolism. RANK-RANKL-OPG system is classically described on osteoclast activation, and RANKL (receptor activator of NFκB ligand) and OPG (osteoprotegerin) are examples of osteokynes. However, the contribution of this system in healthy skeletal muscle fiber is unclear. Recently, our group described the role of RANK-RANKL activation in increasing mitochondrial reticulum, energy expenditure, and beige adipocyte differentiation. Skeletal muscle shows high levels of RANK expression, which is fundamental to sarcoplasmic reticulum activity. Thus, we hypothesize that RANK-RANKL signaling improves mitochondrial biogenesis and contributes to skeletal muscle fiber switch to an oxidative profile. The experiments were performed in 8-week-old male mice of C57BL/6J strain (wild-type), B6.129S4-Tnfrsf11b tm1Eac/J homozygous knockout to osteoprotegerin (OPG<sup>-/-</sup>), and heterozygous to osteoprotegerin expression (OPG<sup>+/-</sup>). All *in vivo* experiments were approved by Ethical Principles in Animal Research (CONCEA n° 0069/2020). C2C12 myoblast lineage differentiated into myotubes was used *in vitro* assays. Soleus of OPG<sup>-/-</sup> mice showed higher oxygen consumption rates than the OPG<sup>+/-</sup> group, which, in turn, also showed higher values than WT group, indicating the effect of high serum level of RANKL on skeletal muscle respiratory capacity. Myotubes from C2C12 lineage stimulated with RANKL presented higher expression of mitochondrial markers such as ATP synthase, Citrate synthase, NRF-2, MFN-2, and OPA-1 quantified by RT-qPCR, in addition to the increase of mitochondrial DNA, higher activity of responsive element of PPARs (PPRE) and Mitotracker<sup>®</sup> staining. RANKL stimuli activate ERK, p38, and CREB signaling pathways associated with metabolic adaptation, mitochondrial biogenesis, and oxidative metabolism. Myotubes stimulated with RANKL showed high spare respiratory capacity, and RNA-seq analysis also demonstrated that RANKL stimuli promote the enrichment of ERK signaling pathways, responses related to extracellular matrix remodeling, calcium signaling homeostasis, and regulation of vascular endothelial growth factors, which are fundamental in adapting to activities that increase metabolic demand. Soleus from WT mice treated with RANKL showed a higher oxygen consumption rate. Cross-section area analysis revealed muscle fiber with smaller diameter, higher SDH staining, and type IIa fiber proportion on gastrocnemius. Electron

microscopy images revealed the increase of mitochondria number per area. Mice treated with RANKL and submitted to physical activity for 21 days showed higher SDH staining on gastrocnemius fibers compared to the non-treated and exercised group. In summary, these data indicate that RANKL improves mitochondrial biogenesis and fiber switch to an oxidative profile and provides new insights in bone-muscle communication in the healthy muscle fiber.

Keywords: RANK-RANK-OPG system. Bone-muscle unit. Skeletal muscle. Mitochondria, Fiber switch.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b>	Esquema de diferenciação do músculo esquelético in vitro.	30
<b>Figura 2</b>	Via clássica de ativação do NF- $\kappa$ B	41
<b>Figura 3</b>	Busca com o termo “musculoskeletal interaction” na plataforma PubMed em janeiro de 2022.	48
<b>Figura 4</b>	Representação do processo da sinalização RANK/RANKL/OPG, internalização e degradação via lisossomal e proteassomal do complexo OPG/RANKL.	53
<b>Figura 5</b>	Representação do monitoramento em tempo real das taxas de respiração no equipamento Oxygraph-2k.	59
<b>Figura 6</b>	Análise do impacto da hiperativação do eixo RANK-RANKL no consumo de oxigênio do tecido muscular esquelético.	71
<b>Figura 7</b>	Análise da expressão gênica de marcadores mitocondriais e inflamatórios em miotubos estimulados com RANKL.	72
<b>Figura 8</b>	Ensaio de luciferase para detecção da ativação de elementos responsivos a PPAR (PPRE) em miotubos da linhagem C2C12.	74
<b>Figura 9</b>	Análise da expressão gênica de PGC-1 $\alpha$ em miotubos derivados da linhagem C2C12.	74
<b>Figura 10</b>	Análise do conteúdo mitocondrial através da marcação com a sonda fluorescente Mitotracker <sup>®</sup> .	75
<b>Figura 11</b>	Análise da expressão relativa de mtDNA/nDNA em miotubos estimulados com RANKL.	76
<b>Figura 12</b>	Análise da ativação do eixo MAPK-ERK e CREB em miotubos da linhagem C2C12.	77
<b>Figura 13</b>	Análise do padrão de respostas do kit XF Cell Mito Stress – Agilent.	78

<b>Figura 14</b>	Análise das taxas de consumo de oxigênio em miotubos derivados da linhagem C2C12	79
<b>Figura 15</b>	Análise dos genes diferencialmente expressos entre miotubos da linhagem C2C12 controle e estimulados com RANKL.	80
<b>Figura 16</b>	Análise do ganho de peso e ingestão calórica nos camundongos ao longo de 28 dias com a implantação da mimibomba osmótica ( <i>pump</i> ).	83
<b>Figura 17</b>	Análise da infusão de RANKL nas taxas de consumo de oxigênio em músculos de camundongos.	84
<b>Figura 18</b>	Análise histológica do gastrocnêmio e sóleo corados por Hematoxilina & Eosina.	85
<b>Figura 19</b>	Quantificação sérica de IL-1 $\beta$ e IL6 em camundongos	87
<b>Figura 20</b>	Análise da expressão das isoformas da cadeia de miosina por imunofluorescência.	88
<b>Figura 21</b>	Efeito do tratamento de RANKL na atividade de enzimas mitocondriais.	89
<b>Figura 22</b>	Microscopia eletrônica de transmissão.	90
<b>Figura 23</b>	Análise da distância percorrida e velocidade máxima alcançada	92
<b>Figura 24</b>	Análise da coloração por atividade da SDH em animais treinados.	94

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

<b>Tabela 1</b>	Isoformas de proteínas acessórias aos filamentos de actina e miosina	36
<b>Tabela 2</b>	Condições de treinamento dos camundongos	61
<b>Tabela 3</b>	Sequência dos primers utilizados no estudo.	63
<b>Tabela 4</b>	Sequência dos primers utilizados para a quantificação da razão mtDNA/nDNA	67
<b>Quadro 1</b>	Diretrizes para desenho dos primers.	62



## LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Adenosina Difosfato
AKT	<i>Protein Kinase B</i>
ALP	<i>Alkaline Phosphatase</i>
AMP	Adenosina Monofosfato
AMPK	Proteína-quinase ativada por AMP
ATF-2	<i>Activating Transcription Factor 2</i>
ATP	Adenosina Trifosfato
BAFF	Fatores Ativadores de Células B
BMP6	<i>Bone Morphogenetic Protein 6</i>
BMP-2	<i>Bone Morphogenetic Protein-2</i>
BDNF	<i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i>
CCCP	<i>Carbonylcyanide-m-Chlorophenylhydrazone</i>
CDK4	<i>Cyclin Dependent Kinase 4</i>
cDNA	DNA complementar ( <i>Complementary DNA</i> )
cIAP	<i>Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein</i>
Col1	<i>Type I Collagen</i>
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
CS	Célula-satélite
DC	Célula Dendrítica
DEG	<i>Differentially Expressed Genes</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>

DMP1	<i>Dentin Matrix Protein-1</i>
DMP-1	<i>Dentin Matrix Protein 1</i>
Drp1	<i>Dynamin-Related Protein-1</i>
ERKs	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FCCP	Carbonil Cianida 4-Trifluorometoxifenilhidrazona
FGF-2	<i>Fibroblast Growth Factor-2</i>
FGF23	<i>Fibroblast Growth Factor-23</i>
FGFR1	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor-1</i>
Fis1	<i>Mitochondrial Fission Protein 1</i>
FNDC5	<i>Fibronectin type III domain-containing protein 5</i>
FNIII	<i>Fibronectin Type III Domain</i>
FRCP2	<i>Fibronectin Type III Repeat Containing Protein</i>
GAG	Glicosaminoglicano
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
GGCX	<i>c-Glutamyl Carboxylase</i>
GLA	Ácido Glutâmico
GLP1	<i>Glucagon-Like Peptide 1</i>
GLUT4	<i>Glucose Transporter Type 4</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GSK	<i>Glycogen Synthase Kinase</i>
HSL	<i>Hormone-Sensitive Lipase</i>

IFN- $\gamma$	Interferon gama
I $\kappa$ B	<i>Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor</i>
I $\kappa$ B $\alpha$	<i>Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha</i>
IKK	<i>Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase</i>
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível ( <i>Inducible nitric oxide synthase</i> )
IRAK1	<i>Interleukin receptor associated kinase-1</i>
IRAK6	<i>Interleukin receptor associated kinase-6</i>
JNKs	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
JNM	Junções neuromusculares
LPS	Lipopolissacarídeo
LRP5/6	<i>Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 5/6</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MAPK ERK – Egr1	<i>MAPK-ERK-early growth response 1</i>
M-CSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
MEC	Matriz Extracelular
MEF-2	<i>Myocyte Enhancer Factor-2</i>
MFF	<i>Mitochondrial Fission Factor</i>
MFN-2	Mitofusina-2
MHC	<i>Myosin Heavy Chain</i>

MME	Membrana Mitocondrial Externa
MMI	Membrana Mitocondrial Interna
MMP7	Metalopeptidase de matriz – 4 <i>Matrix metalloproteinase-7</i>
mRNA	RNA mensageiro ( <i>Messenger RNA</i> )
MyBPC	<i>Myosin Binding Protein</i>
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response 88</i>
MYF5	<i>Myogenic Factor 5</i>
MyoD	<i>Myogenic Differentiation</i>
MyoG	<i>Myogenin</i>
MyoG	<i>Myogenin</i>
NFATc1/2	<i>Nuclear factor of activated T-cells 1/2</i>
NFκB	<i>Nuclear Factor kappa B</i>
NIK	<i>NF-κB Inducing Kinase</i>
OB	Osteoblasto
OC	Osteoclasto
OCN	Osteocalcina
ODF	<i>Osteoclast differentiation factor</i>
OPA-1	<i>Optic Atrophy Type 1</i>
OPG	Osteoprotegerina
OXPHOS	Fosforilação oxidativa
p38	<i>p38 mitogen-activated protein kinases</i>
PAX-3	<i>Paired Box Transcription Factor-3</i>

PAX-7	<i>Paired Box Transcription Factor-7</i>
PDGF-BB	<i>Platelet-derived growth factor-BB</i>
PEP	<i>Peroxisomal Protein</i>
PGC-1 $\alpha$	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor <math>\gamma</math> Coactivator 1<math>\alpha</math></i>
PHEX	<i>Phosphate-Regulating Gene With Homologies To Endopeptidases</i>
PI3K	<i>Fosfoinosítídeo 3-Quinase</i>
PPARs	Fator de transcrição mestre peroxissoma
PPAR $\alpha$	Fator de transcrição mestre peroxissoma-alfa
PPAR $\beta/\delta$	Fator de transcrição mestre peroxissoma-beta/delta
PPAR $\gamma$	Fator de transcrição mestre peroxissoma-gamma
PTH	Paratormônio
RANK	Receptor ativador de NF $\kappa$ B
RANKL	Ligante do receptor ativador de NF $\kappa$ B
Rb	Retinoblastoma
RIP	<i>Receptor-Interacting Protein Kinase</i>
RIPA	<i>Radioimmuno precipitation assay buffer</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RT-qPCR	<i>Real Time-quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
RXR	<i>Retinoid X receptor</i>
SDH	Succinato desidrogenase

SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
SOST	<i>Sclerotin</i>
TAK1	<i>TGF-B-Activated Kinase 1</i>
TLR4	<i>Toll-like receptor</i>
TNFs	<i>Tumor necrosis factor</i>
TNFS11	<i>tumor necrosis factor ligand superfamily member 11</i>
TNFSF	<i>tumor necrosis factor ligand superfamily member</i>
TNFSF11	<i>Tumor Necrosis Factor (Ligand) Superfamily, Member 11</i>
TNFSRS11B	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11b</i>
TNF- $\alpha$	<i>Tumor necrosis factor-alpha</i>
TORC	<i>Transducer of Regulated CREB-Binding Proteins</i>
TRADD	TNF receptor associated death domain
TRAF6	<i>Tumor necrosis factor receptor associated factor</i>
TRANCE	<i>Tumor necrosis factor related activation-induced cytokine</i>
TRANCER	<i>Tumor necrosis factor related activation-induced cytokine receptor</i>
TTN	Troponina
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion protein 1</i>
VEGFA	<i>Vascular Endothelial Growth Factor A</i>
VS	Vesículas Sinápticas

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>25</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>29</b>
2.1 Desenvolvimento do tecido muscular esquelético .....	29
2.2 Regeneração muscular .....	30
2.3 Estrutura do tecido muscular esquelético .....	32
2.4 Junções neuromusculares e mecanismos de contração .....	34
2.5 Tipos de fibras musculares esqueléticas .....	35
2.6 Atividade muscular e vias de sinalização .....	38
2.7 Mitocôndrias no tecido muscular esquelético .....	42
2.8 Funções endócrinas do tecido muscular esquelético .....	44
2.9 Interações na unidade osso músculo .....	48
2.10 Funções endócrinas do tecido ósseo .....	50
2.11 Sistema RANK-RANKL-OPG .....	52
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>57</b>
3.1 Objetivo geral .....	57
3.2 Objetivos específicos .....	57
<b>4. METODOLOGIA .....</b>	<b>58</b>
4.1 Linhagens de camundongos .....	58
4.2 Respiração de fibras musculares esqueléticas permeabilizadas .....	58
4.3 Implante de mini-bombas osmóticas .....	60
4.4 Teste de exercício físico .....	60
4.5 Linhagem de mioblastos murinos imortalizados C2C12 .....	61
4.6 Extração de RNA e síntese de cDNA .....	61
4.7 Análise da expressão gênica por reação em cadeia da polimerase em tempo real – RT-qPCR .....	62
4.8 Análise da expressão proteica por <i>Western Blotting</i> .....	63
4.9 Ensaio de respiração celular em miotubos da linhagem C2C12 .....	64
4.10 Análises histológicas .....	65

4.11 Ensaio de coloração por atividade enzimática da Succinil Desidrogenase (SDH) .....	65
4.12 Imunofluorescência das cadeias de miosina no tecido muscular esquelético ....	65
4.13 Microscopia eletrônica de transmissão .....	66
4.14 Extração de DNA total e Análise da taxa mtDNA/nDNA .....	66
4.15 Imunofluorescência em miotubos derivados da linhagem C2C12 .....	67
4.16 Transfecção e ensaio de Luciferase .....	67
4.17 <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA) .....	68
4.18 Análise do RNA-Seq .....	68
4.19 Análise estatística .....	69
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>70</b>
5.1 O efeito de RANKL circulante no consumo de oxigênio no tecido muscular esquelético .....	70
5.2 Efeito da sinalização de RANKL na expressão de marcadores mitocondriais em miotubos <i>in vitro</i> derivados da linhagem murina C2C12 .....	72
5.3 Análise da ativação do eixo MAPK e CREB em mioblastos da linhagem C2C12 .....	76
5.4 Efeito da sinalização do eixo RANK-RANKL na respiração celular em miotubos da linhagem C2C12 .....	78
5.5 Análise do RNA-Seq em miotubos derivados da linhagem C2C12 .....	80
5.6 A ativação de RANK-RANKL aumenta o consumo de oxigênio e induz o perfil de fibras oxidativas no músculo esquelético .....	82
5.7 Influência da atividade física em animais que receberam o tratamento com RANKL .....	93
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>95</b>
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	<b>100</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>101</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>122</b>
ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais .....	122
ANEXO B – Artigo publicado em colaboração .....	123
ANEXO C – Artigos em colaboração submetido para publicação .....	135



## 1. INTRODUÇÃO

O funcionamento fisiológico é decorrente de inúmeras comunicações entre órgãos que, apesar de funcionarem de forma extremamente especializada, dependem de uma perfeita sincronia entre si para o desempenho de suas funções e, portanto, apresentam uma interdependência por meio de diversos aspectos nutricionais e mecânicos (DROUJININE; PERRIMON, 2016). Neste contexto, a literatura descreve a forte associação entre o tecido ósseo e tecido muscular esquelético devido, principalmente, a processos envolvidos na locomoção. Mais recentemente, a comunicação osso-músculo deixou de ser restrita a interações biomecânicas com a descoberta de novas moléculas secretadas por esses tecidos, com ação regulatória recíproca em suas funções (BUVINIC et al., 2021; KIRK et al., 2020).

O sistema músculo-esquelético é um complexo arranjo que, além do tecido ósseo e muscular, também inclui estruturas como tendões, ligamentos, cartilagens, articulações e tecidos conectivos, associados a uma extensa malha de estruturas do sistema nervoso e vascular (BROTTO; JOHNSON, 2014). E além dos papéis biomecânicos, a unidade osso-músculo desempenha funções fisiológicas importantes como, por exemplo, o tecido ósseo atua como fonte de cálcio, fosfato, além de ter funções hematopoiéticas; e o tecido muscular controla o estoque de nutrientes, como glicose e aminoácidos, fundamentais para o metabolismo basal (GAO et al., 2017; WOLFE, 2006).

A miostatina, que inibe a proliferação e crescimento de fibras musculares, foi descrita em 1997 (KUREK et al., 1997), entretanto, a referência ao tecido muscular esquelético como um órgão endócrino foi realizada anos depois por Pedersen e colaboradores em 2007 (PEDERSEN et al., 2007). Atualmente se sabe que as células musculares também são capazes de secretar inúmeras moléculas, dentre as quais destaca-se a Interleucina-6 (IL-6), que é produzida em grandes quantidades, especialmente após o exercício físico, e regula a diferenciação de células-satélite e influencia a hipertrofia muscular (SERRANO et al., 2008; STEENBERG et al., 2000).

A abordagem do tecido ósseo como um órgão endócrino é mais recente, uma vez que o *fibroblast growth factor-23* (FGF23), molécula com ação endócrina produzida pelos osteócitos e que possui ação no controle dos níveis de fosfato nos rins, foi descrita apenas em meados dos anos 2000 (SAITO et al., 2005). Outro fator circulante produzido exclusivamente pelo tecido ósseo, capaz de atuar em vários órgãos e, por isso, considerado como um hormônio, é a osteocalcina. Essa molécula é produzida e depositada na matriz óssea pelos osteoblastos e

liberada após a ação de osteoclastos durante o remodelamento ósseo (FERRON et al., 2010; LEE et al., 2007).

Há também outras moléculas secretadas no microambiente ósseo, como a *Dentin Matrix Protein 1* (DMP1) (TOYOSAWA et al., 2001), *monocyte/macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) (FULLER et al., 1993), *sclerotin* (SOST), *bone morphogenetic protein 6* (BMP6) (PEDERSON et al., 2008), *receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand* (RANKL) (KONG et al., 1999) e *osteoprotegerin* (OPG) (TSUDA et al., 1997), que afetam a diferenciação ou função de osteoclastos, osteoblastos, osteócitos e apresentam funções fundamentais para a manutenção do balanço entre a deposição, reabsorção da matriz óssea e controle do nível de minerais no organismo.

O sistema RANK-RANKL-OPG é composto por uma tríade proteica representada por: 1) receptor ativador do fator de transcrição nuclear kappa-B (NF- $\kappa$ B), conhecido como RANK, 2) ligante do receptor ativador do NF- $\kappa$ B (RANKL) e 3) receptor isca osteoprotegerina (OPG), uma proteína solúvel que não possui domínios transmembranares. As relações entre ligante e receptor no sistema RANK-RANKL-OPG apresentam algumas particularidades: RANKL pode se ligar ao receptor de membrana RANK e também à OPG (receptor solúvel). Devido a esta característica de ser um receptor isca, a principal ação biológica de OPG ocorre através da ligação ao RANKL e consequente bloqueio da ativação de RANK, impedindo sua sinalização intracelular.

Estudos mais recentes descrevem que a maior parte do RANKL recém-sintetizado em osteoblastos pode seguir por duas vias intracelulares: o transporte para a membrana plasmática ou transferência para o armazenamento em compartimentos lisossomais, direcionado por proteínas vacuolares de triagem (Vps33a) (KARIYA et al., 2009). O deslocamento de RANKL para as estruturas lisossomais é desencadeado pela formação de um complexo com OPG no citosol dos osteoblastos, o que demonstra o papel de OPG como um controlador do tráfego intracelular de RANKL e, por isso, fundamental para a regular a ativação de osteoclastos por esta via, que é distinta da sua atuação como receptor-ísca do RANKL (AOKI et al., 2010).

Em osteoclastos, RANKL aumenta a biogênese mitocondrial através da ativação da via de sinalização CREB, que culmina na ativação do co-ativador de transcrição PGC-1 $\beta$  (ISHII et al., 2009), e é essencial para a atividade de reabsorção óssea, um processo de grande demanda energética devido à intensa secreção de íons H<sup>+</sup> nas lacunas de Howship, responsáveis por reduzir o pH da região e permitir ação enzimática envolvida na degradação proteica e dissociação da hidroxiapatita.

O aumento da demanda energética no tecido muscular esquelético, comum durante atividades físicas, desencadeia a expressão de proteínas envolvidas na fusão mitocondrial, como mitofusina-2 (Mfn2) e *optic atrophy type 1* (Opa1), e consequente redução da expressão de proteínas de fissão como *dynamin-related protein-1* (Drp1). Isto favorece a taxa de fusão:fissão mitocondrial e aumento do volume dessas organelas. As proteínas de fusão mitocondrial Opa1 e Mfn1/2 são reguladas por PGC-1 $\alpha$  (regulador master da biogênese mitocondrial), que é amplamente expresso em músculos submetidos ao exercício físico (HALLING et al., 2017).

Durante a contração muscular, o ATP é constantemente sintetizado e quebrado em ADP e AMP com liberação de fosfato inorgânico (Pi) para proporcionar a geração de força necessária. O AMP é capaz de se ligar à subunidade  $\gamma$  da proteína quinase ativada por AMP (AMPK), desencadear a sua fosforilação e mudanças conformacionais que culminam na fosforilação de proteínas-alvo subsequentes na cadeia de sinalização, incluindo o PGC-1 $\alpha$ . Este, por sua vez, controla atividades associadas ao aumento no conteúdo mitocondrial e, consequentemente, à oxidação dos ácidos graxos e captação de glicose (JAGER et al., 2007; WINDER et al., 2000).

As fibras musculares podem ser classificadas de acordo com a predominância do seu metabolismo: glicolítico ou oxidativo. As fibras oxidativas (tipo I) apresentam elevado conteúdo mitocondrial e alto poder de fosforilação oxidativa, além de maior resistência à fadiga. As fibras do tipo IIb e IIx possuem menor conteúdo mitocondrial e metabolismo predominantemente glicolítico. Ainda há a fibra do tipo IIa, que apresenta características intermediárias devido a capacidade de contração rápida e geração de ATP tanto pelos mecanismos oxidativos quanto glicolíticos (SCHIAFFINO, 2010).

A plasticidade do tecido muscular esquelético pode ser observada na capacidade de conversão do perfil das fibras musculares de acordo com as atividades e demandas metabólicas do tecido. Mediante estímulo adequado, a conversão pode ocorrer no sentido do aumento da proporção de fibras glicolíticas, como em atividades que demandam respostas com alta intensidade por um curto período de tempo, ou no aumento de fibras com maior capacidade de fosforilação oxidativa, como em condições de atividades durante longos períodos (CARROLL et al., 1998; FRONTERA; OCHALA, 2015).

Estudos demonstram que pacientes com doenças metabólicas como a diabetes tipo II e obesidade apresentam uma redução no tamanho das mitocôndrias, menor expressão de PGC-1 $\alpha$  e seus alvos, assim como redução da NADH desidrogenase, presente no complexo I da cadeia transportadora de elétrons (MORROW et al., 2017; PETERSEN et al., 2004; RITOV et

al., 2005). Dessa forma, alterações metabólicas e comprometimento da fosforilação oxidativa no tecido muscular esquelético impactam o metabolismo em razão deste tecido ser um dos principais captadores de glicose insulino-dependente e peça fundamental na homeostase energética (KOVES et al., 2008).

Recentemente, demonstramos que RANKL estimula a diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos bege, em processo denominado como *browning* ou escurecimento do tecido adiposo branco, que apresentam aumento no retículo mitocondrial e da respiração  $\beta$ -oxidativa. RANKL também induziu a expressão de PGC-1 $\alpha$  em células da fração estromal diferenciadas em adipócitos bege (MATSUO et al., 2020). Apesar de RANKL ser uma proteína abundantemente expressa e secretada pelo osso, RANK ser altamente expresso no músculo esquelético (DUFRESNE et al., 2018) e haver íntima associação anatômica entre os dois tecidos, a contribuição da sinalização RANK-RANKL-OPG ainda não foi explorada na fibra muscular saudável.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Desenvolvimento do tecido muscular esquelético

Durante os primeiros estágios embrionários, a formação do músculo esquelético é iniciada quando os segmentos do mesoderma paraxial formam os somitos em resposta a sinais do tubo neural, notocorda e da superfície do ectoderma (SAMBASIVAN et al., 2011). O desenvolvimento dos somitos formam os dermomiótomos, cujas células expressam Pax3 e Pax7 (HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ et al., 2017), além de miótomos e esclerotoma. As porções dorsomedial e ventrolateral do dermomiótomo originam os miótomos epaxial (primaxial) e hipaxial (abaxial). As células MYF5 positivas no miótomo epaxial se diferenciam e formam os músculos do tronco e das costas. Por outro lado, progenitores MyoD positivos migram do miótomo e contribuem para a formação dos músculos de membros (LEPPER; CONWAY; FAN, 2009; VON MALTZAHN et al., 2013).

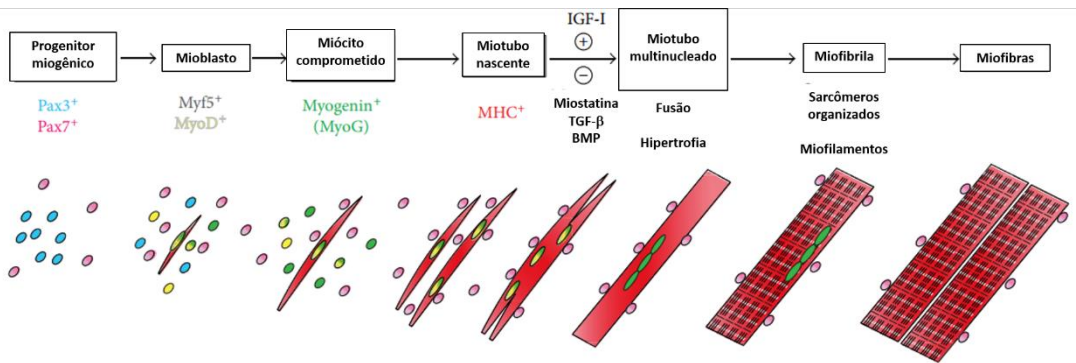
Após o início da diferenciação, os mioblastos expressam concomitantemente MYF5 e MyoD, iniciam o alongamento das células precursoras e formação dos miócitos, que são células com elevada expressão de miogenina (MyoG) e comprometidas com o processo de diferenciação e formação dos miotubos (JIWLAWAT et al., 2018). A formação dos miotubos durante a embriogênese pode ser separada em dois grandes momentos: a) o primeiro, quando os miotubos são gerados a partir da fusão de mioblastos imaturos e alinhados com os tendões para formar a base do desenvolvimento muscular embrionário; b) assim, inicia-se a segunda fase, na qual mioblastos maduros proliferam sobre os miotubos primários e ocorre a fusão e formação do eixo motor que permite a inervação dessa estrutura (OLGUIN; OLWIN, 2004).

A partir desta etapa, os mioblastos fusionam aos miotubos vizinhos, formam células multinucleadas denominadas de miotubos maduros com filamentos espessos de miosina e delgados de actina organizados em sarcômeros, a unidade funcional do músculo, dispostos em sequência (**Figura 1**) (JIWLAWAT et al., 2018).

Moléculas sinalizadoras controlam esse processo de forma extremamente delicada e estes eventos são dirigidos por moléculas autócrinas e parácrinas como FGF-2. A via de sinalização Wnt é uma das principais envolvidas na miogênese por desempenhar um papel importante na formação dos somitos e, concomitantemente, na formação de mioblastos nos estágios finais. Através de Wnt1, há o aumento na expressão de MYF5 que influencia diretamente na formação do músculo epaxial e, por outro lado, Wnt7a promove a expressão MyoD e influencia a miogênese hipaxial (PRICE et al., 2015; SHEA et al., 2010). Em camundongos geneticamente

modificados que não expressam Wnt1 e Wnt3a, há uma redução na expressão inicial de Pax3 e MYF5 (MCCARTHY et al., 2011).

**Figura 1.** Esquema de diferenciação do músculo esquelético *in vitro*.



Fonte: Adaptado de Jiwlawat *et al.*, 2017 (tradução nossa).

Legenda: A diferenciação da célula muscular esquelética inicia quando os precursores que expressam Pax3 e Pax7 começam a expressar Myf5 e MyoD, diferenciando-se em mioblastos. Essas células progressivamente iniciam a expressão de miogenina (MyoG) e formam os miotubos nascentes uninucleados, que expressam os genes de cadeia de miosina (MHC). Os fatores *Insulin-like growth factor* (IGF-1), inibidores de TGF- $\beta$  e de miostatina favorecem a formação de miotubos multinucleados. As proteínas actina, miosina e miofilamentos elásticos se arranjam para formar os sarcômeros, que representam a unidade funcional muscular e são responsáveis pelo padrão estriado em miotubos.

## 2.2 Regeneração muscular

O desenvolvimento das inúmeras funções mecânicas e fisiológicas do tecido muscular esquelético ocorre devido a sua capacidade em se adaptar e regenerar diante de demandas como o crescimento e atividade física (VON MALTZAHN; BENTZINGER; RUDNICKI, 2014). As células-tronco do tecido muscular, também chamadas de células-satélite (CS), são essenciais para estes processos de crescimento e regeneração (LEPPER; PARTRIDGE; FAN, 2011; SAMBASIVAN et al., 2011).

Em situações de repouso ou baixa demanda fisiológica, as CS permanecem em estado de quiescência e podem ser encontradas abaixo da lâmina basal da miofibrila (CHANG; RUDNICKI, 2014) e, justamente devido a sua localização entre as miofibras e a matriz extracelular (MEC), Alexander Mauro denominou essas células como células-satélite (MAURO, 1961).

O Pax7 é expresso em todas as CS e fundamental para a manutenção e regeneração do músculo após o nascimento (SEALE et al., 2000; VON MALTZAHN et al., 2013). Após estímulos e ativação, as CS co-expressam Pax7 e MyoD, que são marcadores primários do comprometimento miogênico e, dessa forma, favorecem a saída dessas células do estado de

quiescência e início da diferenciação em miócitos até a formação de miofibras. Porém, a ativação das CS não ocorre de maneira uniforme entre toda a população de células-tronco, pois há redução da expressão de MyoD em um processo dependente do fator *Sprouty1* em uma parcela dessas células, que interrompe o processo de diferenciação e preserva seu potencial mitótico em um estado quiescente (OLGUIN; OLWIN, 2004; SHEA et al., 2010).

Dessa forma, o processo de regeneração muscular pode ser dividido em três etapas: a) fase inflamatória aguda, b) ativação e diferenciação das CS e c) fase de maturação, na qual ocorre o remodelamento das novas fibras formadas. A primeira consequência após a injúria tecidual é a necrose das miofibras danificadas. Esse momento é acompanhado por um intenso influxo de cálcio e liberação desse íon do retículo sarcoplasmático, o que culmina na proteólise e agravamento do dano tecidual. A resposta inflamatória, que corresponde à 1ª fase da resposta regenerativa, é marcada pelo recrutamento de leucócitos, especialmente dos neutrófilos em um primeiro momento e tende a ocorrer nas primeiras 6h após a lesão (TIDBALL, 1995; YIN; PRICE; RUDNICKI, 2013). Em seguida, há infiltração de macrófagos pró-inflamatórios CD68+/CD163- nas primeiras 24h, importantes para a liberação de citocinas como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Entre o 2º e 4º dias após o dano, ocorre uma mudança no perfil de células infiltradas no tecido, com a maior presença de macrófagos com um padrão anti-inflamatório CD68-/CD163+, que secreta moléculas como IL-10, e proporcionam a proliferação e diferenciação das CS (SACLIER et al., 2013).

A formação de novas fibras é marcada pela presença do núcleo central e predominância na expressão de cadeias de miosina pesada de desenvolvimento, que é observada principalmente no período embrionário, e culmina na maturação das fibras musculares, formando a unidade contrátil do músculo esquelético (BENTZINGER; WANG; RUDNICKI, 2012; VON MALTZAHN; BENTZINGER; RUDNICKI, 2014).

Apesar da sua atuação na regeneração do músculo esquelético, o envelhecimento reduz a eficiência das CS, como observado em camundongos com perda de fatores anti-envelhecimento, como o hormônio Klotho, que apresenta um importante papel antagonista da via de *Wnt3a*, comumente elevada em músculos esqueléticos envelhecidos, e por alterações na composição da MEC, que contribui para o comprometimento da função dessas células (AHRENS et al., 2018; CHAKKALAKAL; BRACK, 2012).

### 2.3 Estrutura do tecido muscular esquelético

A arquitetura do tecido muscular esquelético é caracterizada por um arranjo particular das células musculares em forma de fibras, que definem o tamanho do músculo de forma proporcional ao seu volume, e podem sofrer alterações quando submetidas a estresse por atividades físicas ou, em situações patológicas, sofrer com a infiltração por gotículas lipídicas e tecido conjuntivo (FORTIN et al., 2014). As fibras musculares esqueléticas são células multinucleadas com regiões conhecidas como domínios nucleares, responsáveis por exercer o controle da síntese proteica de ao longo de toda a miofibrila. O sarcolema é a membrana celular que envolve individualmente cada fibra muscular e apresenta diversas proteínas como as distrofinas, distrobrevinas e sintrofinas, todas associadas à estrutura interna dos miofilamentos e à lâmina basal que envolve cada fibra muscular, denominada endomísio (HIKIDA 2011).

As proteínas mais abundantes encontradas nos miofilamentos são actina e miosina, que correspondem a cerca de 70-80% do total de proteínas de cada fibra, dentre as quais a miosina é o principal motor molecular, sendo descritos 11 genes responsáveis por codificá-la. O sarcômero e sarcoplasma contêm outras proteínas como a tropomiosina e troponina que contribuem para a organização estrutural do citoesqueleto, processo de excitação e contração, liberação de energia e produção de força mecânica (OTTENHEIJM; GRANZIER, 2010).

O sarcômero representa um elaborado complexo de estruturas moleculares composto por dois principais grupos de proteínas que estão espacialmente organizadas de forma paralela ao longo da fibra muscular: filamentos delgados, representados por  $\alpha$ -actina e proteínas associadas; e os filamentos espessos, formados principalmente por miosina e suas proteínas acessórias (MUKUND; SUBRAMANIAM, 2020).

A miosina é uma proteína que apresenta duas funções: enzimática (cabeça da miosina, com capacidade de quebrar a molécula de ATP) e estrutural (cauda). Esta última é associada a outras proteínas estruturais como as *myosin binding proteins* (BMPs), que podem ser de dois tipos: MyBPC e MyBPH. As proteínas MyBPC são fundamentais para organização e controle da geração de força pelo complexo actina-miosina (ACKERMANN; KONTROGIANNI-KONSTANTOPOULOS, 2013). E são encontradas associadas à titina, uma proteína gigante com propriedades elásticas que se estende ao longo de todo o filamento espesso até a linha Z, garantindo a distribuição uniforme da força em um músculo maduro (WANG; MCCLURE; TU, 1979).

Há uma classe de proteínas na banda M que se associa às moléculas de miosina e titina, que juntas funcionam para estabilizar os filamentos espessos de forma longitudinal e



transversal, proporcionando a ligação com os filamentos vizinhos e coordenação da contração dos sarcômeros (ACKERMANN; WAITES; GARNER, 2015). A *myomesin* é uma das principais proteínas da linha M e atua como um sensor de força no sarcômero através de dímeros que interagem com os filamentos de miosina e, juntos, interagem com um complexo de proteínas como a obscurina e titina (GAUTEL; DJINOVIĆ-CARUGO, 2016; PERNIGO et al., 2017; XIAO; GRÄTER, 2014).

A polimerização das isoformas de actina formam os filamentos delgados e, em conjunto com os filamentos espessos, são fundamentais para o funcionamento do sarcômero e também apresentam proteínas associadas que são fundamentais para facilitar a contração. A troponina é uma das proteínas acessórias mais importantes e apresenta três subunidades: a) TNN-I (inibitória), que se liga ao filamento de actina; b) TTN-C, que se liga ao cálcio e c) TTN-T, que se liga à tropomiosina. A tropomiosina é também muito importante na estabilização da actina e para proporcionar o correto posicionamento da TTN-C no filamento de actina (ZOT; POTTER, 1987).

A linha Z é a estrutura onde ocorre o ancoramento dos filamentos de actina de forma antiparalela, conectando os sarcômeros e proporcionando o arranjo linear da miofibrila. Nesta estrutura, é possível encontrar inúmeras proteínas como, por exemplo, a  *$\alpha$ -actinin*, *myozenins*, *myopodin*,  *$\gamma$ -filamin*,  *$\gamma$ -actin*, e *desmin* (PAPPONEN et al., 2009), além da sobreposição de algumas proteínas dos filamentos delgados, como titina (CHEN et al., 2015). A  *$\alpha$ -actinin* é uma proteína estrutural fundamental para o arranjo da estrutura da linha Z, porque esta proteína é responsável pelo ancoramento com as moléculas de titina nos sarcômeros vizinhos (LUTHER, 2009).

O tecido muscular possui fibras com diferentes diâmetros e estas medidas estão diretamente associadas a capacidade de geração de força. Assim, as fibras musculares apresentam grande versatilidade no seu arranjo em relação ao eixo de geração de força, e são divididas em três principais classes: a) longitudinal, na qual as fibras estão dispostas ao longo do eixo de geração de força do músculo, como no bíceps; b) unipeniforme, em que as miofibras se movimentam ao longo de um eixo fixo, como no músculo vasto-lateral; e c) arquitetura multipeniforme, classicamente descrita no glúteo médio, no qual a dinâmica das fibras ocorre em diferentes ângulos em relação ao eixo de geração de força (LIEBER; FRIDÉN, 2000).

A contração do sarcômero também pode ser descrita a nível molecular, no qual o movimento da “cabeça da miosina” sobre os filamentos de actina ocorre por uma sequência de reações enzimáticas que proporcionam esse movimento e geram força de maneira individual

nas miofibrilas que, em conjunto, transforma-se na contração muscular. No repouso, uma molécula de ATP se liga à ATPase da cabeça das miosinas e, após a propagação do potencial de ação desencadeado pelo neurônio motor e abertura dos canais de cálcio voltagem-dependentes, a contração muscular ocorre nas seguintes etapas: 1) o  $\text{Ca}^{+2}$  liberado no citosol interage com a troponina C e induz uma mudança conformacional no complexo troponina-actina, que resulta na exposição dos sítios de ligação da actina com a miosina, e esta interação desencadeia a 2) ativação do complexo miosina-ATP e uma mudança conformacional de  $45^\circ$  no posicionamento da cabeça da miosina e, em seguida, 3) a atividade de ATPase da miosina hidrolisa o ATP em ADP e Pi (fosfato inorgânico – energia livre), que proporciona 4) uma alteração na região da cabeça da miosina e de parte da cauda dessa molécula, 5) e causa o deslocamento da molécula de actina que está combinada com a cadeia de miosina; 6) após esse movimento, uma nova molécula de ATP se une a miosina, desfazendo a ligação com a actina e reiniciando o ciclo de contração (FITTS, 2008).

#### **2.4 Junções neuromusculares e mecanismos de contração**

As junções neuromusculares (JNM) são responsáveis pela transmissão de impulsos elétricos dos neurônios motores às fibras musculares, sendo compostas pela região pré-sináptica, que além dos neurônios contém as células de *Schwann*; o espaço sináptico, delimitado pela membrana basal, e a região pós-sináptica, que contém o complexo juncional do sarcoplasma e a membrana com os receptores dos neurotransmissores (HALL; SANES, 1993; HUGHES; KUSNER; KAMINSKI, 2006).

Na região pré-sináptica, as células de *Schwann* envolvem praticamente todo terminal nervoso na JNM, exceto a face da porção pós-sináptica. O terminal nervoso é abundante em vesículas sinápticas (VS), cuja função é armazenar, liberar e recapturar neurotransmissores como a Acetilcolina (DENKER, 2010; RIZZOLI; BETZ, 2005), que ocorre nas zonas ativas, que são as regiões onde ocorre o ancoramento, fusão, exocitose e recuperação das vesículas (Ackermann, Waites, & Garner, 2015). As sinapsinas são moléculas envolvidas no controle da ancoragem de vesículas, que são transportadas para as zonas ativas por motores moleculares de actina, após a liberação de  $\text{Ca}^{+2}$  através da ação de canais de cálcio dependentes de voltagem (CAI; SHENG, 2009).

O espaço entre as regiões pré e pós-sinápticas é onde ocorre a difusão dos neurotransmissores, sendo dividido em fenda primária, limitada pela membrana pré-sináptica e basal, e fendas secundárias, que é o espaço entre as dobras juncionais da membrana pós-

sináptica, enquanto que o centro da fenda sináptica é ocupado pela membrana basal sináptica. Esta última é rica em componentes como laminina (ROGERS; NISHIMUNE, 2017), colágeno tipo IV e nidogênio-2 (FOX et al., 2008).

A última porção, a região pós-sináptica, é formada por áreas juncionais que tem como principal função, aumentar a área da membrana pós-sináptica e, conseqüentemente, o volume do espaço sináptico. Essa região contém diversas estruturas celulares, como mitocôndrias, complexo de Golgi e filamentos intermediários, fundamentais para a manutenção das necessidades metabólicas e estruturais desta região (MUKUND; SUBRAMANIAM, 2020).

## 2.5 Tipos de fibras musculares esqueléticas

A classificação das fibras musculares esqueléticas teve início com a observação das características visuais de diferentes tecidos realizada por Ranvier em 1873, que dividiu as fibras musculares em dois tipos: a) vermelhas, compostas por elevado conteúdo de mioglobina e mitocôndria, caracterizadas pelo metabolismo predominantemente oxidativo e as b) brancas, que apresentam pouco conteúdo de mioglobina e mitocôndria, com metabolismo predominantemente glicolítico. Posteriormente, as análises histoquímicas revelaram que a relação entre coloração e conteúdo de enzimas metabólicas era verdadeira, além de acrescentar que os músculos podem conter fibras com características intermediárias (DUBOWITZ; PEARSE, 1960; SCHIAFFINO, 2010).

A maioria dos músculos esqueléticos contém uma heterogeneidade de tipos de fibras, mas com a predominância de algum dos tipos. Por isso, identificar os tipos de fibras presentes auxilia na determinação das propriedades funcionais e metabólicas de um músculo em particular. Atualmente, a classificação das fibras é baseada na imunorreatividade com anticorpos específicos para diferentes isoformas de cadeias pesadas de miosina (MyHC). Em geral, as fibras musculares são classificadas como do tipo I, IIa, IIb e IIx, determinadas pela composição de isoformas das cadeias de miosina MyHC<sub>slow</sub>, MyHC<sub>2A</sub>, MyHC<sub>2B</sub> e MyHC<sub>x</sub>, respectivamente (BOSMA, 2016; SCHIAFFINO; REGGIANI, 2011). Geneticamente, cada tipo de fibra muscular, de contração lenta ou rápida, apresenta diferenças na expressão das isoformas dos filamentos delgados e espessos, conforme descrito na **Tabela 1**.

**Tabela 1.** Isoformas de proteínas acessórias aos filamentos de actina e miosina

<b>Fibras de contração lenta</b>	<b>Fibras de contração rápida</b>	<b>Grupo de proteína</b>
MYH7	MYL1	Cadeia de miosina
MYL2/3	MYBP2	
MYBL2		
TNNT1/I1/C1	TNNT3/I1/C2	Troponina T
TPM3	TPM1	Tropomiosina
TMOD1	TMOD4	Tropomodulina
ATP2A2	ATP2A1	ATPase sarcoplasmática
CASQ2	CASQ1	Calsequestrina

A classificação das fibras musculares também pode ser realizada de acordo com o metabolismo: glicolítico ou oxidativo, e pela sua velocidade de quebra de ATP, isto é, atividade ATPase. As fibras com característica oxidativa (tipo I) apresentam taxas de contração mais lentas, alto conteúdo mitocondrial e alto poder de fosforilação oxidativa (OXPHOS), além de maior resistência à fadiga e estão amplamente distribuídas em músculos envolvidos com a postura corporal. Por outro lado, músculos que desenvolvem altas taxas de contração, como aqueles envolvidos em movimentos direcionais, apresentam baixo conteúdo mitocondrial, redução na capacidade de OXPHOS, predominância do metabolismo glicolítico, que implica em menor resistência à fadiga, e são compostos principalmente por fibras do tipo Iib e Iix. Há ainda o tipo de fibra intermediário (tipo Iia) que apresenta contração rápida, e geração de ATP por ambos mecanismos oxidativo e glicolítico (MISHRA et al., 2015; SCHIAFFINO, 2010).

A presença de diversos tipos de fibras com distintas propriedades em um mesmo músculo reflete a capacidade de adaptação a diferentes padrões de atividade e plasticidade do tecido, fundamentais para garantir a participação de grupamentos musculares em diferentes atividades de acordo com as demandas mecânicas e energéticas (FRONTERA; OCHALA, 2015; MISHRA et al., 2015).

O exercício físico é um dos principais fatores responsáveis pelo remodelamento das fibras do tecido muscular esquelético, por isso estudos do seu impacto na fisiologia do esporte, em doenças metabólicas e cardiovasculares, por exemplo, são cada vez mais relevantes. Em humanos e modelos animais, a atividade física pode induzir a conversão de fibras musculares com características predominantemente glicolíticas para um perfil com metabolismo

majoritariamente oxidativo, com fibras do tipo IIx sendo convertidas em IIa em humanos e, em ratos, ocorrendo na sequência IIb → IIx → IIa (AUSONI et al., 1990).

A habilidade das fibras musculares migrarem de um perfil de contração lenta para fibras de contração rápida, e vice-versa, tem recebido enorme atenção da comunidade acadêmica. Nesse sentido, é bem estabelecido o fato de que a composição de fibras musculares de um indivíduo pode prever relativamente a performance em um determinado tipo de atividade como, por exemplo, a predominância de fibras do tipo I aumenta as chances de sucesso em atividades que exigem o cumprimento de longas distâncias, como maratonistas (TESCH; KARLSSON, 1985), enquanto que a maior porcentagem de fibras do tipo II é benéfica para o desempenho de atividades de curta duração e de explosão muscular (SERRANO et al., 2019; TRAPPE et al., 2015).

A conversão das fibras musculares envolve a sinalização *calcineurin-NFAT*, conforme descrito por Chin et al. (1998). A expressão de genes MYH e alteração do perfil das fibras musculares, seja por exercícios ou alterações patológicas, também é influenciada pela expressão de fatores como MEF2, PPAR- $\beta/\delta$  (WANG et al., 2004), ativação de AMPK (LEE-YOUNG et al., 2009) e PGC1- $\alpha$  (JAGER et al., 2007).

Os PPARs (*peroxisome-proliferating activated receptors*) são um grupo bem caracterizado de receptor nuclear hormonal, ativados por fatores ligados a lipídeos, que atuam como fatores de transcrição e regulam diferenciação e metabolismo celular. No músculo esquelético, o PPAR $\delta$  regula a expressão de genes importantes para o transporte e oxidação de ácidos graxos, o que aumenta o consumo de lipídeos para produção de energia (TANAKA et al., 2003). Por exemplo, a expressão transgênica de PPAR $\delta$  no músculo esquelético resulta em “camundongos maratonistas” com aumento de fibras oxidativas e de contração lenta, diminuição de fibras de contração rápida, resistência ao ganho de peso quando alimentados com dieta hipercalórica e prevenção de obesidade neste modelo (WANG et al., 2004). Análises transcricionais utilizando ligantes farmacológicos para PPAR $\delta$  no músculo demonstraram que este fator também induz a expressão de PGC-1 $\alpha$ , que regula a expressão de genes mitocondriais (HONDARES et al., 2007; LIN et al., 2002).

A literatura indica que os treinamentos de resistência em baixa intensidade (70% da capacidade máxima) proporcionam o aumento no tipo de fibra IIa a partir da conversão de fibras do tipo IIx e menor impacto na conversão de fibras para o perfil do tipo I (CARROLL et al., 1998). O treino específico de força, comum para corredores de distâncias curtas que necessitam de respostas explosivas, favorece a manutenção de fibras com o perfil metabólico glicolítico,

como as fibras do tipo IIx e redução na quantidade de fibras do tipo I. Por outro lado, o treinamento para resistência a exercícios de longa duração (*endurance*) com maior intensidade também induz a conversão para fibras com características mais oxidativas e, à medida que o treinamento torna-se mais intenso, aumenta a taxa de conversão para fibras do tipo I (PLOTKIN et al., 2021). Apesar do exercício físico ser descrito como uma ferramenta interessante na modulação das fibras musculares, alterações metabólicas e sedentarismo também podem induzir respostas antagônicas no tecido muscular, especialmente na promoção de fibras com metabolismo glicolítico (VIKNE et al., 2020).

Apesar da relevância dos estímulos mecânicos na modulação das fibras musculares, a predisposição genética de indivíduos também influencia na realização de determinados tipos de atividades (FLÜCK et al., 2019; SIMONEAU; BOUCHARD, 1995). Nesse sentido, o genótipo ACTN3 R577X tem sido associado com uma composição de fibras musculares com maior capacidade oxidativa (VINCENT et al., 2007), assim como a expressão do alelo *angiotensin-converting enzyme gene* (ACE) D aumenta em quase 5% a proporção de fibras do tipo I comparado ao genótipo ACE II (KUMAGAI et al., 2018). Dessa forma, fica evidente que uma combinação de fatores genéticos, nutricionais e de estilo de vida podem influenciar diretamente na composição das fibras musculares (HUA et al., 2017).

## 2.6 Atividade muscular e vias de sinalização

O funcionamento do músculo esquelético é mantido por um delicado balanço entre síntese e degradação proteica e ciclos de hipertrofia e atrofia que ocorrem em resposta a alterações nas demandas físicas e metabólicas que ajustam esses fatores em busca do equilíbrio (GLASS, 2005).

Em situações de estresse patológico, como em doenças metabólicas e inflamações crônicas, comuns na obesidade e diabetes *Mellitus* tipo 2 (DM-2), ocorre o disparo de vias de sinalização intracelular que podem reforçar esse sinal e amplificar esse estado de inflamação. Os principais reguladores de expressão gênica, estado *redox* e metabólico ocorrem através da sinalização de *Mitogen-Activated Protein Kinases* (MAPK) e NF- $\kappa$ B, que são classicamente descritos em respostas adaptativas do músculo esquelético (KRAMER; GOODYEAR, 2007).

De maneira geral, as respostas via NF- $\kappa$ B estão associadas a eventos inflamatórios e degradação proteica (CAI et al., 2004). A persistência do estímulo inflamatório através desta via culmina no acúmulo de EROS e estresse metabólico, bastante comum em pacientes com Diabetes Mellitus tipo 2 e caquexia (BARACOS, 2006; OGIHARA et al., 2004). Porém, a

atividade física crônica, que promove a hipertrofia muscular e reduz os danos causados pela sarcopenia e osteoporose em idosos (HURLEY; ROTH, 2000), também estimula a ativação da via de NF- $\kappa$ B e acúmulo transiente de EROS. Ou seja, ao contrário do observado em condições patológicas, a ativação dessa via pelo exercício físico desencadeia respostas que favorecem a homeostase metabólica durante e após a atividade física (BEJMA; JI, 1999).

No músculo esquelético, a família da MAPK é composta por quatro membros, *extracellular signal regulated kinases* (ERK) 1 and 2 (ERK1/2), p38 MAPK, *c-Jun NH2-terminal kinases* (JNK) e ERK5 ou *big* MAPK (FORCE; BONVENTRE, 1998; KYRIAKIS; AVRUCH, 2001). A atividade dessas vias de sinalização depende do tipo, duração e intensidade do exercício. A ativação de ERK1/2 ocorre rapidamente em modelos de camundongos e humanos treinados ou não, submetidos a atividades agudas na capacidade submáxima de esforço, sendo a magnitude da fosforilação de ERK1/2 diretamente proporcional à intensidade do protocolo estabelecido (WIDEGREN et al., 2000; YU et al., 2003).

A literatura descreve que a atividade de ERK1/2 é fundamental para respostas na atividade do músculo esquelético devido ao direcionamento do metabolismo de lipídios por meio da regulação da atividade da *acetyl-CoA carboxylase* (RANEY et al., 2005) e da fosforilação da *hormone-sensitive lipase* (HSL) (DONSMARK et al., 2003). Dessa forma, a atividade de ERK1/2 está envolvida especificamente na mobilização de ácidos graxos durante a contração muscular, assim como no recrutamento de receptores capazes de se ligar a essas moléculas, como o CD36 (TURCOTTE; RANEY; TODD, 2005), fundamental para o aumento da captação de ácidos graxos e sua oxidação em situações de exercícios de intensidade baixa a moderada (RANEY; TURCOTTE, 2006).

A correlação entre a ativação de ERK1/2 e exercício físico foi demonstrada em estudos com humanos que submeteram apenas uma perna à atividade muscular e observaram o aumento na ativação de ERK1/2 em relação à perna contralateral mantida em repouso e, além disso, outros dados demonstram que maratonistas também apresentam uma elevada ativação de ERK1/2 (ARONSON et al., 1997; YU et al., 2001).

Recentemente, BOYER et al., 2019 utilizaram camundongos geneticamente modificados para avaliar o papel da ativação constitutiva de MEK1 na indução da maior sinalização de ERK1/2 e seu papel na conversão de fibras do tipo 1. Seus achados sugerem que os animais modelos apresentaram maior atividade metabólica e consumo de oxigênio que, funcionalmente, contribuíram para maior resistência à fadiga.

De forma semelhante, atividades físicas em roedores, camundongos e humanos também induzem a fosforilação de p38-MAPK (GOODYEAR et al., 1996; NADER; ESSER, 2001), que é composta por quatro isoformas (p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\delta$  e p38 $\gamma$ ) (RUSS; LOVERING, 2006; WRETMAN et al., 2001). As isoformas  $\alpha$  e  $\beta$  são expressas de forma ubíqua, enquanto que o mRNA de p38 $\delta$  é identificado principalmente em pulmões e rins (JIANG et al., 1997), e a isoforma p38 $\gamma$  é exclusivamente expressa no tecido muscular esquelético (LI et al., 1996). Assim como na sinalização via ERK1/2, a fosforilação de p38-MAPK aumenta de acordo com a intensidade do exercício físico e, em maratonistas, apenas a isoforma p38 $\gamma$  é ativada (SOMWAR et al., 2000; WRETMAN et al., 2001).

A ativação de MAPK induzida por exercícios físicos está associada à fosforilação de substratos envolvidos no metabolismo de carboidratos e lipídios, proliferação celular, hipertrofia, apoptose, respostas inflamatórias e co-ativação de fatores de transcrição. Essas diferentes ações são fundamentais para respostas de adaptação e plasticidade do músculo esquelético a desafios repetidos de estímulos físicos. Dessa forma, a ativação de MAPK é importante para a intermediação de mudanças que requerem adaptação no estado redox, homeostase energética e regulação gênica (KRAMER; GOODYEAR, 2007)

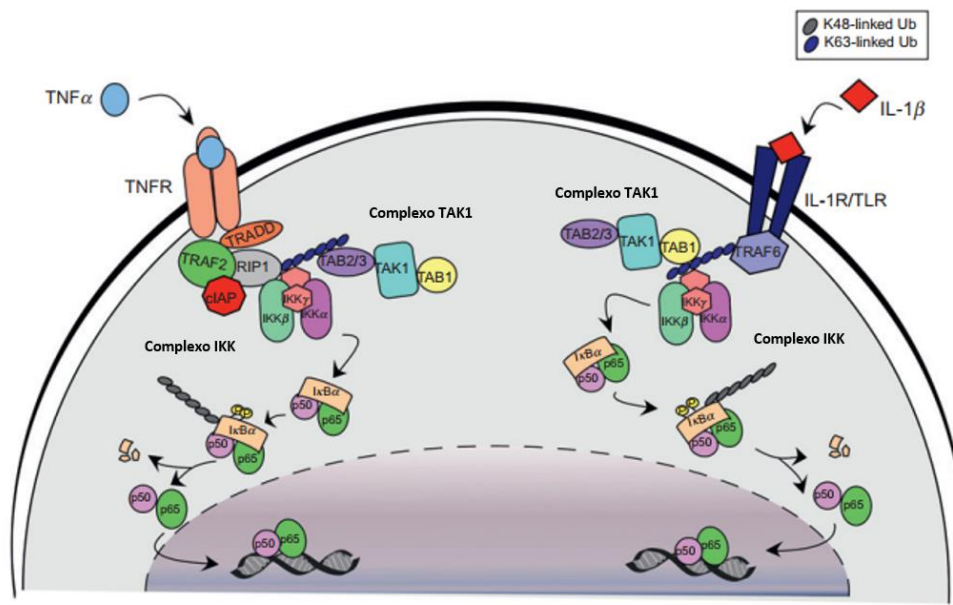
A família do NF- $\kappa$ B é composta por cinco membros, que incluem: p50, p52, p65 (RelA), RelB e RelC, dentre os quais dois membros sofrem dimerização para facilitar a ligação do NF- $\kappa$ B a regiões promotoras e, dessa forma, regular a expressão gênica em diversos tecidos (JACKMAN; KANDARIAN, 2004). No músculo esquelético em repouso, o NF- $\kappa$ B encontra-se inibido por proteínas I $\kappa$ B, que são compostas por sete membros, incluindo I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$ , I $\kappa$ B $\gamma$ , Bcl-3, p100 e p105. Contudo, esse efeito inibitório é interrompido após fosforilação da proteína I $\kappa$ B $\alpha$  pela IKK nas serinas 32 e 36, conseqüente ubiquitinação e degradação do I $\kappa$ B $\alpha$  via proteassoma, tornando livre a atividade do fator de transcrição NF- $\kappa$ B (DELHALLE et al., 2004; GILMORE, 2006).

A ativação da via de NF- $\kappa$ B pode ser desencadeada por citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ou LPS bacteriano (lipopolissacarídeo) e apresenta em comum a propagação do sinal através de um complexo proteico formado por proteínas *TNF-receptor associated factor Family* (TRAF 1-7). A sinalização desencadeada por TNF- $\alpha$ , por exemplo, proporciona o recrutamento das moléculas TRADD (*TNF receptor associated death domain*), TRAF2 (*TNF-receptor associated factor family*), c-IAP (*Inhibitor of Apoptosis*), e RIP1 (*receptor-interacting protein kinase*) (CHEN; GOEDDEL, 2002). Este último é ativado através da poliubiquitinação via K63,



e recrutamento de IKK e do complexo TAK1 (*TGF- $\beta$ -activated kinase 1*) que, então, ativa IKK $\beta$ , responsável por fosforilar I $\kappa$ B $\alpha$ , tornando-o alvo de ubiquitinação por K48 e degradação proteossomal. Assim, ocorre o translocamento das subunidades p50/p65 para o núcleo e a ativação de seus genes-alvo. De forma semelhante, a sinalização desencadeada por IL-1 $\beta$  e LPS leva ao recrutamento de TRAF6 que é ubiquinado por K63, culminando no recrutamento dos complexos TAK1 e IKK e posterior ativação dos dímeros de NF- $\kappa$ B (**Figura 2**) (PETERSON; BAKKAR; GUTTRIDGE, 2011).

**Figura 2.** Via clássica de ativação do NF- $\kappa$ B



Fonte: Adaptado de Peterson *et al.*, 2011 (tradução nossa)

Legenda: Na esquerda, a via de sinalização por TNF, iniciada pelo estímulo do receptor de TNF (TNFR) leva ao recrutamento de TRADD (*TNF receptor associated death domain*), TRAF2, c-IAP, e RIP1. Este último é ativado via cadeia de poliubiquitinação K63 e recrutamento de IKK e do complexo TAK1, que são responsáveis por ativar IKK $\beta$ , que fosforila I $\kappa$ B $\alpha$ , tendo como alvo a K48 ligada à cauda de ubiquitinação que culmina na degradação proteossomal. Após a degradação de I $\kappa$ B $\alpha$ , ocorre o translocamento de p50/p65 para o núcleo e ativação da transcrição dos genes-alvo. Na direita, a sinalização desencadeada pelos receptores de IL-1 (IL-1R) e *Toll-like receptor* (TLR), que se iniciam com a dimerização do receptor, recrutamento de TRAF6 e poliubiquitinação da K63. Esse processo leva novamente ao recrutamento dos complexos TAK1 e IKK e subsequente ativação dos dímeros de NF- $\kappa$ B

A ativação não-canônica da via de NF- $\kappa$ B é mediada pelo complexo IKK $\beta$ , sendo bem descrito em células B e essencial para o desenvolvimento dos tecidos linfóides (SENFTLEBEN

et al., 2001). Moléculas como os fatores ativadores de células B (BAFF), linfotoxina  $\beta$  ou ligantes de CD40 controlam a estabilização da *NF- $\kappa$ B inducing kinase* (NIK), pois inibem a degradação de NIK pelos complexos cIAP1/2 e TRAF3 (POMERANTZ; BALTIMORE, 2002). As células em estado de repouso apresentam a degradação de NIK pela atividade do complexo cIAP, enquanto que a sinalização por linfotoxina  $\beta$  em células B causa a autodegradação de cIAP, culminando na estabilidade de NIK (RAZANI et al., 2010; SANJO et al., 2010).

A literatura aborda de diferentes formas o papel da sinalização de NF- $\kappa$ B na diferenciação de células do músculo esquelético. A via clássica é descrita como fundamental para regular a diferenciação de mioblastos por diversos mecanismos, dentre os quais é possível destacar a ligação do NF- $\kappa$ B com a região promotora da ciclina D1, que ativa sua transcrição e manutenção dos mioblastos no estado proliferativo. Essa atividade é decorrente da ligação de p65 à ciclina D1 e aumento na atividade da quinase CDK4, que juntos formam um complexo responsável pela estabilidade das células no estágio S do ciclo celular (DAHLMAN et al., 2009; GUTTRIDGE et al., 1999).

Por outro lado, evidências apontam que a sinalização alternativa de NF- $\kappa$ B também é ativada durante a formação de miotubos, sendo caracterizada pelo aumento da atividade de IKK e da subunidade p100 para o processamento de p52, que regula a biogênese mitocondrial e manutenção da homeostase de miotubos maduros (BAKKAR et al., 2008). Sendo assim, fica evidente uma possível alternância entre as vias clássicas e alternativa da sinalização de NF- $\kappa$ B durante a diferenciação e manutenção da homeostase do músculo esquelético, demonstrando uma adaptação a diferentes fatores que regulam esse processo (PETERSON; BAKKAR; GUTTRIDGE, 2011)

## **2.7 Mitocôndrias no tecido muscular esquelético**

A mitocôndria é uma organela extremamente dinâmica e com características inerentes em sua estrutura como a dupla membrana lipoproteica interna e externa (MME e MMI, respectivamente): a MMI apresenta dobras que formam cristas e aumentam sua área superficial. Além disso, sua matriz é rica em proteínas, apresenta espaços intermembranares e intercristas, bem como material genético próprio, semelhante ao de procariotos (GRAY, 2017; GRAY; DOOLITTLE, 1982).

As mitocôndrias apresentam um papel fundamental no metabolismo celular pois desencadeiam processos bioquímicos como a fosforilação oxidativa (OXPHOS), o Ciclo de Krebs,  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos e manejo dos íons de cálcio. Dessa forma, disfunções mitocondriais apresentam grande impacto celular e são associadas a doenças metabólicas e neurodegenerativas, bem como no processo de envelhecimento (CARELLI; CHAN, 2014; LIGHTOWLERS; TAYLOR; TURNBULL, 2015).

A fusão de pequenas mitocôndrias permite o compartilhamento de diversos componentes e facilita a expansão do retículo mitocondrial. O processo de fusão envolve proteínas essenciais para o ancoramento da membrana externa de mitocôndrias adjacentes, como as mitofusinas 1 e 2 (Mfn1 e Mfn2) e *optical atrophy* 1 e 2 (Opa1 e Opa2), que permitem ações semelhantes nas membranas mitocondriais internas (MISHRA; CHAN, 2016). Por outro lado, a fissão mitocondrial reduz a organela a pequenos fragmentos, contribui para a remoção de mitocôndrias que apresentam alterações funcionais e promovem o direcionamento para a degradação e reciclagem por meio do sistema de mitofagia-lisossomal. De forma análoga às mitofusinas, a *dynamin-related protein 1* (Drp1) é encontrada na membrana mitocondrial externa e atua em conjunto com o fator de fissão mitocondrial (Mff) e a proteína de fissão 1 (Fis1) para envolver e realizar a constrição da membrana mitocondrial e promover a separação (LOSON et al., 2013).

O aumento da demanda energética, comum em situações de exercício físico, ativa a expressão gênica de proteínas envolvidas na fusão mitocondrial, como Mfn2 e Opa1 com consequente redução da expressão de proteínas de fissão como Drp1. Isto favorece a taxa de fusão:fissão mitocondrial e aumento do volume dessas organelas. As proteínas de fusão mitocondrial Opa1 e Mfn1/2 são reguladas por PGC-1 $\alpha$  (regulador master da biogênese mitocondrial), fundamental para o aumento do retículo mitocondrial, que é amplamente expresso em músculos submetidos ao exercício físico (HALLING et al., 2017).

A contração muscular em exercícios agudos desencadeia a produção de EROS e estresse oxidativo transiente e ativação de vias de sinalização capazes de promover a fosforilação de fatores de transcrição como MEF2 e ATF2, que regulam a expressão de PGC-1 $\alpha$ , assim como a ativação de cascatas de sinalização através da família p38-MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases), responsáveis pela estabilidade de PGC-1 $\alpha$ . A resposta não-linear à concentração de EROS no balanço entre manutenção do funcionamento celular em concentrações mais baixas e danos causados pelo seu acúmulo é denominada como *Mitohormesis*. (POGOZELSKI et al., 2009; RISTOW; SCHMEISSER, 2014; SALEEM et al., 2015).

Durante a contração muscular, o ATP é constantemente sintetizado e quebrado em ADP e AMP com liberação de fosfato inorgânico (Pi) para proporcionar a geração de força necessária. O AMP é capaz de se ligar à subunidade  $\gamma$  da proteína quinase ativada por AMP (AMPK), proporcionar a sua fosforilação e mudanças conformacionais que culmina na fosforilação de proteínas-alvo subsequentes na cadeia de sinalização, incluindo o PGC-1 $\alpha$ . Este, por sua vez, controla atividades associadas ao aumento no conteúdo mitocondrial, oxidação dos ácidos graxos e captação de glicose (JAGER et al., 2007; WINDER et al., 2000).

Estudos demonstram que há redução no tamanho das mitocôndrias, menor expressão de PGC-1 $\alpha$  e seus alvos, como a NADH desidrogenase, presente no complexo I da cadeia transportadora de elétrons em pacientes com doenças metabólicas como a diabetes tipo II e obesidade (MORROW et al., 2017; PETERSEN et al., 2004; RITOV et al., 2005). Assim, alterações metabólicas e comprometimento da fosforilação oxidativa no tecido muscular esquelético impactam o metabolismo em razão deste tecido ser um dos maiores captadores de glicose insulino-dependente e peça fundamental na homeostase energética (KOVES et al., 2008).

## 2.8 Funções endócrinas do tecido muscular esquelético

A liberação de fatores de crescimento pelo tecido muscular esquelético, conhecidos como miocinas, tem recebido destaque devido ao seu papel na comunicação entre órgãos (OWUSU-ANSAH; PERRIMON, 2015). As miocinas foram classificadas como “citocinas e outros peptídeos que são produzidos, expressos e liberados por fibras musculares, que exercem efeitos autócrino, parácrino ou endócrino” (PEDERSEN et al., 2007).

A miostatina, primeira molécula secretada pelo tecido muscular a ser descrita, tem como função inibir a proliferação e crescimento de células musculares (KUREK et al., 1997), é membro da família *transforming growth factor  $\beta$*  (TGF- $\beta$ ), atua de forma autócrina/parácrina e regula negativamente a atividade de mioblastos e crescimento muscular devido a sua capacidade de aumentar a atividade da cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor p21, que culmina na inibição de Cdk2 e seu alvo, a proteína retinoblastoma (Rb) (MCFARLANE et al., 2011). A miostatina também mantém as CS no estado de quiescência causada pela degradação da ciclina D1 devido ao aumento da atividade de p21 (YAMADA et al., 2010) por meio da ativação da via PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$  (YANG et al., 2007).

A miostatina inibe as respostas envolvidas na diferenciação de células do músculo esquelético através da inibição da via Akt/TORC1/p70S6K e, conseqüentemente, da capacidade

de síntese proteica dessas células, bem como promove a regulação negativa de fatores envolvidos na miogênese, como *MyoD* e miogenina (MCFARLANE et al., 2011; TRENDELENBURG et al., 2009).

Em meados dos anos 2000, foi descrita outra molécula secretada pelo músculo que apresenta inúmeras funções metabólicas, a *Interleukin-6* (IL-6) (STEENSBERG et al., 2000), liberada pelos músculos principalmente após atividades físicas, com aumento expressivo nos níveis de RNA mensageiro (mRNA) em intervalo de 30 min após uma bateria de exercícios (HISCOCK et al., 2004; PEDERSEN; FEBBRAIO, 2008), e seus níveis circulantes aumentam de forma proporcional à duração do estímulo e a massa muscular (KELLER et al., 2001; STEENSBERG et al., 2002).

Diversos estudos apontam o papel da IL-6 como mediador anti-inflamatório após o exercício, assim como também o seu envolvimento no metabolismo da glicose e lipídeo (PEDERSEN; FEBBRAIO, 2012). A IL-6 secretada pelos músculos também está envolvida na intercomunicação entre intestino e pâncreas: o estímulo de IL-6 aumenta a produção do *glucagon-like peptide 1* (GLP1), que tem como ação induzir a secreção de insulina pelas células  $\beta$  pancreáticas e, muito provavelmente, está associado ao aumento da ação da insulina no período imediato após o exercício físico (WALLENIUS et al., 2002); a IL-6 liberada pelo músculo também aumenta o translocamento do transportador de glicose GLUT4, responsável pela captação de glicose na fibra muscular (CAREY et al., 2006). O estímulo de IL-6 recombinante (rIL-6) *in vitro* também aumentou a captação de glicose e oxidação de ácidos graxos por meio da ativação da AMPK (*AMP activated protein kinase*) (KAHN et al., 2005; VAN HALL et al., 2003).

Posteriormente, estudos comprovaram que IL-6 é produzida nos músculos e de maneira transiente por miofibras em processo de crescimento e associadas a CS (PEDERSEN, 2006), e secretada por tecidos de indivíduos saudáveis e até mesmo de pacientes com Diabetes *mellitus* tipo 2 (GREEN et al., 2011; HAUGEN et al., 2010).

Após a identificação da IL-6, foram identificadas centenas de outras moléculas liberadas pelo tecido muscular esquelético, mas apenas cerca de 5% apresentam suas funções completamente descritas e a identificação do “*myokinome*” tem proposto um novo paradigma e compreensão conceitual do mecanismo de comunicação entre músculos e demais órgãos (SEVERINSEN; PEDERSEN, 2020). Ainda, tem sido proposto que miocinas liberadas pelo músculo na circulação após atividades físicas são denominados *exerkines* (SAFDAR; SALEEM; TARNOPOLSKY, 2016; SAFDAR; TARNOPOLSKY, 2018).

A atividade de músculos esqueléticos e liberação de citocinas também pode influenciar o desenvolvimento de funções cognitivas pela indução da molécula *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), que regula a plasticidade sináptica, sobrevivência e diferenciação das células do cérebro (CHAO; RAJAGOPAL; LEE, 2006; DUZEL; VAN PRAAG; SENDTNER, 2016). Apesar do aumento da expressão do mRNA de BDNF no músculo não ser diretamente relacionado à liberação dessa proteína (MATTHEWS et al., 2009), foi demonstrado que a atividade física também induz a expressão de FNDC5 (*Fibronectin type III domain-containing protein 5*) no hipocampo, que estimula o aumento nos níveis de BDNF e seus efeitos de neuroproteção (WRANN et al., 2013). A atividade física também aumenta a concentração plasmática de *Cathepsin B*, que pode atravessar livremente a barreira hemato-encefálica e induzir a produção de BDNF no hipocampo (DE LA ROSA et al., 2019; MOON et al., 2016).

A proteína FNDC5 também é comumente chamada de Irisina e foi descrita simultaneamente por dois grupos em 2002 (FERRER-MARTÍNEZ; RUIZ-LOZANO; CHIEN, 2002; TEUFEL et al., 2002). O gene do FNDC5 é composto por 6 éxons que codificam 209 aminoácidos (aa) e a proteína é compreendida em 28-AA na região N-terminal, 93-aa pela *fibronectin type III domain* (FNIII), em 30-aa do domínio de ligação, um segmento transmembrana de 19-aa e, por último, uma porção intracelular formada por 39-aa. A porção N-terminal é alvo de clivagem e produz a molécula Irisina, que é 100% conservada entre humanos, camundongos, ratos e bovinos (BOSTRÖM et al., 2012; KOMOLKA et al., 2014; SCHUMACHER et al., 2013)

A hipótese geral que propõe o papel da FNDC5/Irisina como hormônio envolve a clivagem do ectodomínio de FNDC5 e produção da Irisina na forma solúvel que, desta forma, pode atingir tecidos alvo. Embora ainda existam muitas questões sobre a identificação e mecanismos de clivagem da FNDC5 e produção da irisina, inúmeras evidências indicam sua presença em fluidos biológicos e de seus efeitos com o uso de proteínas recombinantes em modelos de roedores (MAAK et al., 2021).

LOURENCO et al., 2019 demonstraram que a irisina atua na formação da memória e proteção contra EROS associadas à origem da Doença de Alzheimer (BOSTRÖM et al., 2012; JEDRYCHOWSKI et al., 2015; KAJI, 2016). E os níveis de mRNA da FNDC5 estão elevados após atividade do músculo esquelético em camundongos e humanos, e sua expressão é controlada pelo fator de transcrição de PGC-1 $\alpha$ . Ainda, o aumento nos níveis transcricionais de FNDC5 foi observado em camundongos geneticamente modificados para a superexpressão de PGC-1 $\alpha$  e em animais submetidos a exercícios de resistência. O meio condicionado da cultura

de miócitos de animais transgênicos induziu o aumento na expressão de genes relacionados ao tecido adiposo marrom na cultura primária de adipócitos, reforçando o conceito de que havia a liberação de irisina na circulação dos camundongos e indução da transição do tecido adiposo branco para tecido adiposo marrom, fenômeno descrito como *browning* (BOSTRÖM et al., 2012).

O tecido muscular esquelético é a principal fonte de produção da irisina, onde desempenha inúmeras funções fisiológicas autócrinas, como a termogênese, aumento da taxa metabólica geral, como no metabolismo da glicose, além de efeitos na proliferação e diferenciação das células desse tecido. Recentemente, foi descrito que a irisina estimula a captação da glicose em células musculares através da via de MAPK-p38, que é ativada por EROS e mediada pela ativação de AMPK (LEE et al., 2015). Além disso, a literatura também descreve uma correlação positiva entre a irisina e a sensibilidade à insulina (ROCA-RIVADA et al., 2013; STENGEL et al., 2013), uma vez o estímulo com irisina antagoniza os sinais desencadeados pelo ácido palmítico em células de mioblastos da linhagem C2C12 e, dessa forma, reverte a perda da fosforilação das vias de AKT e ERK induzidas pelo estímulo com o ácido graxo (YANG et al., 2015).

A ação da irisina na regulação do metabolismo energético se estende a outros órgãos como, por exemplo, sua associação na conversão do tecido adiposo branco (TAB) em tecido adiposo marrom (TAM), proporcionando a perda de peso e melhoramento do metabolismo da glicose (BOSTRÖM et al., 2012) através da ativação da via de p38 e ERK (ZHANG et al., 2014), o que demonstra seu potencial terapêutico no controle da diabetes e obesidade (NOVELLE et al., 2013).

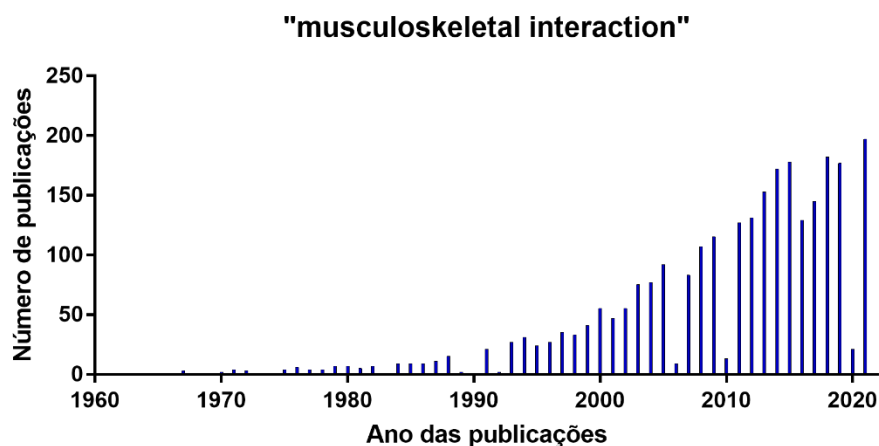
Dessa forma, destaca-se o papel da sinalização por irisina mediada pela via MAPK no controle do metabolismo energético, proliferação celular e diferenciação em vários tipos celulares, especialmente no tecido muscular esquelético, reforçando o papel fundamental desta miocina na coordenação de respostas fisiológicas entre órgãos e tecidos (RABIEE et al., 2020).

Outras moléculas secretadas pelo tecido muscular esquelético também já foram descritas, como a IL-8, que é induzida pela ação da IL-6 e atua na angiogênese (PEDERSEN et al., 2007), além da IL-15, que é um fator muscular que reduz a adiposidade e aumenta o conteúdo mineral ósseo (QUINN et al., 2009).

## 2.9 Interações na unidade osso-músculo

As relações biomecânicas entre o tecido muscular esquelético e tecido ósseo são amplamente abordadas na literatura e sustentaram a discussão baseada principalmente em suas funções anatômicas por um longo período. Contudo, as discussões sobre a interação osso-músculo foram atualizadas por novas descobertas, e esta nova onda de aumento no número de publicação nos últimos 20 anos já é considerada como um renascimento da área (**Figura 3**) (LARA-CASTILLO; JOHNSON, 2020; MAUREL; JÄHN; LARA-CASTILLO, 2017).

**Figura 3.** Busca com o termo “musculoskeletal interaction” na plataforma PubMed em janeiro de 2022.



Legenda: O gráfico demonstra o aumento no número de publicações nos últimos anos referente ao termo buscado. Atualização dos dados publicados por MAUREL; JÄHN; LARA-CASTILLO, 2017.

Durante o período de crescimento de um organismo vertebrado, os músculos e ossos crescem de forma proporcional, e este fenômeno tem sido a base da teoria da interação biomecânica, na qual os ossos se adaptam à força muscular durante o desenvolvimento de um ser (SCHIESSL; FROST; JEE, 1998) e se adaptam ao longo do tempo por meio de efeitos desencadeados por atividades físicas, sedentarismo e doenças relacionadas a idade, como a osteoporose e sarcopenia, demonstrando uma dependência simultânea da quantidade e qualidade dos tecidos ósseo e muscular (MITCHELL et al., 2012; REGINSTER et al., 2016).

As evidências de que forças geradas pelo músculo afetam diretamente o tecido ósseo surgiram com estudos sobre o desenvolvimento embrionário da unidade musculoesquelética, nos quais camundongos com paralisia muscular intrauterina (*dysgenesis*) apresentaram alteração na diáfase de ossos longo, que adquiriram morfologia mais arredondada e com menor resistência à aplicação de tensões (SHARIR et al., 2011). Além disso, camundongos geneticamente modificados para não expressarem os genes MyoD (MyoD -/-) e MYF5 (MYF5



-/-), fundamentais para a formação do músculo esquelético, desenvolveram-se sem o registro de movimentos intrauterinos, com menor índice de mineralização dos ossos, e apresentaram incompatibilidade com a vida após o nascimento (GOMEZ et al., 2007).

Os músculos induzem diferentes tipos de estímulos mecânicos nos ossos, que podem ser por meio de atividades isométricas, estáticas, concêntricas ou de alta intensidade. O ancoramento do músculo esquelético ao osso ocorre por meio de tendões e ligamentos localizados nos eixos de locomoção, que resulta em estruturas análogas a alavancas para proporcionar o movimento (AVIN et al., 2015). Sendo assim, a aplicação de forças com altas intensidades geradas pelos músculos são transmitidas diretamente ao osso e são descritas como a primeira fonte de tensão no tecido ósseo (FROST, 2000).

Estudos clínicos realizados com jovens de ambos os sexos durante a fase de desenvolvimento no período pré-púbere demonstraram que o aumento da força óssea é precedido de um ganho representativo da massa muscular, evidenciando que o acúmulo de massa magra afeta positivamente a resistência óssea do adulto (JACKOWSKI et al., 2014; RAUCH et al., 2004)

A teoria mecano-estática afirma que o osso adapta sua massa e arquitetura para se adequar às tensões sofridas em uma janela de tolerância fisiológica, e que a aplicação de forças além desses limites induz o aumento da massa óssea, enquanto que a sua ausência culmina na reabsorção da matriz óssea. Esta teoria é respaldada por estudos que descrevem o papel das atividades físicas no aumento da massa óssea e muscular (DUCHER et al., 2005), enquanto que o envelhecimento e sedentarismo contribuem para efeitos opostos (REGINSTER et al., 2016).

A conversão de estímulos mecânicos em estímulos bioquímicos é descrita como mecanotransdução. Nos ossos, as principais células sensíveis a esses estímulos são os osteócitos, células residentes em lacunas e embebidas pela matriz óssea, que possuem prolongamentos citoplasmáticos delicados que atravessam os canalículos e permitem a comunicação celular. Os osteócitos realizam a transdução dos sinais mecânicos principalmente por meio de vias como ERK5 e *Wnt/β-catenin*, que culminam na liberação de moléculas capazes de recrutar osteoblastos e osteoclastos para a lacuna (ARMSTRONG et al., 2007; COWIN, 2007; KLEIN-NULEND et al., 2013). Além disso, a mecanotransdução também tem sido descrita como responsável por induzir a expressão de marcadores como *bone morphogenetic protein-2* (BMP-2), *alkaline phosphatase* (ALP) e *type I collagen* (Col1) em osteoblastos (LU et al., 2012).

A relevância da comunicação osso-músculo também é descrita em processos de reparo de danos ao tecido ósseo. Conforme descrito por UTVÅG et al. em 2003, o reparo de fratura em ossos é amplamente comprometido quando há remoção de um grande segmento do músculo associado, reforçando a ação de fatores de alto peso molecular liberados pelo músculo que contribuem para a homeostase do tecido ósseo (KAUFMAN et al., 2008; SHAH et al., 2013).

As interações entre osso e músculo incluem diferentes níveis de comunicação, que podem ocorrer por meio de vias humorais sistêmicas, mas também a nível celular e molecular por vias bidirecionais. Dessa forma, além das interações biomecânicas, os aspectos bioquímicos da ação de moléculas sinalizadoras secretadas pelos dois órgãos constituem um importante fator regulatório para a função desses tecidos.

## **2.10 Funções endócrinas do tecido ósseo**

Tradicionalmente descrito como um órgão com funções estruturais e de proteção mecânica, o tecido ósseo também é um importante reservatório de minerais como o cálcio, fosfato, magnésio e moléculas orgânicas como fibras de colágeno (FENG; MCDONALD, 2011; MIZOKAMI; KAWAKUBO-YASUKOCHI; HIRATA, 2017). O tecido ósseo apesar de ser uma estrutura rígida, apresenta uma intensa dinâmica de remodelamento da sua estrutura, que ocorre por meio de dois processos: a remoção de áreas com dano por meio da atividade de osteoclastos e a deposição de nova matriz mineral pela ação de osteoblastos (CROCKETT et al., 2011; SUCHACKI et al., 2017).

A homeostase do tecido ósseo é mantida por funções primárias de células que apresentam origem embrionária distinta: os osteoblastos derivam de uma linhagem mesenquimal, enquanto que os osteoclastos são formados a partir da linhagem hematopoiética monocitária (BOYCE, 2013; BOYLE; SIMONET; LACEY, 2003). Os osteoblastos se diferenciam terminalmente em osteócitos quando ficam aprisionados na matriz mineral óssea e compõem cerca de 90% do total de células do sistema esquelético humano (FLORENCIO-SILVA et al., 2015). Neste microambiente composto por osteoblastos, osteoclastos e osteócitos, ocorre a síntese e secreção de diversas moléculas sinalizadoras como fatores de crescimento e citocinas que podem atuar de forma parácrina ou endócrina (HAN et al., 2018).

As ações parácrinas desses fatores são fundamentais para os processos de remodelamento da matriz mineral óssea e estão associados a outras ações, como a angiogênese através do *vascular endothelial growth factor A* (VEGFA), que é sintetizado por pré-osteoclastos e condrócitos, sendo um dos principais fatores que promovem a proliferação, sobrevivência e

migração de células endoteliais (ESHKAR-OREN et al., 2009; SIVARAJ; ADAMS, 2016). Outros fatores envolvidos na angiogênese também são secretados por pré-osteoclastos, como o *Platelet-derived growth factor-BB* (PDGF-BB), que induzem a formação de vasos do tipo H, encontrado próximo às placas epifisárias, e estimula a formação óssea (PENG et al., 2020). A Ativação de osteoclastos depende de outra molécula além do RANKL, o *monocyte/macrophage colonystimulating factor* (M-CSF), que é também secretada por osteoblastos e atua através da via *nuclear factor activated in T cells* (NFATc) (IKEDA et al., 2004).

A compreensão dos fatores que contribuem para o desenvolvimento da esclerose, uma doença causada por desordem genética que afeta principalmente os ossos, permitiu identificar que osteócitos produzem a esclerotina através da expressão do gene *Sost*. A esclerose é causada por intenso aumento da densidade mineral óssea decorrente da ausência da expressão de *Sost*, cuja função principal é inibir a atividade de osteoblastos e formação de tecido ósseo (COMPTON; LEE, 2014; SAPIR-KOREN; LIVSHITS, 2014). A expressão desse gene ocorre após a percepção de sinais mecânicos em osteócitos, responsáveis pela transdução do sinal por meio da via canônica *Wnt*, que resulta na inibição da diferenciação de osteoblastos. A proteína SOST se liga aos domínios extracelulares dos receptores *low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6* (LRP5/6), ativa a via canônica  $\beta$ -catenina e interrompe a ativação de genes relacionados à produção de tecido ósseo (LI et al., 2005).

Em relação à função endócrina, osteócitos e osteoblastos também secretam uma molécula da família FGF, o FGF23, que apresenta como principal função a inibição da reabsorção do fosfato nos túbulos renais proximais e distais, além de suprimir a produção da 1,25 Dihidroxitamina D3 [1,25(OH)<sub>2</sub>D3] (HAN et al., 2018). A atividade da FGF23 ocorre pela ligação do complexo formado pelo *Fibroblast Growth Factor Receptor-1* (FGFR1) e o co-receptor *Klotho*, que aumenta de forma significativa a fosforilação dos substratos do receptor de FGF e, conseqüentemente, a sua sinalização intracelular (KARSENTY; OLSON, 2016; URAKAWA et al., 2006). Por outro lado, os genes *phosphate-regulating gene with homologies to endopeptidases* (PHEX) e *dentin matrix protein-1* (DMP1) atuam de forma antagônica ao FGF23, pois suprimem a sua expressão no tecido ósseo e, conseqüentemente, favorecem a reabsorção de fosfato nos túbulos renais (QUARLES, 2008).

A osteocalcina (OCN), também conhecida como BGLPA, é uma proteína não-colagenosa produzida exclusivamente por osteoblasto, secretada em grandes quantidades na matriz extracelular dos ossos e determinante para a formação dos ossos (HAUSCHKA; LIAN; GALLOP, 1975; PRICE et al., 1976). A OCN é inicialmente produzida como um pro-hormônio,

que sofre clivagem e maturação em osteoblastos pela proteína intracelular Furina (AL RIFAI et al., 2017). Antes da secreção, a OCN sofre uma série de três carboxilações nos resíduos de ácido glutâmico (GLA) no retículo endoplasmático pela ação da enzima *c-glutamyl carboxylase* (GGCX), que tem a vitamina K como um cofator (LIAN; HAUSCHKA; GALLOP, 1978). Essa modificação pós-traducional confere uma maior afinidade aos íons  $\text{Ca}^{+2}$  e cristais de hidroxiapatita (HAUSCHKA et al., 1989). O ambiente ácido gerado pela atividade dos osteoclastos (pH ~ 4.5) promove a descarboxilação da osteocalcina (GluOCN), que reduz sua afinidade pelos minerais da MEC e promove sua liberação na circulação, contribuindo para sua função endócrina como um regulador do metabolismo energético (FERRON et al., 2010).

Sendo assim, uma importante diferença entre OCN e FGF23 é o fato de que o último é uma molécula secretada pelo tecido ósseo, que regula o metabolismo do fosfato, enquanto que a OCN apresenta inúmeras funções no metabolismo energético de tecidos como o fígado, pâncreas, tecido adiposo e muscular esquelético (FERRON et al., 2008; KARSENTY; OLSON, 2016; MERA et al., 2016).

### 2.11. O sistema RANK-RANKL-OPG

Os receptores da família dos fatores de necrose tumoral (*Tumor necrosis factor – TNFs*) e seus receptores associados (*TNFRs*) compõem a superfamília de TNFs (*TNFSF*), e seus membros são expressos em uma variedade de órgãos, tecidos e sistemas, sendo mais comum em células que apresentam relação com o sistema imune. Recentes estudos com TNFSF elucidaram interações entre células do sistema imune e outros componentes biológicos no controle de diversas condições patológicas (LOCKSLEY; KILLEEN; LENARDO, 2001; ROBINSON; BORYSENKO; BLAIR, 2007).

Entre eles, destacam-se os trabalhos que descrevem o ligante do receptor ativador de NF- $\kappa$ B (RANKL), também denominado como *TNF-related activation-induced cytokine* (TRANCE), *osteoclast differentiation factor* (ODF) ou TNFS11 que, em conjunto com mais duas proteínas, forma um sistema único denominado RANK-RANKL-OPG, que é composto por um ligante, o RANKL, e dois receptores: o receptor ativador de NF- $\kappa$ B (RANK ou TRANCER) e o receptor solúvel osteoprotegerina (OPG ou TNFSRS11B). (ANDERSON et al., 1997; FATA et al., 2000; SIMONET et al., 1997).

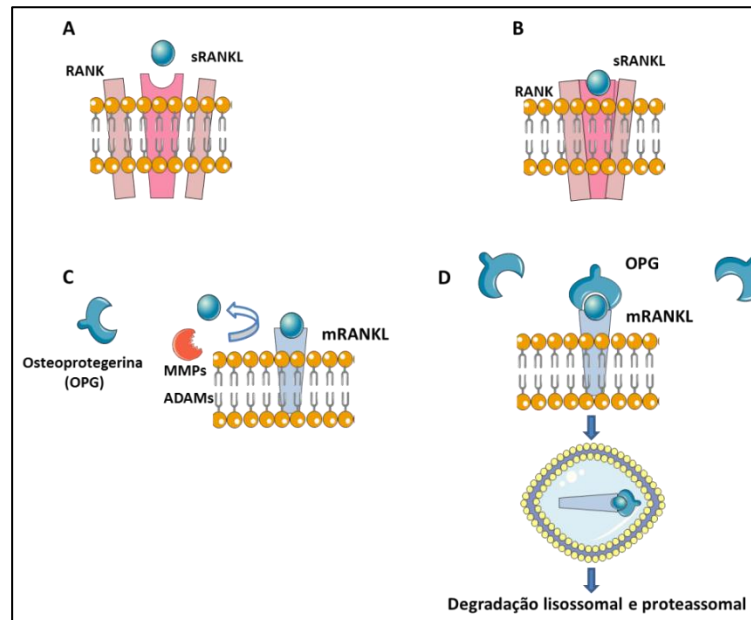
O *Tnfsf11* é o gene responsável por codificar a proteína RANKL, sendo localizado em humanos no cromossomo 13q14 e em uma região conservada do cromossomo 14 de murinos, e a sequência proteica humana e murina apresenta homologia de 83%. RANKL apresenta na

sua fração C-terminal extracelular o domínio de interação com o receptor (RANK e/ou OPG), e pode ser encontrado ligado à membrana celular ou solúvel após clivagem por metaloproteinases (MMP3 ou MMP7) ou ADAMs (*A Desintegrin and Metalloproteinase*) (SILVA, I.; BRANCO, 2011; WONG et al., 1997).

O papel do sistema RANK-RANKL-OPG no metabolismo ósseo foi inicialmente elucidado no final da década de 1990 em estudos que descreveram a função desta tríade proteica na osteoclastogênese, metabolismo ósseo e desenvolvimento de glândulas mamárias. RANKL pode se ligar ao receptor RANK localizado na membrana celular, assim como ao receptor-isca OPG, que devido à sua característica solúvel e capacidade de ligação ao RANKL, é responsável pelo bloqueio da ativação de RANK (LACEY et al., 1998; NAKAGAWA et al., 1998).

Após a sua formação, o complexo OPG/RANKL pode ser internalizado por meio de vesículas, constituindo uma forma de controle da viabilidade do OPG extracelular. Além disso, glicosaminoglicanos (GAGs) como heparinas, sulfato de heparina e sulfato de condroitina podem se ligar ao OPG através dos seus domínios de heparina e competir pela formação do complexo OPG/RANKL (**Figura 4**) (TAT et al., 2009; VEGA; MAALOUF; SAKHAEI, 2007).

**Figura 4.** Representação do processo da sinalização RANK/RANKL/OPG, internalização e degradação via lisossomal e proteossomal do complexo OPG/RANKL.



Fonte: Adaptado TAT et al., (2009, tradução nossa).

Legenda: **A**) Sinalização entre o RANKL solúvel (sRANKL) e o receptor de membrana RANK. **B**) Após a interação RANK/RANKL, há dimerização do receptor e propagação do sinal via intracelular. **C**) Processo de clivagem do RANKL ligado a membrana (mRANKL) por metaloproteinases, tornando-o solúvel. **D**) A internalização do complexo OPG/RANKL ocorre por meio de mecanismos de endocitose via clatrina, que

culmina com a degradação do conteúdo por vias lisossomal e/ou proteossomal. Osteoprotegerina (OPG); ligante do receptor do ativador de NF- $\kappa$ B (RANKL); receptor do ativador de NF- $\kappa$ B (RANK); metaloproteinases (MMPs); RANKL solúvel (sRANKL); RANKL ligado à membrana (mRANKL).

O complexo OPG/RANKL reflete os sinais do ambiente de remodelamento ósseo, uma vez que uma maior proporção favorece a deposição da matriz óssea, enquanto que uma baixa razão sinaliza a reabsorção por osteoclastos induzida pela alta ativação RANK-RANKL. Os monócitos são precursores de osteoclastos presentes na medula óssea e necessitam de estímulos do fator de crescimento para macrófagos (M-CSF) e de RANKL para a diferenciação em osteoclastos maduros através da indução de fatores de transcrição como o c-fos, NFATc1/2 e NF- $\kappa$ B (ROODMAN, 1999; YAMASHITA et al., 2007).

Além da expressão local, os níveis circulantes de RANKL e OPG também controlam o metabolismo ósseo como demonstrado por estudos em que administração de RANKL aumenta a reabsorção óssea e a de OPG diminui a ativação de osteoclastos. Baseado neste mecanismo molecular também foi desenvolvido o Denosumab®, um anticorpo monoclonal que mimetiza o OPG, e é utilizado para o tratamento de osteoporose em mulheres após a menopausa (PAGEAU, 2009).

Entretanto, diferente da osteocalcina, a expressão da tríade RANK-RANKL-OPG não é exclusiva do osso. A ativação RANK-RANKL participa no processo de ramificação e alveologênese de glândulas mamárias (FERNANDEZ-VALDIVIA et al., 2009), e a sinalização mediada por RANKL expressos principalmente na membrana de células T regula a sobrevivência e as atividades funcionais de células dendríticas (DCs) na ativação da tolerância imunológica (IZAWA et al., 2007), e RANKL expresso por queratinócitos contribui para a ativação de células T regulatórias (LOSER et al., 2006). O OPG é altamente expresso por diversas células como osteoblastos, linfócitos B, linfonodos, timo, medula óssea, além de pulmão, coração, fígado e outros, demonstrando origens diversificadas desse receptor que contribui para o balanço de ativação do sistema RANK-RANKL-OPG (BOYCE; XING, 2007; JOSIEN et al., 1999, 2000).

Osteoclastos são derivados de precursores mononucleares da linhagem mielóide de células hematopoiéticas, que também podem originar macrófagos. E diante da observação de que células reguladoras do sistema imune e do metabolismo ósseo são responsivas a uma mesma citocina (RANKL) e apresentam progenitores semelhantes, surgiu uma nova área de estudos denominada osteoimunologia, responsável por avaliar as interações entre o sistema imune e o tecido ósseo, expandindo assim estudos sobre artrite reumatoide, osteoporose,

osteoartrite e mieloma múltiplo (BOYCE; XING, 2008; MIYAMOTO et al., 2001; WALSH et al., 2006).

Em 2009, ISHII et al descreveu o papel da sinalização RANK-RANKL na maturação dos osteoclastos, células que apresentam alto consumo de ATP em função do bombeamento de prótons na lacuna de *Howship* e grande atividade de enzimas relacionadas à degradação da matriz mineral óssea. Assim, a atividade do sistema RANK-RANKL nessas células envolve a fosforilação de CREB e consequente ativação de PGC-1 $\beta$ , de modo a aumentar a atividade transcricional e estimular a formação de novas mitocôndrias a fim de suprir a demanda energética.

Recentemente, o nosso grupo descreveu o papel desse sistema no tecido adiposo, em que a ativação da via RANK-RANKL induz a diferenciação de adipócitos bege pelo processo descrito como *browning* ou escurecimento do tecido adiposo branco (MATSUO et al., 2020). Neste estudo, observamos que camundongos OPG<sup>-/-</sup>, que apresentam exacerbada ativação do eixo RANK-RANKL devido à ausência da competição por OPG, apresentavam intenso *browning* dos depósitos subcutâneo e visceral do tecido adiposo branco. Dessa forma, destaca-se a importância dos modelos geneticamente modificados como ferramenta para observações surpreendentes de fenômenos biológicos, especialmente sobre a comunicação interórgãos por meio de moléculas secretadas de forma parácrina ou endócrina e seus possíveis impactos fisiológicos.

Contudo, o camundongo OPG<sup>-/-</sup> também apresenta um esperado quadro de osteoporose em razão da excessiva ativação de osteoclastos. Assim, para superar a limitação do modelo animal geneticamente modificado, camundongos selvagens foram tratados com RANKL por meio de uma mini-bomba osmótica, e confirmamos sua ação no *browning* do tecido adiposo subcutâneo mesmo em doses 100x menor do que aquelas utilizadas em modelo de osteoporose (LESLIE et al., 2006; MATSUO et al., 2020). Interessante, o grupo tratado também apresentou aumento no consumo de oxigênio medido por calorimetria indireta, que indica um impacto de RANKL no metabolismo energético do animal (MATSUO et al., 2020).

O tecido muscular esquelético apresenta elevados níveis de expressão do RANK e significativa contribuição para o metabolismo energético, possui funções endócrinas e também é alvo de citocinas liberadas pelo tecido ósseo, mas o efeito da sinalização RANK-RANKL em fibras musculares saudáveis ainda não havia sido explorado. Assim, baseado nos estudos recentes da literatura sobre a unidade osso-músculo e nos dados publicados pelo nosso grupo, a hipótese do presente trabalho é que a ativação do eixo RANK-RANKL estimula a biogênese

mitocondrial nas fibras musculares saudáveis e induz a conversão de fibras para o perfil com o metabolismo predominantemente oxidativo.



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito de RANKL na biogênese mitocondrial e conversão das fibras musculares para o perfil oxidativo.

#### 3.2. Objetivos específicos

- a) Caracterizar o efeito da deleção de OPG no músculo esquelético de animais OPG<sup>+/-</sup> e OPG<sup>-/-</sup>;
- b) Avaliar o efeito de RANKL na expressão de marcadores mitocondriais em miotubos da linhagem C2C12;
- c) Investigar o papel de RANKL na ativação das vias de sinalização MAPK e CREB em miotubos da linhagem C2C12;
- d) Analisar a respiração celular de miotubos da linhagem C2C12 estimulados com RANKL;
- e) Avaliar os genes diferencialmente expressos identificados por RNA-Seq em miotubos da linhagem C2C12 estimulados com RANKL;
- f) Investigar o efeito do tratamento com RANKL nas taxas de respiração do músculo de camundongos selvagens saudáveis;
- g) Caracterizar o efeito do tratamento com RANKL na morfologia e distribuição dos tipos de fibras do músculo esquelético;
- h) Avaliar o efeito de RANKL em camundongos selvagens submetidos ao exercício físico de resistência.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Linhagens de camundongos

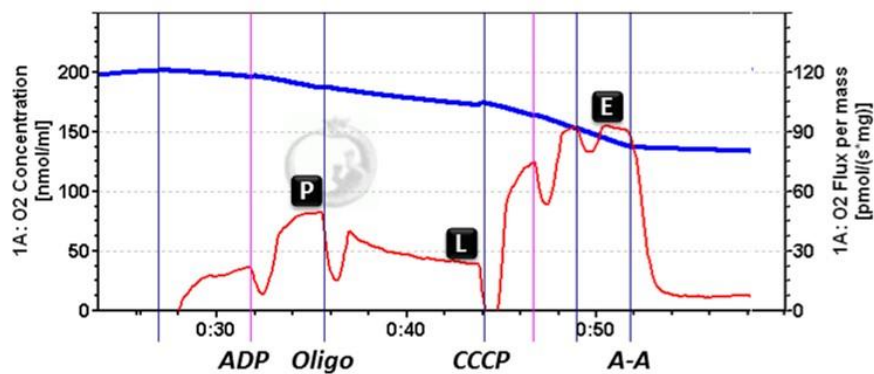
Foram utilizados camundongos machos (*Mus musculus*) com 8 semanas de idade da linhagem C57BL/6J *wild-type* (WT), proveniente do Biotério Geral da Prefeitura do Campus Administrativo da USP de Ribeirão Preto, a linhagem B6.129S4-Tnfrsf11b tm1Eac/J homocigoto *knockout* para proteína osteoprotegerina (OPG<sup>-/-</sup>) adquirida no *Jackson Laboratories* e, através do cruzamento das linhagens WT e OPG<sup>-/-</sup>, realizamos a seleção de animais com o genótipo heterocigoto para a expressão de osteoprotegerina (OPG<sup>+/-</sup>) para a formação de casais e estabelecimento da linhagem OPG<sup>+/-</sup>. Os genótipos dos animais foram confirmados e acompanhados regularmente através de genotipagem utilizando o kit REDEExtract – N-AMP (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Os camundongos foram mantidos no biotério do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, em micro-isoladores com rack ventilada em ciclo claro/escuro de 12h, em temperatura ambiente de  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , com ração e água *ad libitum*. A eutanásia dos camundongos foi realizada através da sobredosagem com solução anestésica de cetamina (262,5 mg/kg) (Syntec, Votuparim, SP, BRA) e xilazina (37,5 mg/kg) (Dopaser, Hertape Calier, Paulínea, SP, BRA) preparada em solução salina (PBS, *phosphate buffer solution*) e administrada por via intraperitoneal de acordo com as diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA. O óbito foi confirmado pela ausência de movimentos torácicos, sinais de respiração e batimentos cardíacos. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, seguindo as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e registrado sob o número de protocolo 0069/2020.

### 4.2. Respiração de fibras musculares esqueléticas permeabilizadas

Aproximadamente 6 mg do músculo sóleo foi condicionado em tampão BIOPS gelado (2.77 mM CaCl<sub>2</sub>EGTA anhydrous, 7.23 mM K<sub>2</sub>EGTA anhydrous, Na<sub>2</sub>ATP 5.77 mM, 6.56 mM MgCl<sub>2</sub>-6H<sub>2</sub>O, 20 mM Taurine, 15 mM Na<sub>2</sub>Phosphocreatine, 20 mM Imidazole, 0.5 mM Dithiothreitol – DTT e 0.5 mM MES) contendo saponina (0,01%) para realizar a permeabilização da membrana plasmática durante 20 minutos. Em seguida, os sóleos foram transferidos para 2 mL de solução MiR05 (0.5 mM EGTA, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 60 mM K-

lactobionate, 20 mM taurine, 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 20 mM HEPES, 110 mM sucrose, 1 g/L albumin, pH 7.1) a 37 °C sob agitação a 300 rpm. As taxas de respiração do tecido foram monitoradas no equipamento Oxygraph-2k (Oroboros, Innsbruck, Austria) em tempo real (**Figura 5**). O estado fosforilativo (P) foi avaliado após adição de 1 mM de ADP; em seguida, o estado não fosforilativo ou LEAK (L) foi determinado após adição de Oligomicina; a capacidade máxima de transporte de elétrons na cadeia transportadora (E) foi determinada após adição de 2  $\mu\text{M}$  com *carbonylcyanide-m-chlorophenylhydrazone* (CCCP) e o consumo de oxigênio residual (ROx) foi estabelecido após a inibição do complexo III com a adição de Antimycin A. Após a leitura no oxígrafo, o meio com tecido foi armazenado para posterior separação do tecido e quantificação de proteínas totais pelo método de Bradford, que é baseado na ligação de proteínas ao reagente *coomassie brilliant blue G-250*. A curva de calibração foi realizada com BSA e a absorbância medida pelo espectrofotômetro em 595 nm. Os resultados da quantificação foram utilizados para a normalização dos resultados e todos os dados apresentam-se após a subtração do valor do ROx. Os ensaios foram realizados em duplicata para cada animal.

**Figura 5.** Representação do monitoramento em tempo real das taxas de respiração no equipamento Oxygraph-2k.



Fonte: o autor.

Legenda: As taxas de respiração são acompanhadas em tempo real, permitindo a avaliação no consumo de oxigênio diante dos desafios bioquímicos a qual o tecido é submetido. O estado P representa a capacidade fosforilativa máxima da ATP sintase após adição do ADP. O estado não-fosforilativo ou LEAK (L) é determinado após a adição da Oligomicina. A capacidade máxima de transporte de elétrons na cadeia transportadora é determinada após titulações com CCCP e determinação do estado E. Por fim, após adição de Antimicina A, obtêm-se os valores do consumo de oxigênio residual. A linha vermelha representa o consumo de oxigênio instantâneo do tecido e a linha azul informa a quantidade de oxigênio na cuba em unidades de nmol/ml.

### 4.3 Implante de mini-bombas osmóticas

Camundongos WT com 8 semanas de idade receberam o implante subcutâneo da minibomba osmótica com capacidade de armazenamento de 100  $\mu$ l e liberação de conteúdo por um período de 28 dias. A inserção da minibomba (Alzet, Cupertino, CA) foi realizada na região dorsal após a administração de solução anestésica de cetamina (87,5 mg/kg) e xilazina (12,5 mg/kg). Os animais receberam um total de 1  $\mu$ g da proteína recombinante RANKL, que foi liberada de forma contínua a uma taxa de 0,11  $\mu$ l/hora, um equivalente a 1,8  $\mu$ g/kg/dia. O grupo controle foi submetido aos mesmos procedimentos para a implantação da minibomba osmótica carregada com solução veículo PBS. Foram utilizados 6 camundongos para cada grupo experimental.

### 4.4 Teste de exercício físico

Os animais foram submetidos a um período de adaptação à esteira motorizada (AVS Projetos Especiais<sup>®</sup>) durante 7 dias e carga de treino com duração média de 30 min com aumento gradual da velocidade em uma faixa entre 8 – 12 m/min sob inclinação de 19°. Após o período de adaptação, foi realizado o teste para identificar a velocidade máxima ( $V_{max}$ ) dos animais em uma condição anterior ao implante das minibombas osmóticas, que foram inseridas 48h após o teste, conforme descrito no item 1.2.

As cargas de treino foram realizadas em valores baseados em 60% da  $V_{max}$  obtida no período anterior à cirurgia, em sessões de aproximadamente 30 min, cinco vezes por semana em esteira motorizada e após 6h do início do ciclo escuro seguindo as condições estabelecidas na **Tabela 2**. As sessões são divididas em períodos de aquecimento, manutenção da carga e desaceleração gradual e, quando necessário, foram realizados leves toques no dorso do animal para estimular a corrida, não sendo empregado o uso de estímulos elétricos. Foram utilizados 6 animais por grupo.

**Tabela 2.** Condições de treinamento dos camundongos

Tempo (min)	2	2	4	8	10	2	2	2
Velocidade (m/min)	6	8	10	12	14	12	10	8

#### 4.5 Linhagem de mioblastos murinos imortalizados C2C12

Os mioblastos murinos C2C12 foram mantidos em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 100 U/ml penicilina e 100 µg/ml estreptomicina em estufa úmida a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram plaqueadas a uma concentração de 5x10<sup>4</sup> em placas de cultura de 35 mm e observadas até atingir cerca de 80% de confluência. A diferenciação em miotubos foi realizada em meio DMEM suplementado com 2% de soro de cavalo por um período de 5 dias, com troca de meio de cultura realizada a cada 2 dias e documentação por imagens com auxílio da câmera AxioCam ERc 5s (ZEISS®). O estímulo com a proteína recombinante RANKL foi realizado a partir do 5º dia de diferenciação.

#### 4.6 Extração de RNA e síntese de cDNA

Após o período de diferenciação e estímulo das células, o RNA foi coletado com auxílio do *TRI-reagent*® (Sigma Aldrich). Em seguida, as amostras foram homogeneizadas em vórtex e incubados à temperatura ambiente por 5 min. Em seguida, foram adicionados 1/5 do volume inicial de clorofórmio PA (Synth®), a amostra foi novamente homogeneizada e a separação da fase aquosa foi obtida após centrifugação a 18,8 XG a 4°C por 20 min. Então, a fase aquosa foi separada e precipitada após adição de Isopropanol PA (Synth®), seguido de nova centrifugação e descarte do sobrenadante. O *pellet* de RNA foi lavado com etanol 70%, centrifugado e, após descarte do sobrenadante, seco à temperatura ambiente e então eluído em água ultrapura. A quantificação e qualidade do RNA foi avaliada por meio de espectrofotômetro Nanovue Plus (GE Healthcare Life Science, Buckinghamshire, UK), admitindo-se a relação 260/280 (índice de absorbância) em valores entre 1,8 e 2,1. Após a quantificação, o RNA foi submetido ao tratamento com DNase I (#04536282001, Sigma Aldrich) para a remoção de eventual presença de DNA genômico.

O DNA complementar (cDNA) foi construído com concentrações de RNA  $\leq 2000$  ng por reação com o auxílio do *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems) de acordo com as recomendações do fabricante. Ao final da síntese do cDNA, as amostras foram aliquotadas e quantificadas no espectrofotômetro Nanovue Plus (GE Healthcare Life Science, Buckinghamshire, UK), admitindo-se a relação 260/280 (índice de absorbância) em valores entre 1,8 e 2,1.

#### 4.7 Análise da expressão gênica por reação em cadeia da polimerase em tempo real - RT-qPCR

Os níveis relativos mRNA foram calculados a partir da comparação com a normalização do CT em relação à expressão do mRNA do gene *Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase* (GAPDH). O método de detecção por fluorescência utilizado foi o QuantiTect SYBR<sup>®</sup> Green (QIAGEN), com 660 ng de cDNA para cada reação. A análise dos resultados ocorreu a partir do  $\Delta\Delta CT$  (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).

Os *primers* utilizados foram desenhados para regiões com anelamento entre dois éxons com o auxílio do software *PrimerQuest Tool* disponibilizado pela *Integrated DNA Technology – IDT* (<https://www.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>), seguindo os padrões descritos no

#### Quadro 1.

**Quadro 1.** Diretrizes para desenho dos *primers*.

Temperatura de <i>melting</i>	58 – 62 °C
% GC	45 – 55 %
Tamanho do <i>primer</i>	19 – 25 pb
Tamanho do amplicon	90 – 120 pb

Fonte: IDT (<https://www.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>).

Legenda: pares de base (pb); guanina e citosina (GC).

As sequências-alvo dos genes foram reconhecidas com o auxílio da biblioteca gênica do PubMed e a especificidade do *primer* foi avaliada através da ferramenta *Blast* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). A sequência dos primers utilizados estão descritas na

#### Tabela 3.

**Tabela 3.** Sequência dos *primers* utilizados no estudo.

<b>Gene</b>	<b>Forward (5' – 3')</b>	<b>Reverse (5' – 3')</b>
<i>ATP synthase</i>	CTGTGTCTGCCTCCCTCC	CAGGAAGGCTGCTTAGATGG
<i>Citrate synthase</i>	CAACATGGGAAGACAGTGG	GTGAGGATCAAGAACCGAAG
<i>Mfn-2</i>	ATGTTACCACGGAGCTGGAC	AACTGCTTCTCCGTCTGCA
<i>Opa-1</i>	CAGGAGAAGTAGACTGTGTC	TGTGACTTTATTTTGCACGG
<i>Nrf-1</i>	TGCCCAAGTGAATTACTCTGC	TCGTCTGGATGGTCATTTTAC
<i>Pgc-1<math>\alpha</math></i>	GCTATGGTTTCATCACCTACC	GTACAGCTCGAAGTCAGTTTC
<i>FNDC5</i>	GGACTCTTGAAAACACCACTG	TCCACACAGATGATCTCACCAC
<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	CCTATGTCTCAGCCTCTTCT	GGGAACTTCTCATCCCTTTG
<i>Atrogin</i>	AAGCAAGGAAGGAAGGAAAG	GGCTGAGGACATGTGAAAG
<i>MuRF-1</i>	GTGGGTTTGGAGACAAAGA	CTCCATAGCGTTTCCATCAG
<i>PTP-RG</i>	GAATGAGGACGAGAAGGAGAAG	ATTGTCTGGCTGAAGTCACTC
<i>Gapdh</i>	AACGGATTTGGCCGTATTG	GTGGTGGGAAGACACCAGTAGA

#### 4.8 Análise da expressão proteica por *Western Blotting*

O lisado celular foi coletado em 100  $\mu$ L do tampão de lise RIPA – 40 mM (Tris-HCl – 50 mM; NaCl - 150 mM; NP40 – 10%; Deoxicolato de sódio – 10%; SDS 10%). Em seguida, foram realizadas etapas de agitação e centrifugação a 13,8 XG por 5 min com posterior coleta do sobrenadante onde estão localizadas as proteínas. A quantificação total das proteínas foi realizada com *DC Protein Assay* (Bio-Rad Laboratories<sup>®</sup>) seguindo as instruções do fabricante. Quantidades equivalentes de proteínas (40  $\mu$ g de cada amostra) foram submetidas à eletroforese utilizando o gel SDS-PAGE – 10% (SDS – *sodium dodecyl sulfate* e PAGE – poliacrilamida) em separação induzida por amperagem de 35 mA em tampão de corrida (TRIS – 0,125M; Glicina 0,96M e SDS – 5%). A transferência para membranas PVDF de 0,2  $\mu$ m (*Immun-Blot*, Bio Rad<sup>®</sup>) ocorreu *overnight* a 25 V em Tampão de Transferência (Glicina – 0,19M; TRIS – 25 mM; Metanol – 15%). As membranas foram bloqueadas com albumina sérica bovina (BSA –

5%) e então os anticorpos primários foram incubados a 4°C *overnight*. As incubações foram realizadas com os anticorpos anti-PPAR $\gamma$  (#2453 - Cell Signaling Technology), phospho-ERK (#9101 - Cell Signaling Technology), total ERK (#4695 - Cell Signaling Technology), phospho-CREB (#9198 - Cell Signaling Technology), total CREB (#9197 - Cell Signaling Technology), phospho-p38 (#4631 - Cell Signaling Technology) e total p38 (#9212 - Cell Signaling Technology) diluídos em uma razão de 1:1000 em solução de bloqueio ou com o anticorpo mouse anti- $\beta$ -actin (ab8226 - Abcam) diluído na razão 1:10.000 em solução de bloqueio incubado nas mesmas condições. Foram utilizados os anticorpos secundários conjugados à peroxidase - *horseradish peroxidase (HRP)-conjugated sheep anti-rabbit IgG* (#7076 - Cell Signaling Technology) ou *anti-mouse IgG HRP-linker* (#7074 - Cell Signaling Technology) diluídos a uma concentração de 1:5000 e incubados a temperatura ambiente por 1h. A aquisição das imagens ocorreu após aplicação da solução Pierce™ ECL *western blot substrate* (32106) e exposição da membrana no fotodocumentador ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare). Os resultados foram realizados em triplicata biológica.

#### **4.9 Ensaio de respiração celular em miotubos da linhagem C2C12**

A taxa de consumo de oxigênio (OCR) foi quantificada em amostras de miotubos derivados de C1C12 com o auxílio do kit Seahorse XFe96 Extracellular Flux Analyzer (Agilent Technologies). As células foram plaqueadas a uma concentração de  $1 \times 10^4$  em microplacas de 96 poços e diferenciadas em miotubos conforme descrito anteriormente. O ensaio de respiração celular foi realizado em meio basal do *Seahorse*, suplementado com 10 mM de glicose, 1 mM de piruvato de sódio e 2 mM de glutamina, e a placa foi incubada a 37°C em ambiente sem CO<sub>2</sub> durante 1h antes da avaliação de OCR. O mesmo meio foi utilizado como veículo para a adição dos componentes do kit. As células foram desafiadas com a injeção sequencial de oligomicina (1,5  $\mu$ M), carbonil cianida 4-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP: 1,5  $\mu$ M) e antimicina A + rotenona (0,5  $\mu$ M). Todas as células foram submetidas ao mesmo protocolo: homogeneização (3 min) e leitura (3 min) por três vezes consecutivas. Os dados gerados foram normalizados de acordo com a quantidade de proteínas de cada poço após a conclusão do experimento. Os ensaios foram realizados em triplicata biológica.



#### **4.10 Análises histológicas**

Os músculos gastrocnêmio e sóleo foram dissecados de forma integral e congelado em isopentano resfriado em nitrogênio líquido (GOUSPILLOU et al., 2014). Cortes seriados de 10 µm foram realizados em criostato a -22°C e montados em lâminas silanizadas. Após, foram submetidos à coloração com Hematoxilina e Eosina (H&E). As imagens foram obtidas através do microscópio Scanscope (Olympus BX61VS). A área da secção transversal foi quantificada com o auxílio do programa Fiji (ImageJ).

#### **4.11 Ensaio de coloração por atividade enzimática da Succinil Desidrogenase (SDH)**

A detecção da SDH (*succinyl dehydrogenase*) foi realizada em cortes transversais (10 µm) da porção média do ventre do gastrocnêmio feitas em criostato a -20°C. Os cortes foram incubados com solução contendo tampão fosfato 0.2 M, pH 7.6, succinato de sódio 0.2 M e nitroblue tetrazolium 1.2 mM (NBT, Sigma-Aldrich®) a 37°C por 60 min, lavados com água deionizada por 1 min e montadas em glicerol. Imagens foram adquiridas com auxílio do microscópio de campo claro Olympus BX61 acoplado ao sistema VS120. Imagens foram salvas em formato TIFF (8 bit) e calibradas com escala de densidade (OD) utilizando o software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD) (BOSUTTI et al., 2016). A coloração de SDH foi calculada como a densidade óptica média. O dado por animal representa a média da quantificação da OD de 30 campos na porção vermelha do gastrocnêmio (n = 6).

#### **4.12 Imunofluorescência das cadeias de miosina no tecido muscular esquelético**

As análises da imunomarcagem dos diferentes tipos da cadeia pesada da miosina foram realizadas em cortes de 10 µm em criostatos com amostras dos músculos gastrocnêmio e sóleo. O processamento das amostras foi realizado conforme descrito anteriormente (GOUSPILLOU et al., 2014). Para imunofluorescência, o gastrocnêmio e sóleo foram dissecados e congelados em isopentano resfriado com nitrogênio líquido. Cortes seriados foram submetidos à imunodeteção conforme descrito previamente (GOODMAN et al., 2011). Em resumo, as amostras cortadas em criostato foram fixadas em acetona 20° por 10 min, e reidratadas com PBS (pH 7.2) por 15 min, incubadas por 30 min em PBS com 0.5% Triton X-100. O bloqueio antigênico foi feito com BSA (5% em PBS) por 1h seguida de incubação com os seguintes

anticorpos primários: *mouse IgG2b monoclonal anti-MHC type I (BA-F8, 1:25)*, *mouse IgG1 monoclonal anti-MHC type IIa (SC-71, 1:200)*, *mouse IgM monoclonal anti-MHC type Iib (BF-F3, 1:200)* e *rabbit IgG polyclonal anti-laminin (Sigma L9393, 1:750)*. Todos os anticorpos primários para detectar MHCs foram comprados da empresa *The Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB, University of Iowa, IA)*. Após lavagens com PBS, os cortes foram incubados por 1h com os respectivos anticorpos secundários: Alexa Fluor 350 *goat anti-mouse IgG2b (y2b)* (Invitrogen, A-21140, 1:500), Alexa Fluor 594 *goat anti-mouse IgG1 (y1)* (Invitrogen, A-21125, 1:100), Alexa Fluor 488 *goat anti-mouse IgM* (Invitrogen, A-21042, 1:500) e Alexa Fluor 488 *goat anti-rabbit IgG* (Invitrogen, A-11008, 1:500). Todos os anticorpos primários específicos para identificação das cadeias de miosina pesada foram adquiridos no *Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB, University of Iowa, IA)*. As imagens foram analisadas e quantificadas com o auxílio do software Fiji (ImageJ).

#### **4.13 Microscopia eletrônica de transmissão**

O gastrocnêmio dos animais foi isolado e imediatamente fixado em solução formada por glutaraldeído (2,5%), 2% de paraformaldeído em tampão cacodilato de sódio 0.1M por um período de 4h. Em seguida, as amostras foram transferidas para o tampão de cacodilato de sódio (pH 7,4) e incubado *overnight* a 4°C (MORROW et al., 2017). Os tecidos foram pós-fixados em tetróxido de ósmio em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,4) e, em seguida, contrastados em bloco com 1% de acetato de uranila. As amostras foram submetidas a cortes de 70nm em ultramicrotomo. As imagens foram adquiridas com o auxílio do microscópio eletrônico JEM-100CXII (JEOL, Peabody, MA, USA).

#### **4.14 Extração de DNA total e Análise da taxa mtDNA/nDNA**

A análise da razão mtDNA/nDNA (DNA mitocondrial/DNA nuclear) foi realizada através da quantificação do número de cópias de mtDNA em comparação com a quantidade de nDNA de acordo com o protocolo descrito anteriormente (QUIRÓS; MOTTIS; AUWERX, 2016). Após a diferenciação dos mioblastos em miotubos, o DNA total das células foi coletado em 600 µl de tampão de lise (NaCl – 3M, EDTA -0,5 M, SDS 20%, Tris-HCl – 1M) suplementado com proteinase K e posterior incubação a 55°C por 3h. RNase A (100 µg/ml) foi

adicionada para isolar o DNA. Após incubação a 37°C por 30 min, as amostras foram complementadas com 250 µl de acetato de amônio (7.5 M) e 600 µl de isopropanol, centrifugadas para formação de pellet, que foi ressuspenso em 100 µl de tampão Tris-EDTA para quantificação. Em seguida, o DNA total foi submetido a qPCR com método de detecção por fluorescência QuantiTect SYBR® Green (Qiagen®) para a análise da expressão dos genes 16S e GAPDH. A sequência dos primers utilizados está descrita na **Tabela 4**.

**Tabela 4.** Sequência dos *primers* utilizados para a quantificação da razão mtDNA/nDNA.

Gene	Forward (5' – 3')	Reverse (5' – 3')
<i>Gapdh</i>	AACGGATTTGGCCGTATTG	GTGGTGAAGACACCAGTAGA
<i>mtDNA NDI</i>	CTAGCAGAAACAAACCGGGC	CCGGCTGCGTATTCTACGTT

#### 4.15 Imunofluorescência em miotubos derivados da linhagem C2C12

A marcação de mitocôndrias foi realizada com o auxílio da sonda Mitotracker®Red CMXRos (M7512, Invitrogen). O ensaio foi realizado em miotubos da linhagem C2C12 cultivados em placas de 24 poços sobre lamínulas de vidro de 13 mm. A sonda foi adicionada em meio DMEM livre de SFB pré-aquecido a 37°C em concentração final de 50 nM e incubadas por 30 min em ambiente protegido da luz. Em seguida, o meio com a sonda foi retirado e os poços lavados duas vezes com PBS 1X e, então, as células foram fixadas por 15 min com paraformaldeído (4%) preparado em PBS 1X. Após a fixação, realizou-se mais uma etapa de lavagem e adição de DAPI (1:5000 preparado em solução de BSA 5%) por um período de 10 min. Após a marcação dos núcleos, foi realizada uma última etapa de lavagem e montagem das lâminas com auxílio do ProLong™ Gold Antifade Mountant – Thermo Fisher. As imagens foram adquiridas com o microscópio Leica CTR 6000 (Leica Microsystems) e quantificadas com o programa Fiji (ImageJ).

#### 4.16 Transfecção e ensaio de Luciferase

Mioblastos da linhagem C2C12 foram semeados em placas de cultura de 35 mm e, após atingir cerca de 80% de confluência, foram transfectados com 2 µg/ml de Lipofectamine® 2000

e 5 µg do plasmídeo pPPRE X3-TK-luc (#1015, Addgene). A atividade de luciferase foi quantificada de acordo com as instruções do fabricante (Promega®). As células foram coletadas em tampão de lise, a concentração proteica foi quantificada com o auxílio do kit DC Protein Assay (Bio-Rad Laboratories®) e a quantidade equivalente entre as amostras foi utilizada para normalização. As proteínas foram incubadas com a luciferina para avaliar a atividade de bioluminescência da luciferase, que foi medida em uma placa de 96 poços e os dados avaliados em contagem por segundo (CPS) no equipamento VICTOR *Multilabel Plate Reader* (PerkinElmer®).

#### **4.17 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

Após a administração da solução anestésica composta por cetamina (87,5 mg/kg) e xilazina (12,5 mg/kg), os animais foram submetidos à punção cardíaca para a coleta do sangue total. As amostras foram centrifugadas a 10 000 g por 10 min a 25°C e o soro foi transferido para um novo tubo. A quantificação dos níveis de proteínas séricas foi realizada com os *kits mouse* TRANCE/RANKL/TNFSF11 ELISA (MTR00, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), Osteoprotegerin/TNFRSF11B ELISA (MOP00, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), *mouse* IL-1β ELISA kit (R&D systems – MLB00C), *mouse* IL-6 ELISA kit (R&D systems – M6000B) e Irisina (*Mouse Irisin/FNDC5 ELISA Kit – NBP3-08118, Novus Biologicals*). Todos os ensaios foram realizados de acordo com as instruções do fabricante.

#### **4.18 Análise do RNA-Seq**

Os miotubos da linhagem C2C12 foram cultivados conforme o item 4.5. Após a extração do RNA, as amostras foram enviadas para o Instituto de Pesquisa do Câncer, Guarapuava, Paraná. A biblioteca foi preparada utilizando o *Illumina Stranded mRNA Sample Preparation Kit*, de acordo com o protocolo estabelecido pelo fabricante. O RNA extraído foi quantificado utilizando o Qubit assays (Life Technologies, USA) e quantificado para garantir a concentração de RNA necessária (500 ng). Em seguida, foi realizada a seleção e fragmentação do mRNA polyA, síntese da primeira e segunda fita, adenilação das extremidades 3' e ligação do adaptador. Cada biblioteca foi submetida a 15 ciclos de amplificação por PCR, e o tamanho e distribuição foram examinados com o auxílio do Agilent TapeStation (Agilent Technologies, Inc.) utilizando o D1000 ScreenTape. Todas as bibliotecas apresentaram bandas entre 200-500 pb com picos de aproximadamente 330pb. As bibliotecas foram quantificadas com auxílio do

Qubit 2.0 Fluorometer (Life Technologies, Inc.) e preparadas a uma concentração de 2.3 nM com 15 bibliotecas agrupadas e sequenciadas no sistema de sequenciamento Illumina NovaSeq Sequencing com leituras de 150 pb de extremidade pareada.

Os arquivos *bcl* foram gerados em sequência e convertidos a *fastq* utilizando o *software* *bcl2fastq* (v2.20.0.422). Baseado nos arquivos *fastq*, foi realizada a análise da qualidade dos dados utilizando o FastQC, seguido do alinhamento e mapeamento das leituras e sua comparação com genomas de referência (GRCm38.101) e contagem utilizando o RSEM *software* (v1.3.1) e, finalmente a classificação dos arquivos com o auxílio da ferramenta *samtools* (v1.11). Todas as contagens individuais das amostras foram agregadas, criando uma matriz única de leitura. A análise da expressão diferencial foi realizada utilizando o *DESeq2 package* (v1.30.1) e o enriquecimento funcional foi realizado utilizando o *clusterProfiler package* (v3.18.1). Os gráficos foram gerados utilizando o *ggplot2* (v3.3.3) e *ComplexHeatmap packages*(2.6.2) no R (v.4.0.5).

Todas as leituras foram normalizadas e analisadas utilizando o *software DESeq2 package* para análise da expressão diferencial no programa *R* (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014). Todos os grupos tratados (C2C12+RANKL) e os grupos controles (C2C12) contêm três amostras independentes. Os genes que não apresentaram contagem em todas as amostras foram excluídos. Os genes diferencialmente expressos (DEGs) foram selecionados baseados no FDR <0.01 e no  $\log_2 FC > 0.05$ .

#### **4.19 Análise estatística**

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). A significância estatística foi determinada pelo teste *one-way* ANOVA seguido pelo pós-teste Bonferroni. E o *t-Student* foi utilizado para análises com apenas dois grupos. Os valores de *p* menores que 0.05 foram considerados estatisticamente significativos. Os dados representam experimentos realizados em triplicata biológica e triplicata técnica independentes. Os resultados representam a média dos três eventos.

## 5 RESULTADOS

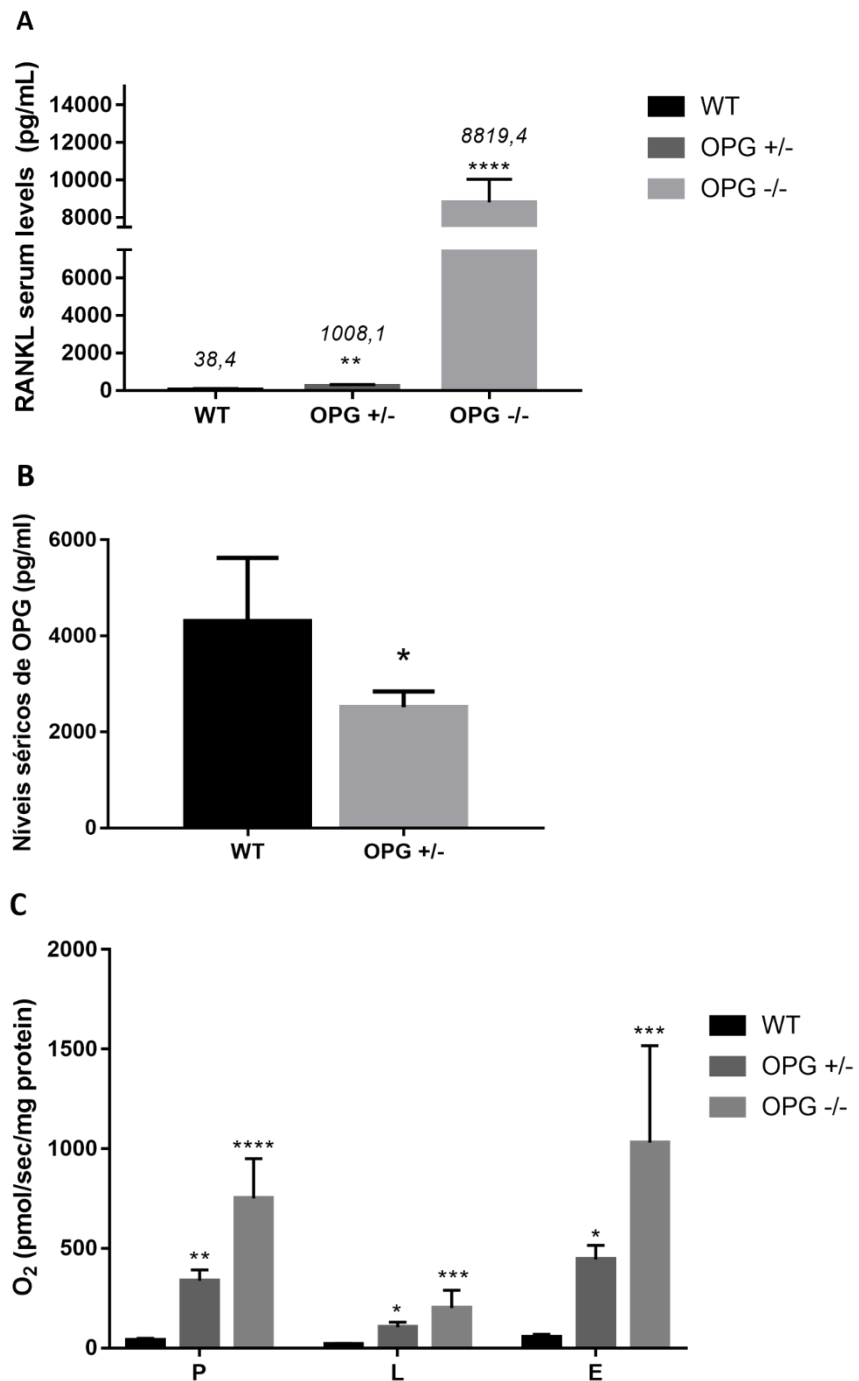
### 5.1. O efeito de RANKL circulante no consumo de oxigênio no tecido muscular esquelético.

Camundongos OPG<sup>-/-</sup> apresentam osteoporose causada pela exacerbada ativação da sinalização RANK-RANKL (BUCA Y et al., 1998), que estimula a reabsorção óssea e formação de novas mitocôndrias em osteoclastos (ISHII et al., 2009). Recentemente, relatamos que estes animais também apresentam intenso *browning* do tecido adiposo branco nos depósitos subcutâneos e visceral, e que a sinalização RANK-RANKL estimula o aumento do retículo mitocondrial em adipócitos bege (MATSUO et al., 2020). Assim, modelos animais geneticamente modificados são uma ferramenta importante para observações de fenômenos biológicos que ainda não foram explorados ou são inesperados naquele contexto, especialmente em estudos de moléculas com ação sistêmica.

Embora a sinalização RANK-RANKL-OPG seja fundamental para a homeostase do tecido ósseo, seu papel no tecido muscular esquelético saudável ainda não foi elucidado. Assim, avaliamos em camundongos o efeito da deleção parcial (OPG<sup>+/-</sup>) ou total (OPG<sup>-/-</sup>) da expressão da proteína OPG no músculo esquelético.

Os grupos OPG<sup>+/-</sup> e OPG<sup>-/-</sup> apresentaram elevados níveis de RANKL circulante em comparação ao grupo WT (**Figura 6A**), e o nível de OPG circulante reduz significativamente no grupo OPG<sup>+/-</sup> em relação ao grupo WT (**Figura 6B**). Os sóleos de camundongos OPG<sup>+/-</sup> e OPG<sup>-/-</sup> apresentaram aumento no consumo de oxigênio no estado de fosforilação oxidativa (*State P*), associado ao conteúdo mitocondrial, no estado com vazamento de prótons (*Leak*), relacionado com atividade de proteínas desacopladoras da matriz mitocondrial (UCP) e, também, no estado E (*State E*), que representa a capacidade máxima de transferência de elétrons da cadeia transportadora mitocondrial desacoplada mediante a titulação com FCCP quando comparados ao sóleo de camundongos WT. Ainda, o sóleo de animais OPG<sup>-/-</sup> apresentou taxas de consumo de oxigênio ainda maiores quando comparado grupo OPG<sup>+/-</sup>, o que pode indicar o efeito do aumento de RANKL circulante na capacidade de respiração muscular (**Figura 6C**).

**Figura 6.** Análise do impacto da hiperativação do eixo RANK-RANKL no consumo de oxigênio do tecido muscular esquelético.



Legenda: Análise dos níveis séricos da proteína RANKL em animais WT, OPG<sup>+/-</sup> e OPG<sup>-/-</sup> e taxas de consumo de oxigênio do sóleo desses animais. **A)** Níveis séricos de RANKL em animais WT, OPG<sup>+/-</sup> e OPG<sup>-/-</sup>. **B)** Valores da proteína OPG circulante em animais WT e OPG<sup>+/-</sup>. **C)** Consumo de oxigênio no estado fosforilativo (*State P*), no estado de vazamento de prótons (L, *Leak*), e consumo de oxigênio no estado de fluxo máximo desacoplado induzido por CCCP (E). Análise estatística realizada pelo Test *t* não pareado para comparações entre os grupos. (\**p*<0,05; \*\**p*<0,001) e Teste One Way ANOVA seguido pelo teste de comparações múltiplas Bonferroni. \* *p* < 0,05, \*\* *p* < 0,01, \*\*\**p* < 0,001, \*\*\*\**p* < 0001.

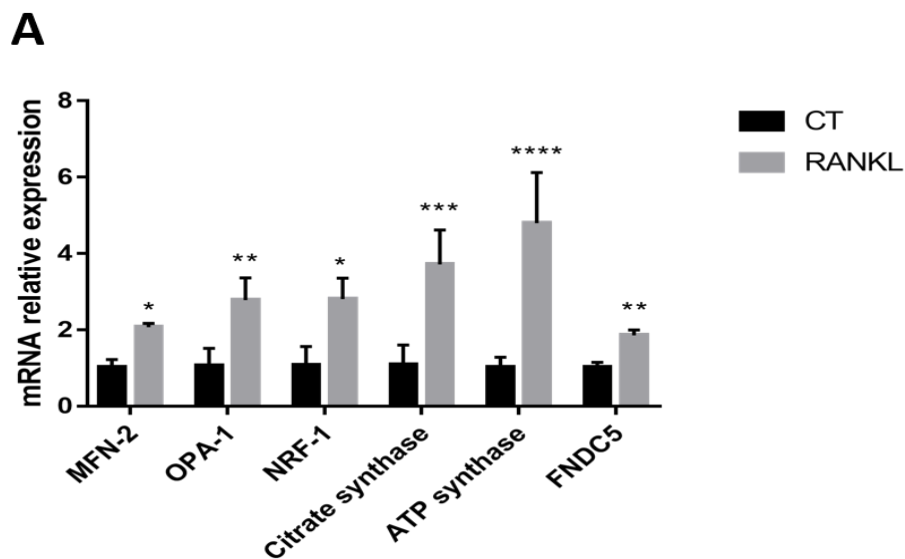
## 5.2. Efeito da sinalização de RANKL na expressão de marcadores mitocondriais em miotubos *in vitro* derivados da linhagem murina C2C12

Diante das evidências de que camundongos que apresentam a deleção parcial ou total de OPG apresentam maiores taxas de consumo de oxigênio em relação a animais selvagens, e que a via de sinalização RANK-RANKL está possivelmente envolvida no aumento do conteúdo mitocondrial no tecido muscular esquelético, decidimos avaliar o impacto da ativação dessa sinalização *in vitro* utilizando miotubos derivados da linhagem murina C2C12.

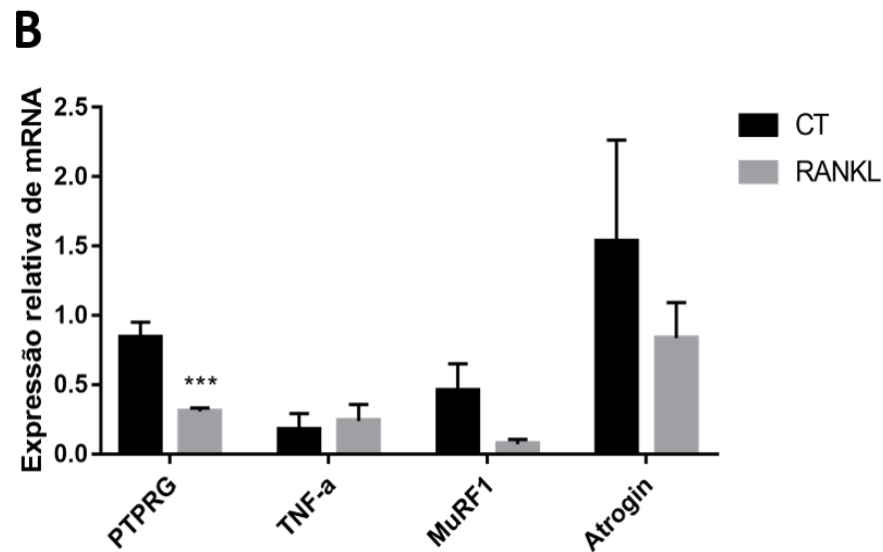
O estímulo com a proteína recombinante RANKL induziu o aumento na expressão gênica de marcadores de fusão mitocondrial, como MFN-2 e OPA-1, de enzimas envolvidas no metabolismo oxidativo como a citrato sintase e ATP sintase, além da maior expressão do mRNA de FNDC5, que tem seus níveis de expressão elevados no músculo esquelético de camundongos e humanos após a realização de atividades físicas (NOVELLE et al., 2013) (**Figura 7A**).

Apesar do receptor RANK ser descrito como ativador de NF- $\kappa$ B, os miotubos estimulados com RANKL por um período de 24h não apresentaram aumento na expressão de marcadores envolvidos em respostas inflamatórias ou degeneração muscular como o PTPRG, TNF- $\alpha$ , MuRF1 e Atrogina (**Figura 7B**).

**Figura 7.** Análise da expressão gênica de marcadores mitocondriais, inflamatórios e de atrofia em miotubos estimulados com RANKL.





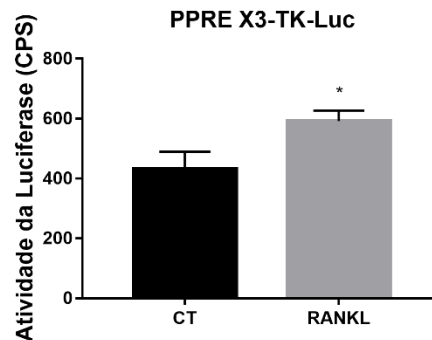


Legenda: Análise quantitativa da expressão gênica de marcadores mitocondriais em miotubos da linhagem C2C12 estimulados com RANKL por um período de 24h. **A)** Houve aumento na expressão dos genes MFN-2, OPA-1, NRF1, Citrato sintase, ATP sintase e FNDC5, mas não houve indução da expressão de marcadores pró-inflamatórios e de atrofia em miotubos (**B**). Análise estatística realizada pelo Test *t* não pareado para comparações entre os grupos. (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

O funcionamento das mitocôndrias está diretamente regulado pela atividade nuclear em um processo descrito como “regulação anterógrada”, que pode desencadear o aumento ou redução na atividade e biogênese mitocondrial de acordo com a necessidade celular. Além disso, essas organelas também desencadeiam a “sinalização retrógrada”, na qual há o envio de sinais enviados para o núcleo que alteram a expressão de genes celulares, como os da família de PPAR, e modificam a função e metabolismo celular e, desta maneira, forma o sistema de comunicação mitonuclear (QUIRÓS; MOTTIS; AUWERX, 2016).

Sendo assim, para avaliar se a sinalização RANK-RANKL culmina na ativação dos receptores da família dos PPAR, realizamos a transfecção de mioblastos da linhagem C2C12 com plasmídeo pPPRE X3-TK-luc, no qual a expressão de luciferase é dirigida pela ativação do Elemento Responsivo a PPAR (PPRE) presente na região promotora. Após a diferenciação em miotubos, as células foram estimuladas com RANKL por 24h e, após a coleta do material, detectamos um aumento na atividade de luciferase nas células estimuladas, o que indica que RANKL sinaliza para a ativação de fatores de transcrição da família dos PPARs (**Figura 8**).

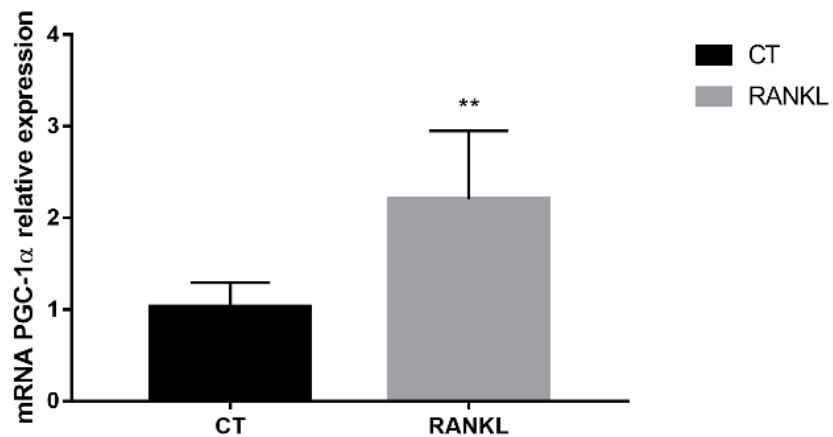
**Figura 8.** Ensaio de luciferase para detecção da ativação de elementos responsivos a PPAR (PPRE) em miotubos da linhagem C2C12.



Legenda: Análise quantitativa da atividade de luciferase (*count per second*) em miotubos da linhagem C2C12. Observa-se que o grupo estimulado com RANKL por 24h apresenta um aumento na detecção da atividade de luciferase. Análise estatística realizada pelo Test *t* não pareado para comparações entre os grupos (\* $p < 0.05$ ).

A ativação do PPRE em miotubos pode aumentar a expressão gênica de PGC-1 $\alpha$ , um dos principais fatores de transcrição envolvidos na biogênese mitocondrial. Identificamos por RT-qPCR que após 3h de estímulo com RANKL, há um aumento expressivo na detecção do mRNA de PGC-1 $\alpha$  (**Figura 9**).

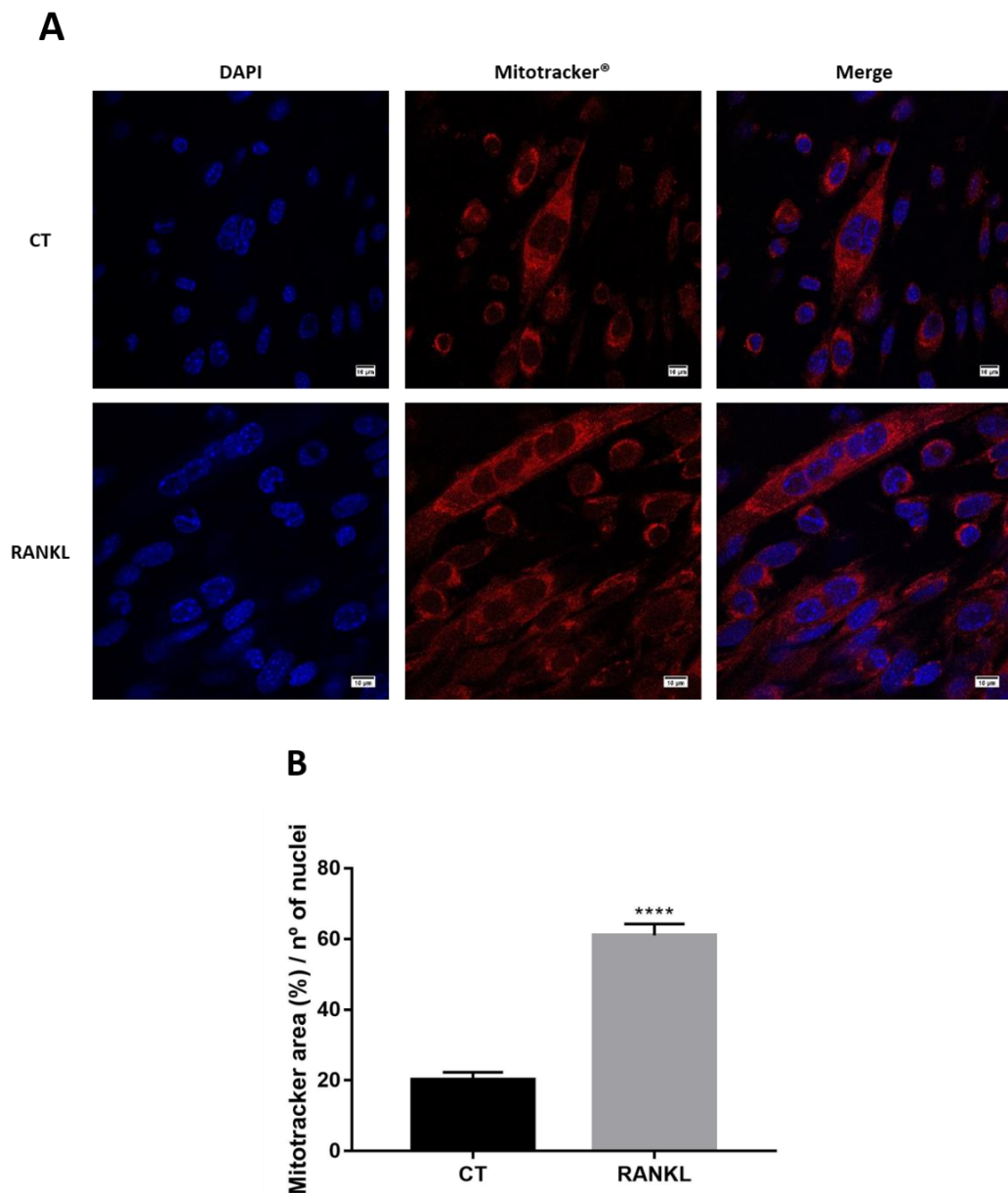
**Figura 9.** Análise da expressão gênica de PGC-1 $\alpha$  em miotubos derivados da linhagem C2C12.



Legenda: Análise quantitativa da expressão gênica de PGC-1 $\alpha$  em miotubos da linhagem C2C12 após 3h de estímulo com RANKL. Análise estatística realizada pelo Test *t* não pareado para comparações entre os grupos. (\* $p < 0.05$ ).

A incubação de miotubos com a sonda fluorescente MitoTracker<sup>®</sup> também revelou um alto conteúdo mitocondrial nas células estimuladas com RANKL por 24h em relação ao grupo controle (**Figura 10**).

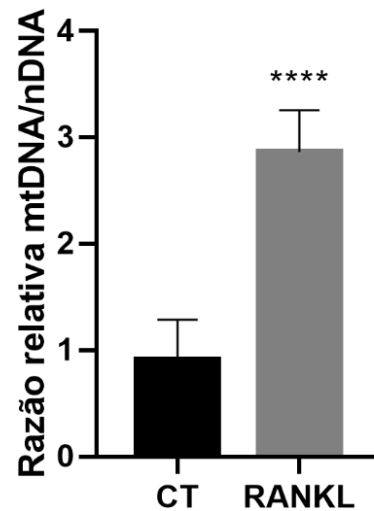
**Figura 10.** Análise do conteúdo mitocondrial através da marcação com a sonda fluorescente Mitotracker®.



Legenda: Marcação de mitocôndrias viáveis em miotubos da linhagem C2C12 estimulados com RANKL por 24h. **A)** Imagens representativas de miotubos da linhagem C2C12 marcados com a sonda fluorescente Mitotracker®. **B)** Análise quantitativa das imagens obtidas em microscópio de fluorescência, pelo método *threshold* utilizando o *software* ImageJ. Os valores foram normalizados pelo número de células. A análise estatística foi realizada através do Test *t* não-paramétrico (\*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

Além de aumentar o conteúdo mitocondrial, o estímulo com RANKL também induziu o aumento na razão de DNA mitocondrial em relação ao DNA nuclear (mtDNA/nDNA), que sugere a ação do eixo RANK-RANKL na biogênese mitocondrial (**Figura 11**).

**Figura 11.** Análise da expressão relativa de mtDNA/nDNA em miotubos estimulados com RANKL.



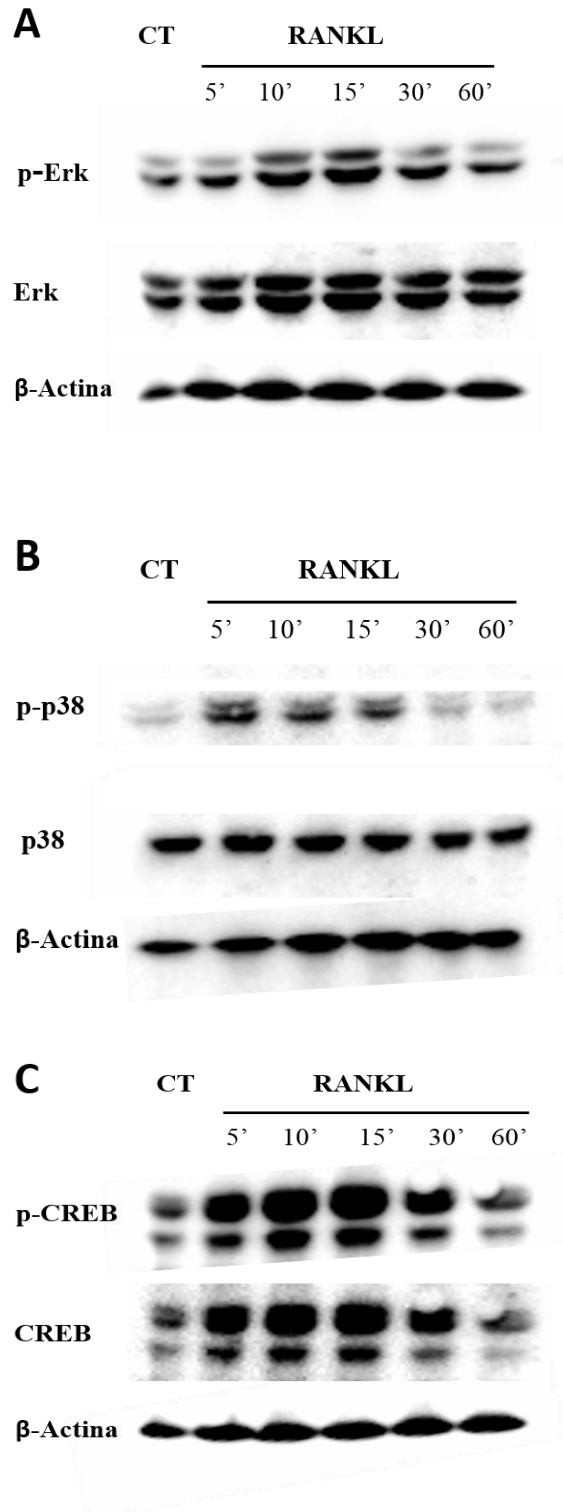
Legenda: Quantificação relativa dos níveis de mtDNA em razão da expressão de GAPDH em miotubos derivados da linhagem C2C12 e estimulados com RANKL por 24h. A análise estatística foi realizada através do Test *t* não-paramétrico (\*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

### 5.3. Análise da ativação do eixo MAPK e CREB em mioblastos da linhagem C2C12

Após a observação de que o estímulo com RANKL aumenta a expressão de marcadores e conteúdo mitocondrial em miotubos, avaliamos se RANKL ativa as vias clássicas envolvidas no metabolismo e biogênese mitocondrial do tecido muscular, como as vias das MAPK, ERK e p38, que contribuem para a adaptação do tecido muscular a estímulos como o exercício físico e conversão de fibras musculares para um perfil mais oxidativo (RANEY et al., 2005; TURCOTTE; RANEY; TODD, 2005), e a via de CREB, que é descrita em respostas de biogênese mitocondrial em osteoclastos (ISHII et al., 2009).

O estímulo com RANKL induziu a fosforilação das proteínas da via de ERK, p38 e CREB, possivelmente reforçando os sinais de biogênese mitocondrial e mudanças metabólicas para um perfil com maior capacidade oxidativa (**Figura 12**).

**Figura 12.** Análise da ativação do eixo MAPK-ERK e CREB em miotubos da linhagem C2C12.



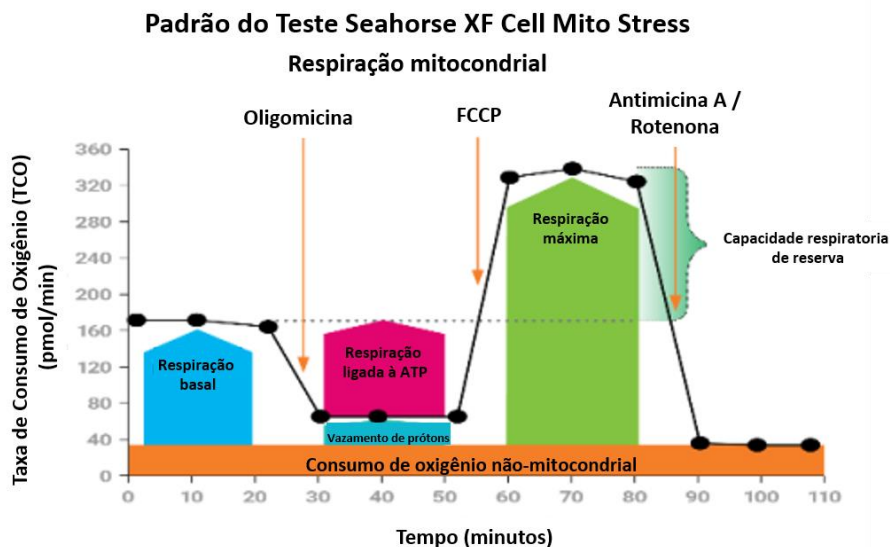
Legenda: Avaliação da ativação das vias de ERK, p38 e CREB através do *western blot* em miotubos estimulados com RANKL em intervalos de até 60 min. **A)** Análise da ativação de ERK através da detecção da fosforilação (p-ERK) em miotubos estimulados com RANKL, assim como é possível observar a ativação da via de p38 por meio da detecção de p-p38 (**B**) e um padrão de intensa fosforilação da via de CREB (p-CREB) no intervalo de até 30 min após o estímulo com RANKL (**C**), que confirma a participação destas vias na sinalização do eixo RANK-RANKL.

#### 5.4. Efeito da sinalização do eixo RANK-RANKL na respiração celular em miotubos da linhagem C2C12

Diante do efeito de RANKL em aumentar a expressão de marcadores da biogênese mitocondrial e ativar vias descritas na adaptação do metabolismo oxidativo, avaliamos seu efeito na taxa de consumo de oxigênio dos miotubos da linhagem C2C12 através de quantificações pelo equipamento *Seahorse XFe96 Extracellular Flux Analyzer* (Agilent Technologies).

De acordo com a ilustração na **Figura 13**, a primeira análise realizada é a taxa de respiração basal, que demonstra a demanda energética das células na ausência de estresse metabólico. Em seguida, ocorre a injeção de Oligomicina, que inibe a porção  $F_0$  da ATP sintase (complexo V da cadeia transportadora de elétrons - CTE), que reduz a taxa de respiração mitocondrial e permite avaliar a proporção da taxa de consumo de oxigênio na respiração basal que é utilizada na atividade da ATP sintase. Em seguida, adiciona-se o FCCP, que induz o colapso do gradiente de prótons, desfaz o potencial da membrana mitocondrial, retira a inibição do fluxo de elétrons através da CTE e, dessa forma, permite avaliar o nível máximo de consumo de oxigênio e a taxa respiratória de reserva (*spare*). Na terceira e última etapa, ocorre a injeção da mistura de Rotenona (inibidor do complexo I) e Antimicina (inibidor do complexo III), que interrompe de forma irreversível a respiração mitocondrial (DIVAKARUNI et al., 2014).

**Figura 13.** Análise do padrão de respostas do kit *XF Cell Mito Stress* – Agilent.

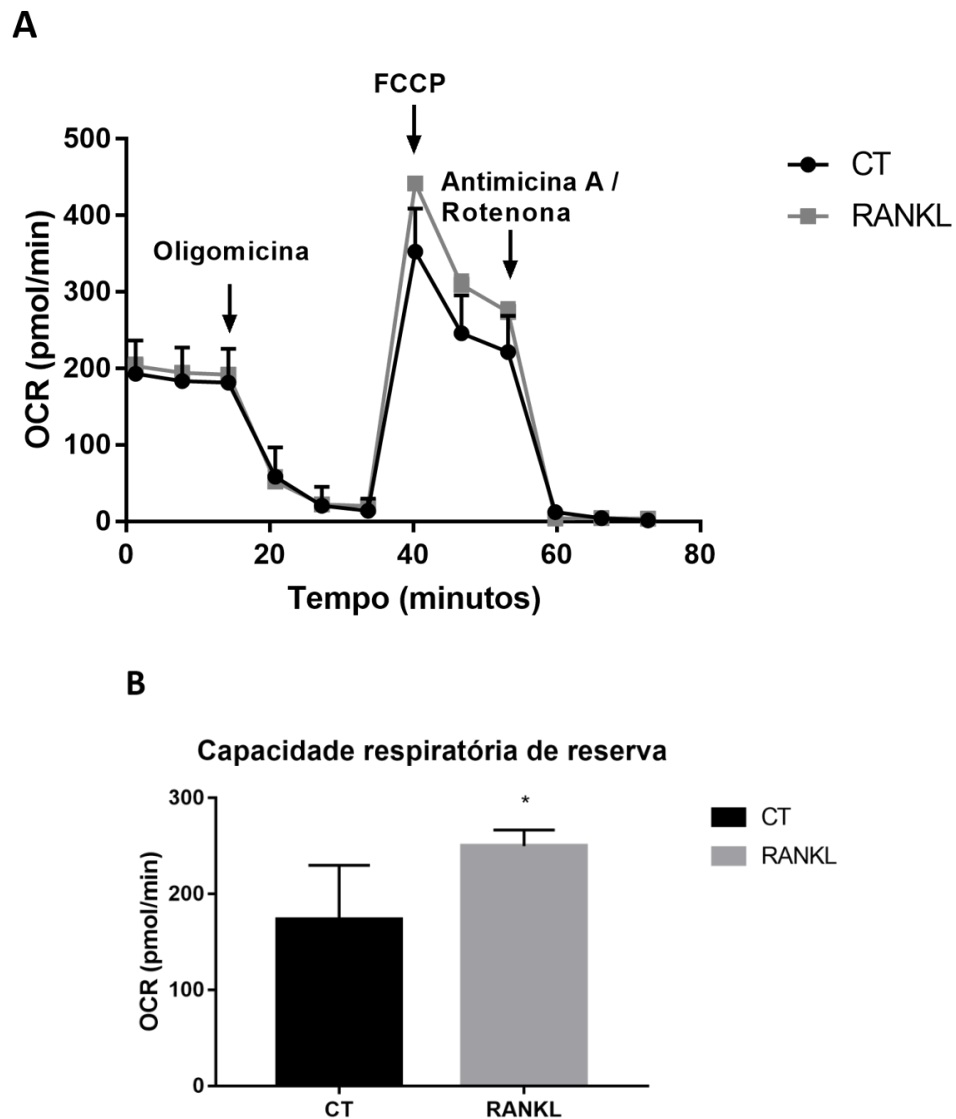


Fonte: Adaptado de Agilent Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit (User Guide Kit 103015-100)

Legenda: Série de etapas de acordo com o padrão do kit para avaliar função mitocondrial da Agilent Seahorse XF Cell Mito Stress.

As células estimuladas com RANKL apresentaram uma maior capacidade respiratória de reserva (*spare*), que é calculada a partir da diferença entre a capacidade de respiração máxima e a taxa de respiração basal (Figura 14), e uma das formas de avaliar o potencial de adaptação da resposta metabólica diante do aumento de demanda energética celular (NICHOLLS et al., 2010).

**Figura 14.** Análise das taxas de consumo de oxigênio em miotubos derivados da linhagem C2C12



Legenda: Fluxo de consumo de oxigênio em miotubos derivados da linhagem C2C12 controle e estimulados com RANKL. Aferições realizadas em triplicata no estado basal (basal) e após adições sequenciais de Oligomicina, FCCP e mix contendo Antimicina A e Rotenona (A). As análises demonstraram que as células estimuladas com RANKL apresentaram maior capacidade de reserva respiratória (B). A análise estatística foi realizada através do Test *t* não-paramétrico (\* $p < 0.05$ ).

Dessa forma, esse conjunto de resultados demonstra que o estímulo com RANKL aumenta a capacidade bioenergética mitocondrial *in vitro* em miotubos derivados da linhagem C2C12 através do aumento da expressão de marcadores mitocondriais, sinalização de vias envolvidas na adaptação metabólica e no maior consumo de oxigênio.

### 5.5. Análise do RNA-Seq em miotubos derivados da linhagem C2C12

As respostas moleculares da sinalização do eixo RANK-RANKL também foram analisadas com maiores detalhes através do sequenciamento de mRNA (RNA-Seq). As análises demonstraram 68 genes diferencialmente expressos no grupo estimulado com RANKL, dos quais foram selecionados os 50 genes com maior taxa de aumento de expressão para análises funcionais (**Figuras 15A e 15B**). A análise do enriquecimento funcional demonstrou aumento significativo nas vias de sinalização ERK, assim como e em outras vias envolvidas na reorganização da estrutura da matriz extracelular, em sinalizações do controle da homeostase do cálcio e fatores de crescimento do endotélio vascular (**Figuras 15C**) e na expressão dos genes *Ccl2*, *Ccl5* e *MMP9* (**Figura 15D**).

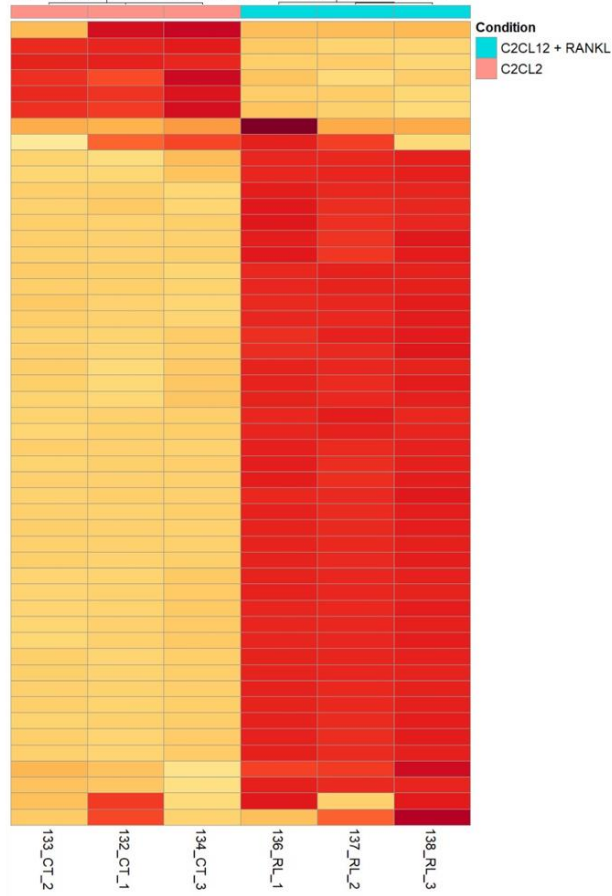
**Figura 15.** Análise dos genes diferencialmente expressos entre miotubos da linhagem C2C12 controle e estimulados com RANKL.



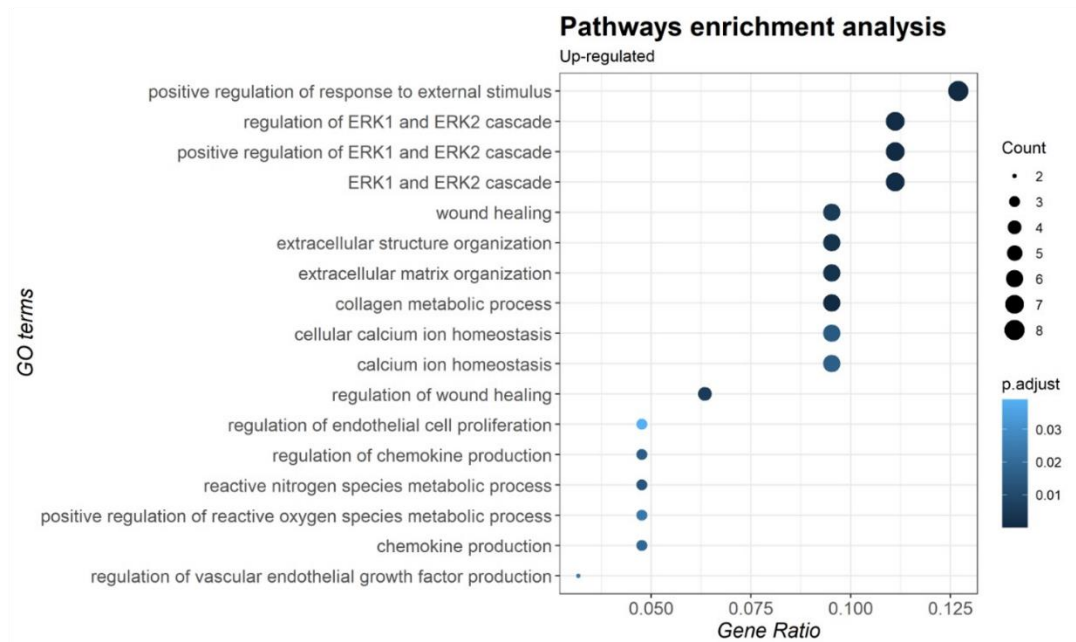


**B**

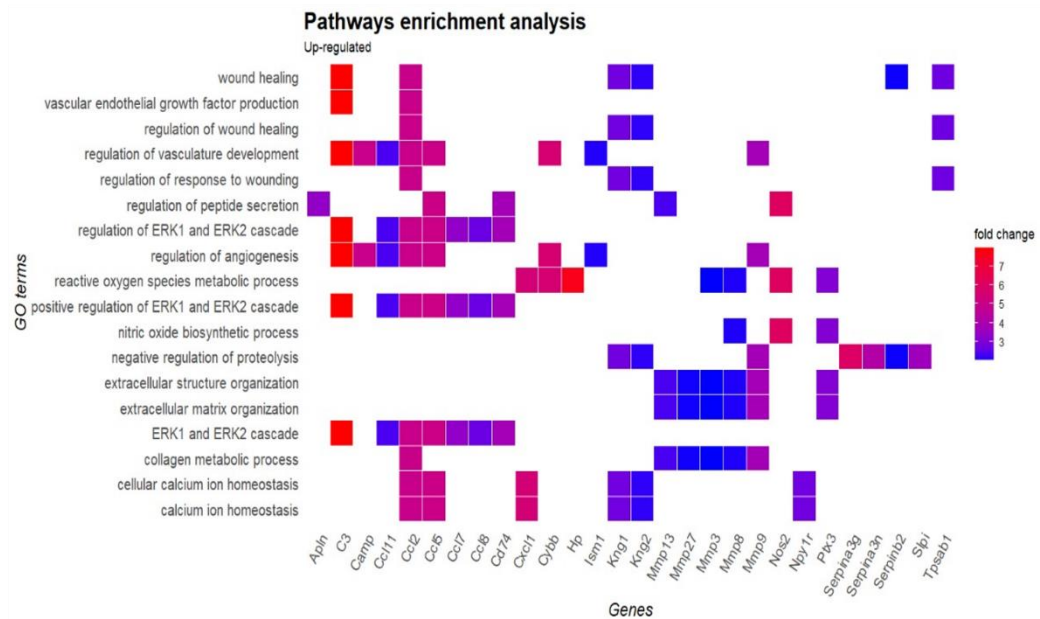
Clusterization of Differential Expressed Genes by Z-score



**C**



D



Legenda: **A)** Gráfico *Volcano* das amostras obtidas do RNA-Seq de miotubos derivados da linhagem C2C12 estimulados com RANKL **B)** *Heatmap* representando os 50 genes com maior intensidade de expressão diferencial entre os grupos controle e estimulado com RANKL. **C)** Vias que apresentaram enriquecimento funcional em miotubos estimulados com RANKL. **D)** *Heatmap* representando as principais vias de sinalização ativadas pelos genes mais expressos em miotubos da linhagem C2C12 estimulados com RANKL.

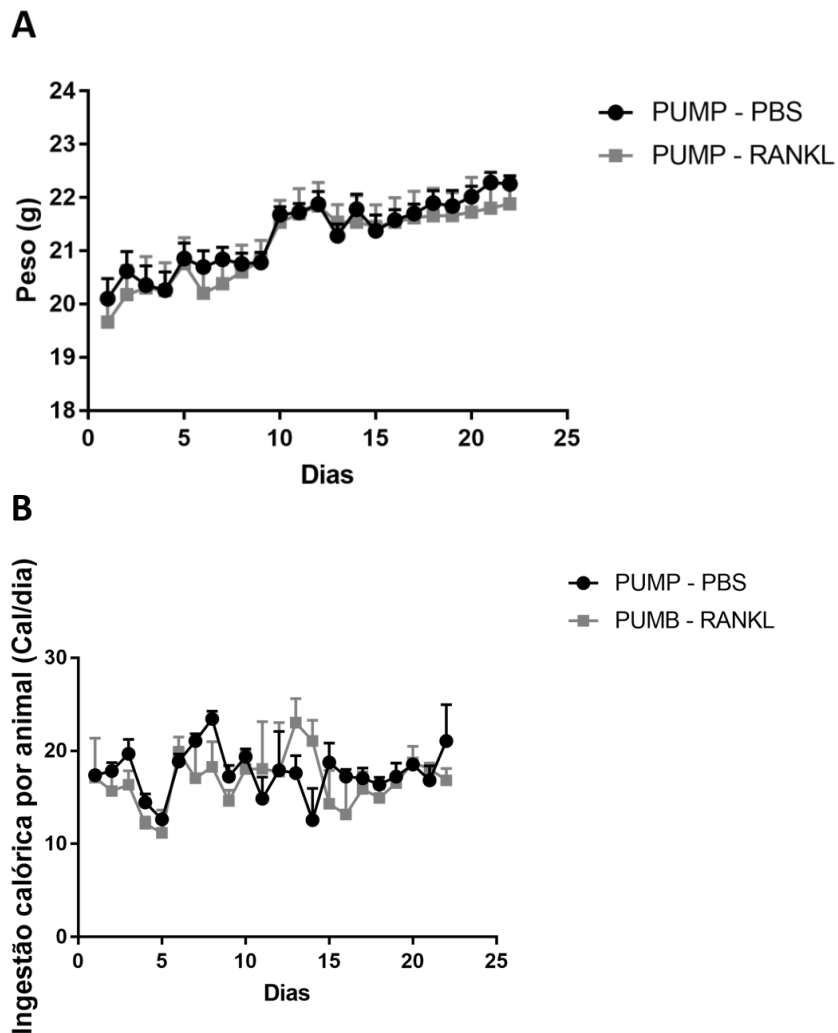
Dessa forma, os resultados do RNA-Seq corroboram os achados descritos nas seções anteriores e destacam o potencial de RANKL na ativação de vias de sinalização envolvidas na biogênese mitocondrial e reorganização da matriz extracelular do tecido muscular esquelético, fundamentais para a adaptação do músculo frente a aumento da demanda energética, especialmente através da via de ERK, que é descrita como fundamental para a adaptação do metabolismo de lipídios e conversão de fibras do músculo esquelético para o perfil metabólico predominantemente oxidativo (BOYER et al., 2019; TURCOTTE; RANEY; TODD, 2005).

## 5.6. A ativação de RANK-RANKL aumenta o consumo de oxigênio e induz o perfil de fibras oxidativas no músculo esquelético

Para avaliar o efeito de RANKL no tecido muscular esquelético *in vivo* e comprovar a relevância fisiológica dos achados obtidos na linhagem celular C2C12, realizamos a infusão da proteína RANKL recombinante através de minibombas osmóticas (*pump*), que permite a liberação contínua da proteína na região subcutânea dorsal. Ao utilizar camundongos WT, o

experimento também exclui interferências não identificadas do *background* genético dos camundongos OPG<sup>+/+</sup> e OPG<sup>-/-</sup> na análise do efeito de RANKL. A *pump* permite a liberação de 0,11µl/h da solução controle (PBS) e solução de RANKL durante o período de 28 dias, totalizando a infusão de 1 µg da proteína RANKL. Durante esse período, observamos que não houve diferença no ganho de peso e ingestão calórica desses animais (**Figura 16**).

**Figura 16.** Análise do ganho de peso e ingestão calórica nos camundongos ao longo de 28 dias com a implantação da mimibomba osmótica (*pump*).



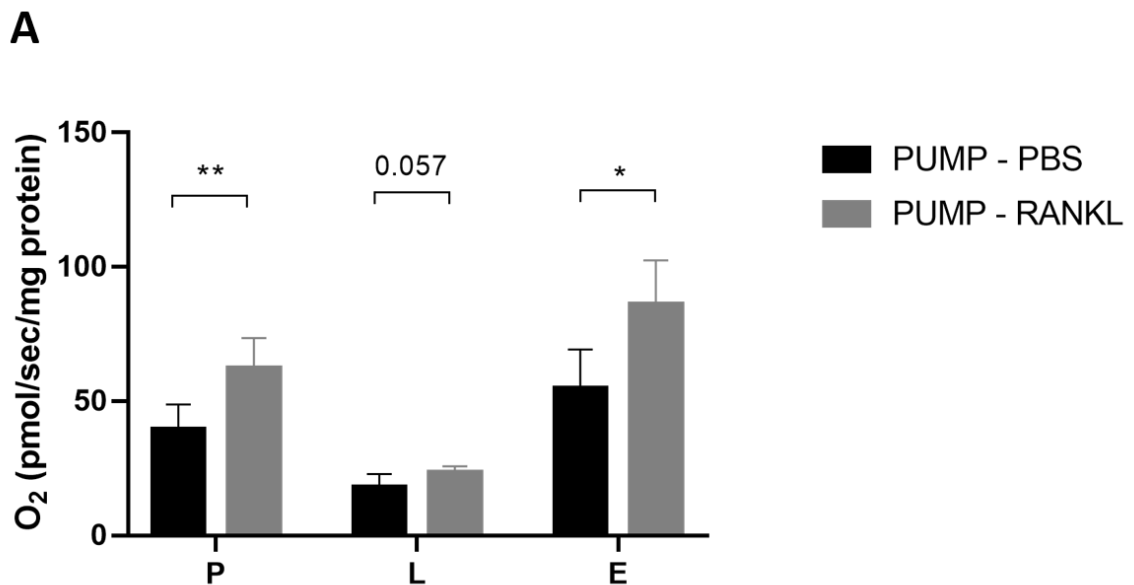
Legenda: A infusão de baixas doses de RANKL através da minibomba osmótica durante o período de 28 dias não altera o ganho de peso (**A**) e a ingestão calórica dos camundongos (**B**). As comparações entre os dois grupos foram realizadas por meio do Test *t* não-pareado.

As taxas respiratórias do sóleo foram avaliadas *ex vivo* com o auxílio do Oxygraph-2k (Oroboros Instrument, Innsbruck, Austria). Este músculo foi escolhido por causa da sua relativa homogeneidade nos tipos de fibras musculares, o que permite maior uniformidade experimental, pois o uso de músculos com maior diversidade na composição de fibras

musculares aumenta o risco de alterações em pequenas regiões da coleta, o que influencia o resultado do experimento.

Dessa forma, a coleta do sóleo foi realizada imediatamente na sequência ao sacrifício dos animais e, após preparação do tecido e quantificações das taxas de respiração do tecido, observamos que o tratamento de RANKL resultou no aumento da fosforilação oxidativa (estado P) e na capacidade de respiração desacoplada (estado E), obtida após titulações com CCCP, que estimula o consumo máximo de oxigênio. E apesar da tendência de aumento no estado L, a diferença não foi significativa em relação ao grupo controle (**Figura 17**).

**Figura 17.** Análise da infusão de RANKL nas taxas de consumo de oxigênio em músculos de camundongos.



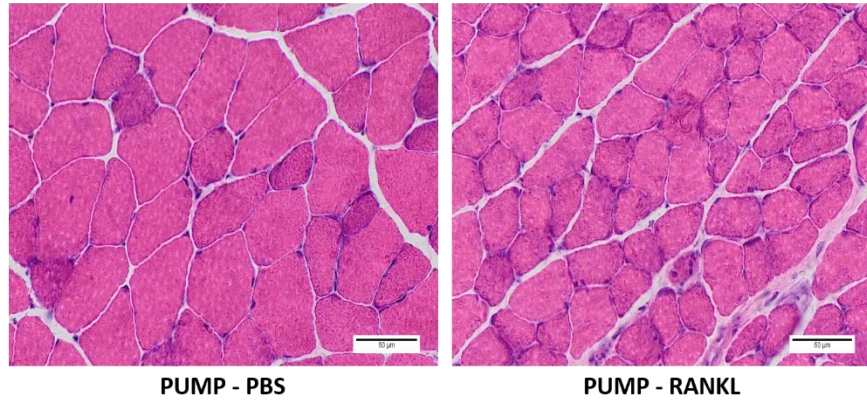
Legenda: O tratamento com RANKL realizado por meio de minibombas osmóticas no aumento da capacidade de fosforilação oxidativa não alterou o vazamento de prótons através de proteínas desacopladoras (P) e induziu o aumento do consumo máximo de oxigênio após o desacoplamento do potencial da membrana mitocondrial (E). As comparações entre os dois grupos foram realizadas por meio do Test *t* não-pareado. \* $p < 0.01$ ; \*\* $p < 0.001$ .

Análises histológicas de cortes corados com H&E revelaram que os animais que receberam a infusão com RANKL apresentaram uma redução na área seccional da fibra muscular no gastrocnêmio e sóleo dos camundongos (**Figura 18**).

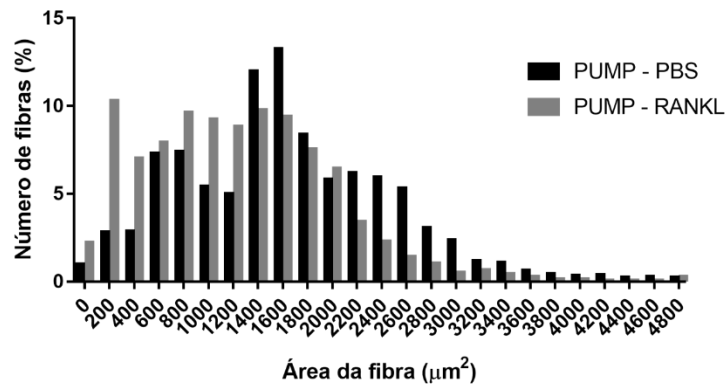
**Figura 18.** Análise histológica do gastrocnêmio e sóleo corados por Hematoxilina & Eosina.

**Gastrocnêmio**

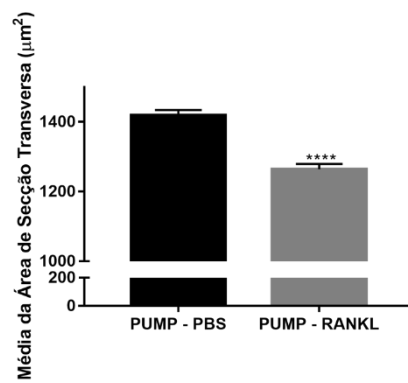
**A**

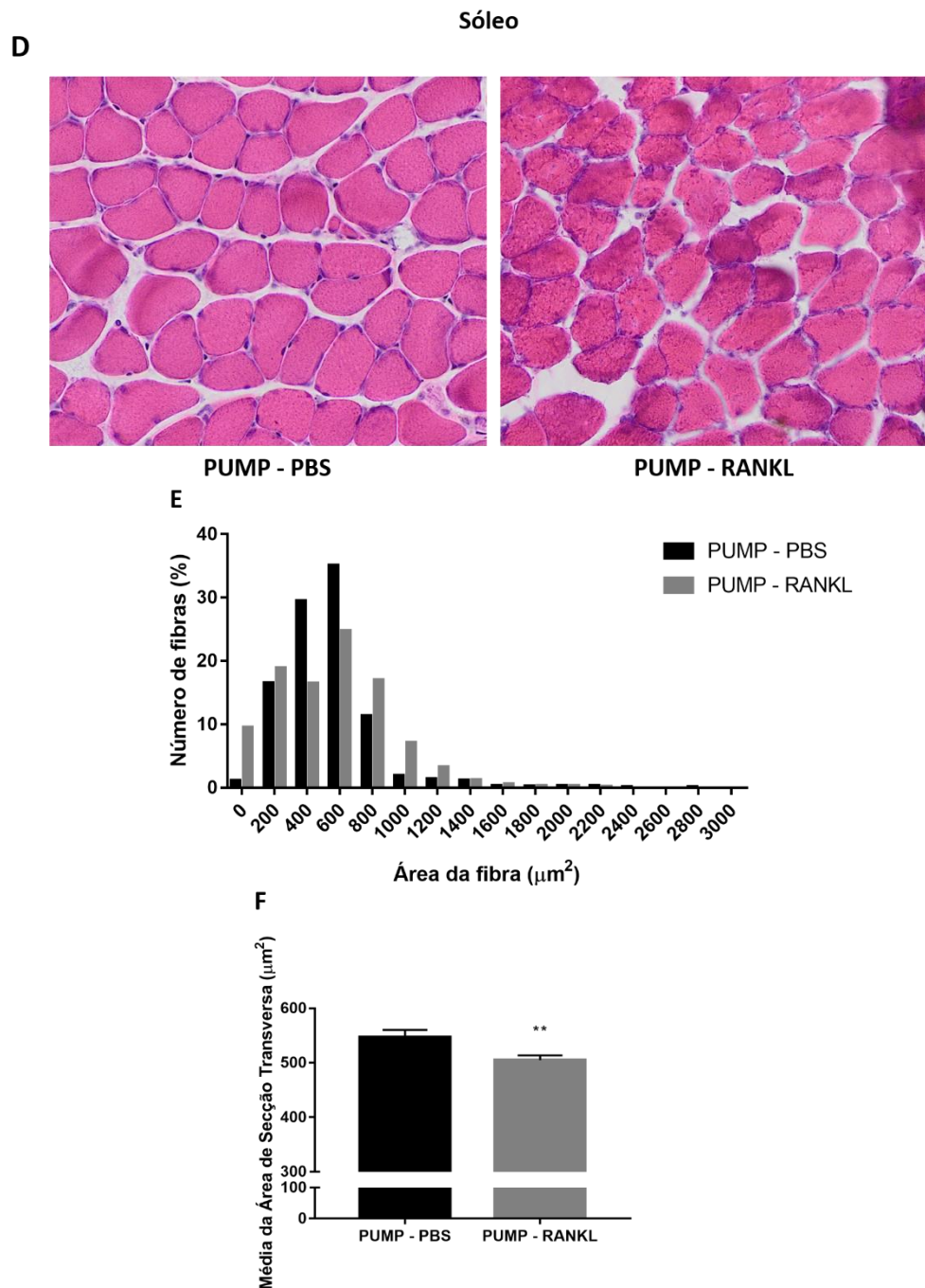


**B**



**C**



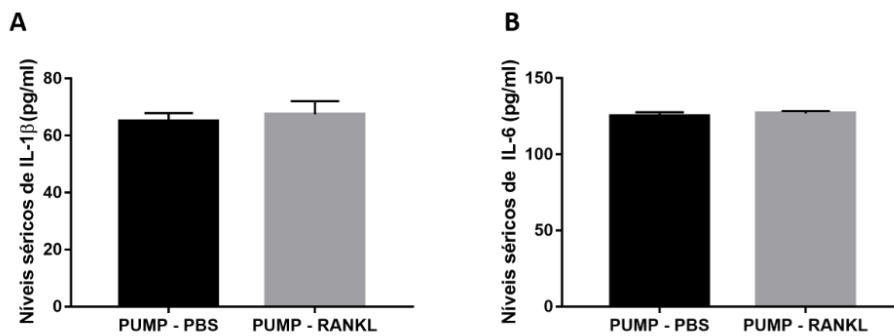


Legenda: Os efeitos do tratamento com RANKL realizado por meio de minibombas osmóticas na histologia do tecido muscular esquelético. **A)** Imagens representativas de cortes seriados do gastrocnêmio corados com H&E (aumento de 200x). **B)** Distribuição da área seccional das fibras musculares do gastrocnêmio. **C)** Média da área de secção transversão, demonstrando que houve uma redução na área em  $\mu\text{m}^2$  das fibras musculares dos animais tratados com RANKL. **D)** Imagens representativas de cortes seriados do gastrocnêmio corados com H&E (aumento de 200x). **E)** Distribuição da área seccional das fibras musculares do sóleo. **F)** Média da área de secção transversão no sóleo, demonstrando que houve uma redução na área em  $\mu\text{m}^2$  das fibras musculares do sóleo de animais tratados com RANKL. As comparações entre os dois grupos foram realizadas por meio do Test *t* não-pareado. \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

A redução na área seccional das fibras musculares é mais um indício da possível conversão do fenótipo das fibras musculares, uma vez que as fibras vermelhas apresentam área

menor em relação às aquelas com metabolismo predominantemente glicolítico (GAUTHIER; PADYKULA, 1966). Destaca-se que as fibras musculares não apresentam indícios de alterações morfológicas, como mudanças na posição do núcleo ou aumento na deposição de matriz extracelular. E apesar de RANKL ser classicamente descrito como um ativador de NF- $\kappa$ B (ANDERSON et al., 1997), com potencial para aumentar a inflamação, não observamos infiltrados celulares ou aumento nos níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$  e IL-6 após a infusão de RANKL (**Figura 19**).

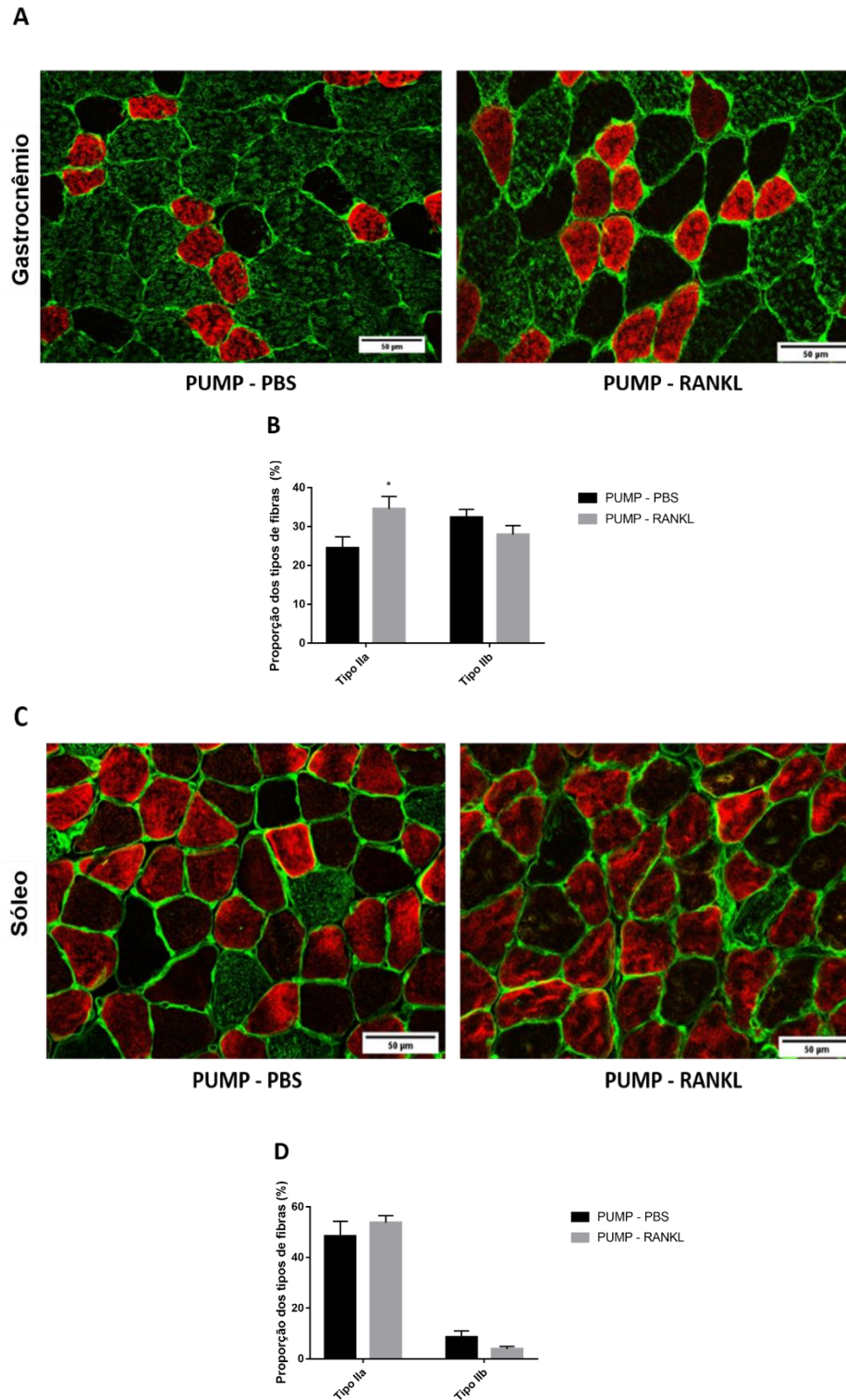
**Figura 19.** Quantificação sérica de IL-1 $\beta$  e IL6 em camundongos



Legenda: A infusão de RANKL não aumentou os níveis circulantes das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  (A) e IL-6 (B). Comparações realizadas com o Test *t*.

O fenótipo das fibras musculares do sóleo e gastrocnêmio foi avaliado a partir da expressão das isoformas da cadeia de miosina (MHC) do tipo IIa, IIb e IIx através da imunofluorescência. No grupo RANKL, encontramos o aumento na porcentagem de fibras do tipo IIa no gastrocnêmio em relação ao grupo controle, o que indica um aumento no perfil de fibras com metabolismo predominantemente oxidativo. Contudo, não observamos mudanças significativas no padrão das fibras IIa do sóleo, que é um tecido em que já predomina fibras com características oxidativas. Assim, a ação de RANKL na mudança do padrão de expressão das cadeias de miosina pode ser mais efetiva em tecidos com maior plasticidade, como o gastrocnêmio (**Figura 20**). Em nossos ensaios, não conseguimos detectar a imunomarcagem das fibras do tipo I com o anticorpo comercial disponível. E por isso também não conseguimos estimar a presença das fibras IIx, que seriam identificadas pela exclusão da marcação com coquetel de anticorpos para I, IIa e IIb.

**Figura 20.** Análise da expressão das isoformas da cadeia de miosina por imunofluorescência.

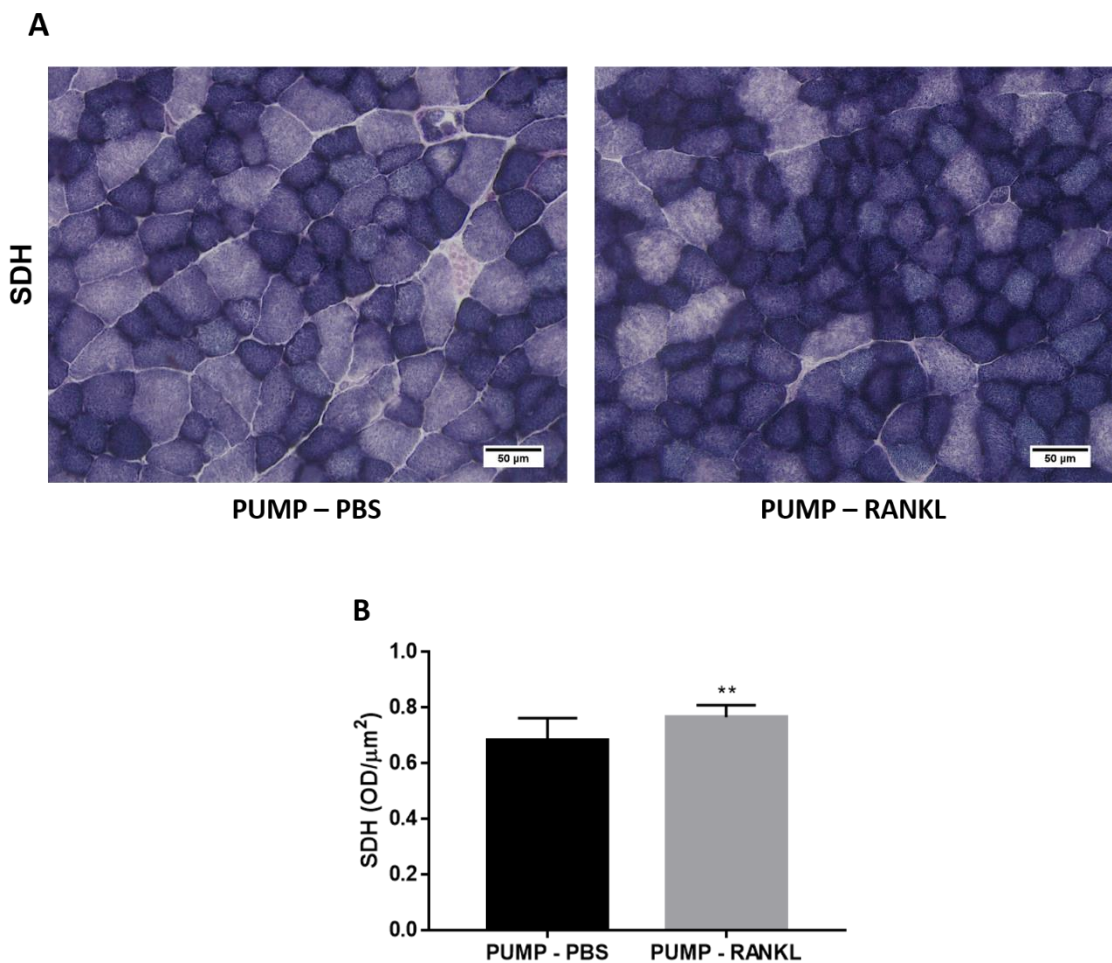


Legenda: A infusão da proteína RANKL alterou o padrão de expressão das isoformas da cadeia de miosina. Imagens representativas da tripla marcação (Vermelho, fibras IIa; Verde, fibras IIb), na qual observa-se o aumento na expressão de fibras do tipo IIa no gastrocnêmio (A e B). Contudo, não houve diferença significativa na expressão dos tipos de fibra IIa e IIb no sóleo entre os animais controle e tratados com RANKL (C e D). As comparações estatísticas entre os grupos foram realizadas pelo Teste One Way ANOVA seguido pelo teste de comparações múltiplas Bonferroni. \*\*  $p < 0,01$ .



Para reforçar o efeito de RANKL na mudança da capacidade oxidativa geral das fibras musculares em camundongos tratados, realizamos o ensaio para medir a atividade da succinato desidrogenase (SDH), que é uma enzima exclusivamente intra-mitocondrial. A base da reação é a transferência de elétrons para o formazan (*NBT – nitro blue formazan*), que precipita com a cor azul e a intensidade desta coloração é maior em fibras com elevado conteúdo mitocondrial e respiração oxidativa. Os nossos resultados demonstraram que houve um aumento na média da densidade óptica das fibras da porção vermelha do gastrocnêmio no grupo tratado com RANKL (**Figura 21**).

**Figura 21.** Efeito do tratamento de RANKL na atividade de enzimas mitocondriais.



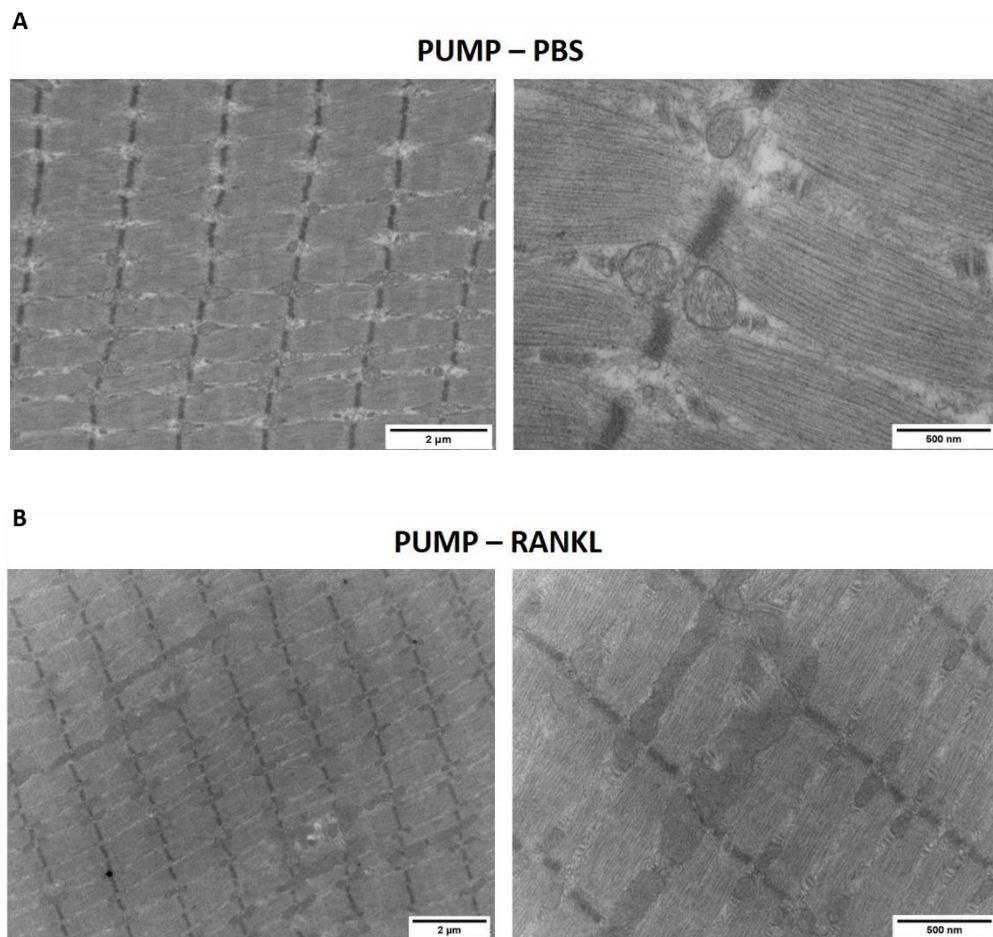
Legenda: O tratamento com RANKL proporcionou o aumento da atividade da enzima mitocondrial succinato desidrogenase (SDH) nas fibras musculares da porção vermelha do gastrocnêmio dos camundongos (**A**), que foi quantificado a partir dos valores da densidade óptica dessas regiões (**B**). As comparações entre os dois grupos foram realizadas por meio do Test *t* não-pareado. \*\* $p < 0.001$ .

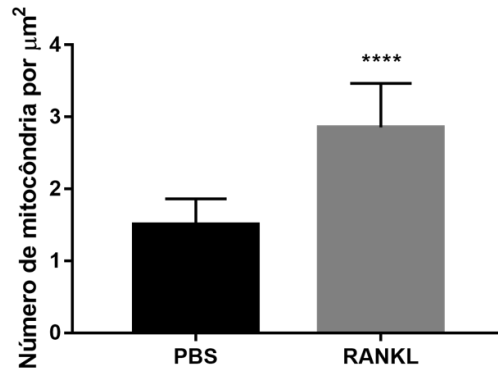
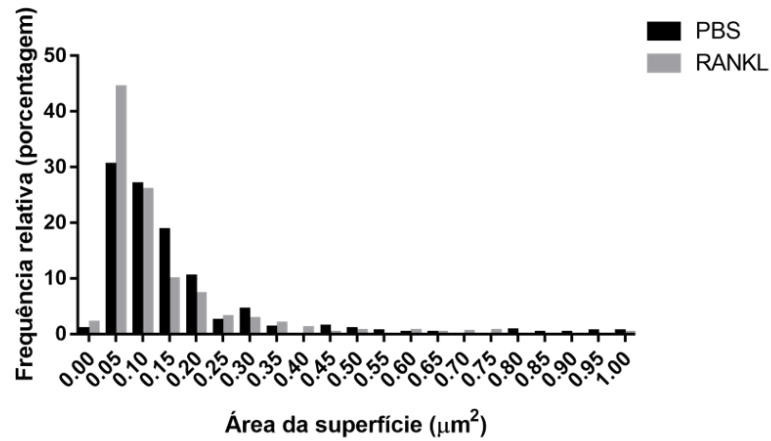
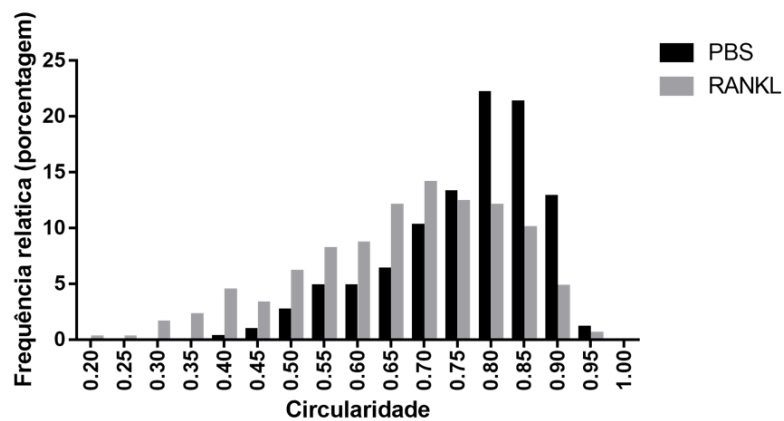
As mitocôndrias apresentam um papel fundamental no metabolismo e o balanço na taxa de fusão:fissão permite ações orquestradas em resposta ao aumento da demanda energética, que

pode induzir um processo denominado fusão transiente ou “*kiss-and-run*” mitocondrial, no qual ocorre a junção de mitocôndrias vizinhas para suprir a necessidade momentânea de energia da célula seguida pela fissão da organela após essa atividade (LIU et al., 2009).

As análises das ultraestruturas do tecido muscular esquelético demonstraram um aumento no número de mitocôndrias por área em animais que receberam a infusão com RANKL, organelas mais eletrondensas, com menor área de superfície e circularidade, que são características típicas de plasticidade mitocondrial em tecidos com alta demanda metabólica (**Figura 22**).

**Figura 22.** Microscopia eletrônica de transmissão



**C****D****E**

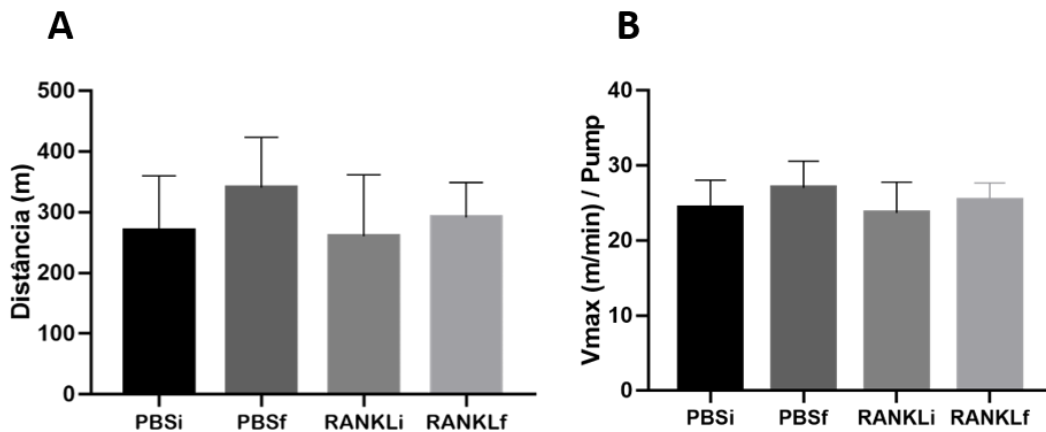
Legenda: A infusão de RANKL aumentou o conteúdo mitocondrial no sóleo de camundongos. **A** e **B**) Imagens representativa comparando cortes de tecidos de animais controle e tratados com RANKL **C**) Valores médios do número de mitocôndrias por  $\mu\text{m}^2$ . **D**). Percentual relativo da distribuição da área mitocondrial. **E**) Análise morfométrica da distribuição da forma das mitocôndrias. Comparações realizadas com o Test *t*. \*\*\*\*  $p < 0.001$ .

### 5.7. Influência da atividade física em animais que receberam o tratamento com RANKL

A atividade física é um dos principais fatores responsáveis por remodelar o tecido muscular e apresenta diversos impactos fisiológicos. Assim, a investigação de fatores que favorecem a plasticidade muscular é relevante tanto na prática esportiva como no contexto de doenças metabólicas. Diante disso, decidimos avaliar o impacto do implante da *pump* com RANKL na atividade física e resposta muscular de camundongos após o período de 21 dias de tratamento, de modo que a atividade ocorreu dentro da janela de funcionamento da *pump*.

Os camundongos foram ambientados com a esteira durante 5 dias antes da cirurgia de implante para que pudessem desenvolver o hábito de correr na esteira. Antes da cirurgia, realizamos a aferição da velocidade máxima e distância percorrida em esteira inclinada a 19° antes até o animal alcançar a exaustão. Após a recuperação da cirurgia, os animais foram treinados cinco dias por semana durante 21 dias. Observamos que o tratamento com RANKL não proporcionou um ganho significativo na velocidade máxima e distância percorrida aferida após o período (**Figura 23**).

**Figura 23.** Análise da distância percorrida e velocidade máxima alcançada

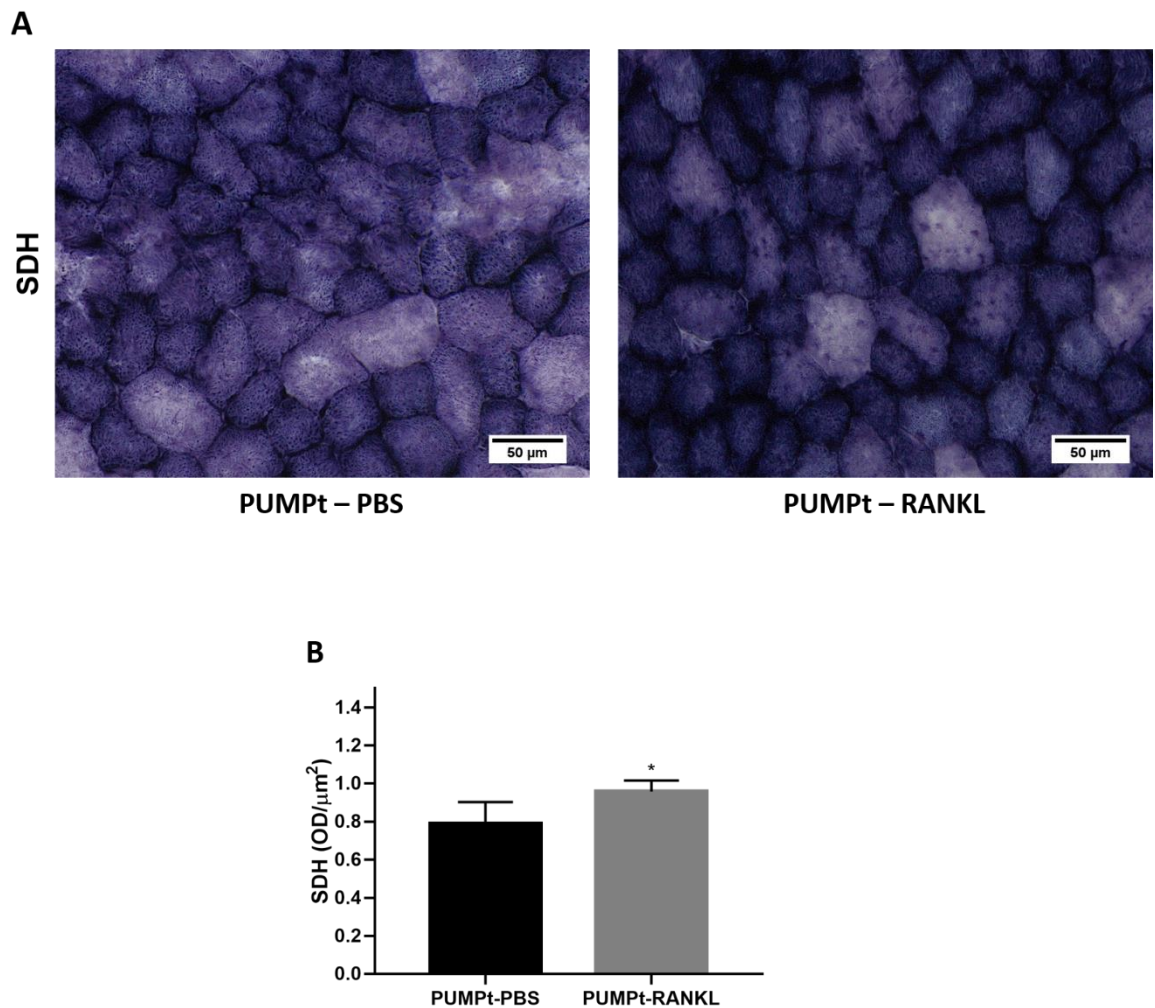


Legenda: O tratamento com RANKL não proporcionou aumento significativo na performance dos camundongos. Grupo com PBS no início do experimento (PBSi), grupo tratado com PBS após o treino físico (PBSf), grupo com infusão de RANKL no início do experimento (RANKLi), grupo com infusão de RANKL após o treino físico (RANKLf). Teste One Way ANOVA seguido pelo teste de comparações múltiplas Bonferroni.

A ausência no ganho de performance pelo pouco tempo entre tratamento e observação dos efeitos, uma vez que os resultados de atividades físicas costumam ser mais significativos após um período 8 semanas de treinamento, que não foi possível devido à limitação do tempo de funcionamento da *pump*.

Entretanto, observamos que o grupo tratado com RANKL apresentou áreas mais intensas para marcação de SDH, o que indica uma ação local no aumento no conteúdo mitocondrial, em relação ao grupo controle (**Figura 24**).

**Figura 24.** Análise da coloração por atividade da SDH em animais treinados.



Legenda: O tratamento com RANKL em animais submetidos ao exercício físico proporcionou o aumento da atividade da enzima mitocondrial succinato desidrogenase (SDH) nas fibras musculares da porção vermelha do gastrocnêmio dos camundongos (**A**), que foi quantificado a partir dos valores da densidade óptica obtidas dessas regiões (**B**). As comparações entre os dois grupos foram realizadas por meio do Test *t* não-pareado. \* $p < 0.01$ .

## 6 DISCUSSÃO

O conhecimento sobre as interações do sistema músculo-esquelético tem sido atualizado de forma significativa, especialmente na última década, com o aumento exponencial de publicações relativas ao tema, que inseriu ao debate tópicos que extrapolam os aspectos biomecânicos, como o papel parácrino e endócrino do tecido muscular e ósseo (MAUREL; JÄHN; LARA-CASTILLO, 2017).

O músculo esquelético é um dos tecidos mais plásticos e dinâmicos do corpo humano e, além de suas atividades motoras desencadeadas em conjunto com o sistema ósseo e nervoso, apresenta relevante papel no metabolismo energético devido à captação de glicose de forma insulino-dependente. Recentemente, a literatura tem descrito ações do tecido muscular em órgãos anatomicamente distantes por meio de miocinas como a miostatina, TGF- $\beta$ , irisina e FGF2. Em paralelo, proteínas específicas do tecido ósseo, como a osteocalcina, também foram descritas com ação em outros tecidos e no controle do metabolismo da glicose, o que atribuiu uma função endócrina ao tecido ósseo. Assim, além da proximidade anatômica entre músculos e ossos, outras interações via moléculas sinalizadoras ganharam destaque e são foco de pesquisa para ampliar o conhecimento acerca da contribuição recíproca destes tecidos em seus processos fisiológicos, assim como na manutenção da homeostase.

Nossos resultados demonstram que animais geneticamente modificados, como os camundongos OPG<sup>+/-</sup> e OPG<sup>-/-</sup> apresentam uma maior capacidade de respiração mitocondrial no músculo esquelético, com elevadas taxas de fosforilação oxidativa no sóleo quando comparado aos animais controle (WT). E, em modelo de miotubos *in vitro*, verificamos a contribuição do estímulo com RANKL no aumento da expressão de marcadores envolvidos na biogênese mitocondrial, na expressão de enzimas do Ciclo de Krebs e indução de um maior conteúdo mitocondrial avaliado por fluorescência e quantificação da razão mtDNA/nDNA. O estímulo com RANKL também proporcionou um maior estado de respiração desacoplada e um ganho na capacidade respiratória de reserva de miotubos da linhagem C2C12, o que sugere que o tratamento com uma baixa dose dessa proteína condiciona os miotubos para uma melhor adaptação metabólica frente a um aumento da demanda energética.

O papel do sistema RANK-RANKL-OPG no tecido muscular esquelético é objeto de estudo de diversos grupos de pesquisa que utilizam modelos murinos de distrofia muscular, especialmente de distrofia muscular de *Duchenne* (DMD), que é uma desordem genética letal causada pela perda funcional da distrofina e tem como consequências o aumento do estresse

oxidativo, degradação da matriz extracelular, acúmulo de tecido conjuntivo e respostas inflamatórias mediadas pela ativação de fatores de transcrição como o NF- $\kappa$ B (KUMAR; BORIEK, 2003).

Em 2014, HINDI et al. demonstraram que a sinalização RANK-RANKL em células do tecido muscular esquelético é mediada pela proteína adaptadora TRAF6 e, naquele contexto, participa da ativação de NF- $\kappa$ B a partir de estímulos desencadeados por citocinas pró-inflamatórias em condições patológicas no tecido muscular esquelético. Neste trabalho, o grupo descreve um aumento na expressão e atividade de TRAF6 nos modelos de DMD e que sua depleção contribui para reduzir os danos causados no tecido muscular. Entretanto, a inibição de TRAF6 de forma crônica resulta no agravamento de miopatias e perda de função nos animais com distrofia muscular.

O receptor RANK é altamente expresso no tecido muscular esquelético e sua função neste tecido tem sido associada à regulação da atividade do SERCA e a deleção deste receptor no tecido muscular (RANK<sup>mk0</sup>) aumenta a fadigabilidade muscular devido à redução na porcentagem de fibras de perfil metabólico oxidativo (DUFRESNE et al., 2016a). A condição RANK<sup>mk0</sup> também promoveu mudança para perfil glicolítico no tecido muscular e, em condições não-patológicas, o RANK expresso em músculos é fundamental para a homeostase no armazenamento de Ca<sup>+2</sup>. Outros trabalhos ainda destacam a importância do receptor RANK no aumento da resistência e capacidade respiratória do tecido muscular esquelético (DUFRESNE et al., 2016a, 2016b; DUFRESNE; BOULANGER-PIETTE; FRENETTE, 2017; JIANG et al., 2010).

A descrição clássica do receptor RANK como um ativador de NF- $\kappa$ B induz a associação de sua atividade com respostas pró-inflamatórias. Porém, o tratamento com RANKL também pode proporcionar respostas anti-inflamatórias em modelos murinos de choque-séptico induzido por meio da administração intraperitoneal de componentes bacterianos como o lipopolissacarídeo (LPS) (MARUYAMA et al., 2006), assim como em modelo de isquemia cerebral (SHIMAMURA et al., 2014). No presente estudo, os dados demonstram que os miotubos estimulados com RANKL por um período de 24h não apresentam um aumento na expressão de marcadores inflamatórios ou de degeneração muscular, como TNF- $\alpha$ , Atrogina e MuRF1.

Ainda, dados do nosso laboratório que estão fase final de publicação descrevem que o padrão de ativação de NF- $\kappa$ B induzido por RANKL é diferente daquele produzido pelo LPS, uma vez que a sinalização via RANK-RANKL induz uma fraca e transiente fosforilação de I $\kappa$ B

nos minutos iniciais de estímulo, enquanto que os níveis de fosforilação desta proteína nas células estimuladas com LPS permanecem elevados por pelo menos 24h e, além disso, o estímulo concomitante de RANKL e LPS induz a redução na sinalização pró-inflamatória induzida por LPS (MOTA et al, manuscrito em revisão).

Observamos que o estímulo com RANKL em miotubos da linhagem C2C12 ativa vias de sinalização como ERK, que está envolvida em processos de remodelamento da matriz extracelular e metabolismo dos ácidos graxos e MAPK-p38, que confere estabilidade ao PGC-1 $\alpha$  (TURCOTTE; RANEY; TODD, 2005; YU et al., 2003). Nossos resultados também reforçam os achados de ISHII et al., 2009, que descreveu a ativação da via de sinalização de CREB pelo eixo RANK-RANKL na biogênese mitocondrial em osteoclastos, assim como os dados publicados do nosso grupo que demonstram a ação de RANKL na biogênese mitocondrial na diferenciação de adipócitos bege (MATSUO et al. 2020).

Estudos com camundongos transgênicos para a superexpressão de RANKL humano (HuRANKLTg<sup>+</sup>) demonstraram que estes animais apresentam uma menor massa muscular, redução na força das patas e na habilidade de atingir a velocidade máxima em esteira, além do menor número de fibras do tipo I e II. O mesmo trabalho descreve que a administração de OPG recombinante e Denosumab contribuíram para a recuperação da força muscular e para a redução na expressão de marcadores inflamatórios e antimiógenicos como PTP-RG e aumento na sensibilidade à insulina (BONNET et al., 2019). Como sarcopenia e osteoporose frequentemente estão associados, a inibição de RANKL com a administração de OPG e Denosumab poderia aumentar a força muscular no camundongo HuRANKLTg<sup>+</sup> em consequência da restauração da massa óssea no quadro de osteoporose. Mas, como o estudo não descreveu os níveis séricos de RANKL nestes animais e nem os mecanismos de ação de RANKL na força muscular foram avaliados, a interpretação é especulativa pois o modelo HuRANKLTg<sup>+</sup> não permite avaliar a ação de RANKL somente no músculo esquelético.

Recentemente, foi descrito que camundongos OPG<sup>-/-</sup> apresentam osteoporose e redução das propriedades biomecânicas na tíbia e fêmur e, conseqüentemente, redução da atividade locomotora e fraqueza muscular com 5 meses de idade (este fenômeno não foi observado em animais com 1 e 3 meses de idade). Curiosamente, a atrofia muscular ocorreu em fibras de contração rápida tipo IIB devido à ação de RANKL nas proteínas NF- $\kappa$ B, atrogin-1 e MuRF-1 (BONEWALD, 2019). Mas de acordo com nossos achados e também reportado nessa publicação, os níveis de RANKL circulante em camundongos OPG<sup>-/-</sup> é centena de vezes maior



em relação aos animais selvagens e este nível está intimamente relacionado com o desenvolvimento de osteoporose.

Assim, a infusão de baixa dose de RANKL no nosso modelo de camundongo selvagem e saudável busca preencher esta lacuna de conhecimento a respeito da ação de RANKL em contexto da fibra saudável, com sarcolema e arquitetura estáveis, diferente dos quadros de distrofias musculares, e sem a interferência da osteoporose.

O modelo de administração de RANKL por infusão com a *pump* nos permitiu realizar a aplicação de uma dose de 1,8 µg/kg/dia durante o período de 28 dias. Essa dose, que é cerca de 100x menor em relação àquelas utilizadas em modelos de osteoporose (LESLIE et al., 2006), não é suficiente para induzir mudanças na atividade de osteoclastos ou no nível sérico de osteocalcina (MATSUO et al., 2020). O nível de RANKL circulante no animal tratado é de aproximadamente 62 pg/ml comparado a 40 pg/ml do grupo controle (MATSUO et al., 2020) e, embora seja um aumento pouco expressivo comparado com os níveis observados em animais OPG+/- ou OPG-/-, foi suficiente para impactar o tecido adiposo branco. Dessa forma, nosso modelo mostrou-se adequado para avaliar os impactos de RANKL no tecido muscular esquelético sem os efeitos da osteoporose.

A avaliação dos camundongos que receberam a *pump* com RANKL demonstrou que o sóleo desses animais apresentou um aumento significativo nas taxas de respiração mitocondrial, na marcação da atividade da enzima SDH e quantidade de mitocôndrias, além de aumento na proporção de fibras do tipo IIa no gastrocnêmio. Assim, nossos dados indicam que o tratamento com baixas doses de RANKL favorece a capacidade fosforilativa mitocondrial do músculo esquelético sem causar alterações degenerativas no tecido ou aumentar os níveis séricos de proteínas pró-inflamatórias. Importante, além de ser considerada uma citocina pró-inflamatória, IL-6 tem diversas funções e é considerada uma miocina expressa após exercício físico. Assim, nossos dados sugerem que a via de atuação de RANKL pode ser independente da ação de IL-6.

Os miotubos derivados da linhagem C2C12 apresentaram aumento na expressão de mRNA de FDC5 após o tratamento com RANKL, mas sem alteração no nível de irisina no sobrenadante de acordo com quantificação por ELISA (dados não mostrados). Da mesma forma, os níveis séricos de irisina também não se alteraram após o exercício físico em camundongos tratados com RANKL (dados não mostrados). Entretanto, este resultado demanda confirmação com coleta de amostras imediatamente após o exercício físico. Isso não foi possível neste ensaio, pois as amostras foram destinadas para quantificação do lactato.

Infelizmente, o resultado desta quantificação não foi apresentado devido a inconsistências na aferição dos valores séricos de lactato pelo equipamento. Baseado no resultado *in vitro*, RANKL pode ter atuação limitada ao nível transcricional da irisina, mas não na clivagem e liberação pela ação da enzima furina. Assim, experimentos adicionais serão realizados para esclarecer a relação de RANKL com a síntese de irisina.

O potencial de induzir osteoporose em uma eventual intervenção com RANKL suscitou a busca por agonistas que mimetizem sua ação sem induzir a ativação de osteoclastos. O peptídeo agonista parcial chamado de MHP1 foi sintetizado com uma região comum ao RANKL e descrito por desencadear respostas muito semelhantes ao ativar RANK, como inibição de respostas inflamatórias em macrófagos e em modelos de isquemia cerebral, mas sem ação em osteoclastos (KURINAMI et al., 2016). Assim, este peptídeo poderia ser avaliado futuramente como uma opção ao uso de RANKL.

Além de apresentar um aumento na taxa de respiração mitocondrial e conversão de fibras para um perfil metabólico predominantemente oxidativo, os grupos de camundongos que receberam a infusão com RANKL e foram submetidos a um programa de treinamento em esteira não apresentaram déficit na capacidade de atingir a velocidade máxima e na distância percorrida em relação ao grupo que recebeu a infusão com solução salina. Entretanto, os camundongos não apresentaram melhora na performance com o tratamento de RANKL, mesmo com o aumento da atividade de SDH no músculo esquelético do grupo tratado em comparação ao grupo controle. Isso pode ser explicado pelo fato de o período de treinamento ter sido realizado na janela de funcionamento das minibombas osmóticas (21 dias) e, por isso, ainda seria necessário um maior período de testes na esteira para observar um ganho de performance na corrida dos animais.

Dessa forma, o ensaio com camundongos na esteira demonstra que há um enorme potencial a ser explorado na compreensão do papel da sinalização RANK-RANKL no músculo esquelético, que pode ser investigado em diferentes contextos experimentais com animais saudáveis ou obesos para avaliar seu impacto na homeostase energética.

Embora a expressão de RANKL não seja exclusividade do tecido ósseo, esta proteína é amplamente expressa e secretada por osteócitos, que compreendem uma massa celular total aproximadamente semelhante a massa cerebral, o que torna o osso uma fonte considerável de RANKL e outros fatores (BUENZLI, 2015). E baseado nos dados do presente trabalho, RANKL pode ser mais um efetor do metabolismo ósseo com ação no músculo esquelético e

metabolismo energético, pois aumenta a biogênese mitocondrial e induz um perfil oxidativo na fibra muscular esquelética.

## 7 CONCLUSÃO

**7.1** Camundongos com deleção parcial ou completa da OPG apresentam elevada capacidade de respiração mitocondrial do músculo esquelético comparado ao grupo WT, o que indica o potencial efeito do aumento dos níveis séricos de RANKL na capacidade de respiração muscular;

**7.2** O estímulo com RANKL em miotubos *in vitro* da linhagem C2C12 induziu o aumento na expressão gênica de marcadores da biogênese mitocondrial e enzimas do metabolismo fosforilativo, além de aumentar a marcação de mitocôndrias viáveis e a quantidade de mtDNA.

**7.3** O estímulo de RANKL em miotubos *in vitro* desencadeia a ativação de vias de sinalização ERK, p38 e CREB, importantes no controle do metabolismo oxidativo e biogênese mitocondrial;

**7.4** Os miotubos estimulados com RANKL apresentaram maiores taxas de consumo de oxigênio, com uma elevada capacidade respiratória de reserva.

**7.5** A análise do RNA-Seq revelou que o estímulo com RANKL em miotubos aumenta a sinalização via ERK e também estimula vias envolvidas no remodelamento da matriz extracelular, no controle da sinalização por cálcio e de fatores de crescimento do endotélio vascular;

**7.6** A infusão de RANKL em camundongos WT saudáveis induziu o aumento das taxas de respiração mitocondrial, aumento de fibras do tipo IIa e maior atividade da SDH, sem causar alterações histológicas ou funcionais no músculo esquelético.

**7.7** A infusão de RANKL aumentou a atividade da SDH em camundongos WT exercitados.

## REFERÊNCIAS

- ACKERMANN, F.; WAITES, C. L.; GARNER, C. C. Presynaptic active zones in invertebrates and vertebrates. **EMBO reports**, v. 16, n. 8, p. 923–38, Aug. 2015.
- ACKERMANN, M. A.; KONTROGIANNI-KONSTANTOPOULOS, A. Myosin binding protein-C slow: a multifaceted family of proteins with a complex expression profile in fast and slow twitch skeletal muscles. **Frontiers in physiology**, v. 4, p. 391, 2013.
- AHRENS, H. E. et al. Klotho expression is a prerequisite for proper muscle stem cell function and regeneration of skeletal muscle. **Skeletal muscle**, v. 8, n. 1, p. 20, 2018.
- AL RIFAI, O. et al. Proprotein convertase furin regulates osteocalcin and bone endocrine function. **The Journal of clinical investigation**, v. 127, n. 11, p. 4104–4117, 1 Nov. 2017.
- ANDERSON, D. M. et al. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. **Nature**, v. 390, n. 6656, p. 175–179, 1997.
- AOKI, S. et al. Function of OPG as a traffic regulator for RANKL is crucial for controlled osteoclastogenesis. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 25, n. 9, p. 1907–1921, 2010.
- ARMSTRONG, V. J. et al. Wnt/beta-catenin signaling is a component of osteoblastic bone cell early responses to load-bearing and requires estrogen receptor alpha. **The Journal of biological chemistry**, v. 282, n. 28, p. 20715–27, 13 Jul. 2007.
- ARONSON, D. et al. Exercise stimulates the mitogen-activated protein kinase pathway in human skeletal muscle. **The Journal of clinical investigation**, v. 99, n. 6, p. 1251–7, 15 Mar. 1997.
- AUSONI, S. et al. Expression of Myosin Heavy Chain Isoforms Slow Rat Muscles. **The Journal of neuroscience**, v. 10, n. 1, p. 153–160, 1990.
- AVIN, K. G. et al. Biomechanical aspects of the muscle-bone interaction. **Current osteoporosis reports**, v. 13, n. 1, p. 1–8, Feb. 2015.
- BAKKAR, N. et al. IKK/NF-kappaB regulates skeletal myogenesis via a signaling switch to inhibit differentiation and promote mitochondrial biogenesis. **The Journal of cell biology**, v. 180, n. 4, p. 787–802, 25 Feb. 2008.
- BARACOS, V. E. Cancer-associated cachexia and underlying biological mechanisms. **Annual review of nutrition**, v. 26, p. 435–61, 2006.
- BEJMA, J.; JI, L. L. Aging and acute exercise enhance free radical generation in rat skeletal muscle. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 87, n. 1, p. 465–70, Jul. 1999.

- BENTZINGER, C. F.; WANG, Y. X.; RUDNICKI, M. A. Building muscle: molecular regulation of myogenesis. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 4, n. 2, 2012.
- BONEWALD, L. Use it or lose it to age: A review of bone and muscle communication. **Bone**, v. 120, p. 212–218, 2019.
- BONNET, N. et al. RANKL inhibition improves muscle strength and insulin sensitivity and restores bone mass. **Journal of Clinical Investigation**, v. 129, n. 8, p. 3214–3223, 2019.
- BOSTRÖM, P. et al. A PGC1- $\alpha$ -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. **Nature**, v. 481, n. 7382, p. 463–468, 2012.
- BOSUTTI, A. et al. Whey protein with potassium bicarbonate supplement attenuates the reduction in muscle oxidative capacity during 19 days of bed rest. **Journal of Applied Physiology**, v. 121, n. 4, p. 838–848, 1 Oct. 2016.
- BOYCE, B. F. Advances in the regulation of osteoclasts and osteoclast functions. **Journal of Dental Research**, v. 92, n. 10, p. 860–867, 2013.
- BOYCE, B. F.; XING, L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. **Arthritis Research and Therapy**, v. 9, n. SUPPL.1, 2007.
- BOYCE, B. F.; XING, L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 473, n. 2, p. 139–146, 2008.
- BOYER, J. G. et al. ERK1/2 signaling induces skeletal muscle slow fiber-type switching and reduces muscular dystrophy disease severity. **JCI Insight**, v. 4, n. 10, p. 1–14, 2019.
- BOYLE, W. J.; SIMONET, W. S.; LACEY, D. L. Osteoclast differentiation and activation. **Nature**, v. 423, n. 6937, p. 337–342, 15 May 2003.
- BROTTO, M.; JOHNSON, M. L. Endocrine crosstalk between muscle and bone. **Current Osteoporosis Reports**, v. 12, n. 2, p. 135–141, 2014.
- BUCAJ, N. et al. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. **Genes and Development**, v. 12, n. 9, p. 1260–1268, 1998.
- BUVINIC, S. et al. Muscle-Bone Crosstalk in the Masticatory System: From Biomechanical to Molecular Interactions. **Frontiers in Endocrinology**, v. 11, n. March, p. 1–19, 2021.
- CAI, D. et al. IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B activation causes severe muscle wasting in mice. **Cell**, v. 119, n. 2, p. 285–298, 2004.
- CAI, Q.; SHENG, Z.-H. Molecular motors and synaptic assembly. **The Neuroscientist: a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry**, v. 15, n. 1, p. 78–89, Feb. 2009.
- CARELLI, V.; CHAN, D. C. Mitochondrial DNA: Impacting central and peripheral nervous

- systems. **Urology**, v. 84, n. 6, p. 1126–1142, 2014.
- CAREY, A. L. et al. Interleukin-6 increases insulin-stimulated glucose disposal in humans and glucose uptake and fatty acid oxidation in vitro via AMP-activated protein kinase. **Diabetes**, v. 55, n. 10, p. 2688–97, Oct. 2006.
- CARROLL, T. J. et al. Resistance training frequency: strength and myosin heavy chain responses to two and three bouts per week. **European Journal of Applied Physiology**, v. 78, n. 3, p. 270–275, 1 Jul. 1998.
- CHAKKALAKAL, J.; BRACK, A. Extrinsic Regulation of Satellite Cell Function and Muscle Regeneration Capacity during Aging. **Journal of stem cell research & therapy**, v. Suppl 11, p. 001, 26 Sep. 2012.
- CHANG, N. C.; RUDNICKI, M. A. Satellite cells: the architects of skeletal muscle. **Current topics in developmental biology**, v. 107, p. 161–81, 2014.
- CHAO, M. V; RAJAGOPAL, R.; LEE, F. S. Neurotrophin signalling in health and disease. **Clinical science (London, England : 1979)**, v. 110, n. 2, p. 167–73, Feb. 2006.
- CHEN, G.; GOEDEL, D. V. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. **Science (New York, N.Y.)**, v. 296, n. 5573, p. 1634–5, 31 May 2002.
- CHEN, H.-H. et al. NRIP is newly identified as a Z-disc protein, activating calmodulin signaling for skeletal muscle contraction and regeneration. **Journal of cell science**, v. 128, n. 22, p. 4196–209, 15 Nov. 2015.
- COMPTON, J. T.; LEE, F. Y. A review of osteocyte function and the emerging importance of sclerostin. **The Journal of bone and joint surgery. American volume**, v. 96, n. 19, p. 1659–68, 1 Oct. 2014.
- COWIN, S. C. The significance of bone microstructure in mechanotransduction. **Journal of biomechanics**, v. 40 Suppl 1, p. S105-9, 2007.
- CROCKETT, J. C. et al. Bone remodelling at a glance. **Journal of cell science**, v. 124, n. Pt 7, p. 991–8, 1 Apr. 2011.
- DAHLMAN, J. M. et al. The RelA/p65 subunit of NF-kappaB specifically regulates cyclin D1 protein stability: implications for cell cycle withdrawal and skeletal myogenesis. **Journal of cellular biochemistry**, v. 106, n. 1, p. 42–51, 1 Jan. 2009.
- DE LA ROSA, A. et al. Long-term exercise training improves memory in middle-aged men and modulates peripheral levels of BDNF and Cathepsin B. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 3337, 4 Dec. 2019.
- DELHALLE, S. et al. A beginner's guide to NF-kappaB signaling pathways. **Annals of the**

- New York Academy of Sciences**, v. 1030, p. 1–13, Dec. 2004.
- DENKER. Synaptic vesicle pools: an update. **Frontiers in Synaptic Neuroscience**, 2010.
- DIVAKARUNI, A. S. et al. **Analysis and interpretation of microplate-based oxygen consumption and pH data**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2014. v. 547
- DONSMARK, M. et al. Contractions activate hormone-sensitive lipase in rat muscle by protein kinase C and mitogen-activated protein kinase. **The Journal of physiology**, v. 550, n. Pt 3, p. 845–54, 1 Aug. 2003.
- DROUJININE, I. A.; PERRIMON, N. Interorgan Communication Pathways in Physiology: Focus on Drosophila. **Annual Review of Genetics**, v. 50, n. October, p. 539–570, 2016.
- DUBOWITZ, V.; PEARSE, A. G. E. Reciprocal relationship of phosphorylase and oxidative enzymes in skeletal muscle. **Nature**, v. 185, n. 4714, p. 701–702, 1960.
- DUCHER, G. et al. Bone geometry in response to long-term tennis playing and its relationship with muscle volume: a quantitative magnetic resonance imaging study in tennis players. **Bone**, v. 37, n. 4, p. 457–66, Oct. 2005.
- DUFRESNE, S. S. et al. Muscle RANK is a key regulator of Ca<sup>2+</sup> storage, SERCA activity, and function of fast-twitch skeletal muscles. n. 34, p. 663–672, 2016a.
- DUFRESNE, S. S. et al. Muscle RANK is a key regulator of calcium storage, SERCA activity, and function of fast-twitch skeletal muscles. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, n. 34, p. ajpcell.00285.2015, 2016b.
- DUFRESNE, S. S. et al. Physiological role of receptor activator nuclear factor- $\kappa$ B (RANK) in denervation-induced muscle atrophy and dysfunction. **Receptors & Clinical Investigation**, p. 1–6, 2016c.
- DUFRESNE, S. S. et al. Genetic deletion of muscle RANK or selective inhibition of RANKL is not as effective as full-length OPG-fc in mitigating muscular dystrophy. **Acta Neuropathologica Communications**, v. 6, n. 1, p. 31, 2018.
- DUFRESNE, S. S.; BOULANGER-PIETTE, A.; FRENETTE, J. Osteoprotegerin and  $\beta$ 2-Agonists Mitigate Muscular Dystrophy in Slow- and Fast-Twitch Skeletal Muscles. **American Journal of Pathology**, v. 187, n. 3, p. 498–504, 2017.
- DUZEL, E.; VAN PRAAG, H.; SENDTNER, M. Can physical exercise in old age improve memory and hippocampal function? **Brain : a journal of neurology**, v. 139, n. Pt 3, p. 662–73, Mar. 2016.
- ESHKAR-OREN, I. et al. The forming limb skeleton serves as a signaling center for limb vasculature patterning via regulation of Vegf. **Development (Cambridge, England)**, v. 136,



n. 8, p. 1263–72, Apr. 2009.

FATA, J. E. et al. The Osteoclast Differentiation Factor Osteoprotegerin-Ligand Is Essential for Mammary Gland Development. **Cell**, v. 103, n. 1, p. 41–50, 2000.

FENG, X.; MCDONALD, J. M. Disorders of bone remodeling. **Annual review of pathology**, v. 6, p. 121–45, 2011.

FERNANDEZ-VALDIVIA, R. et al. The RANKL signaling axis is sufficient to elicit ductal side-branching and alveologenesis in the mammary gland of the virgin mouse. **Developmental Biology**, v. 328, n. 1, p. 127–139, Apr. 2009.

FERRER-MARTÍNEZ, A.; RUIZ-LOZANO, P.; CHIEN, K. R. Mouse PeP: a novel peroxisomal protein linked to myoblast differentiation and development. **Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists**, v. 224, n. 2, p. 154–67, Jun. 2002.

FERRON, M. et al. Osteocalcin differentially regulates  $\beta$  cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 13, p. 5266–5270, 2008.

FERRON, M. et al. Insulin Signaling in Osteoblasts Integrates Bone Remodeling and Energy Metabolism. **Cell**, v. 142, n. 2, p. 296–308, Jul. 2010.

FITTS, R. H. The cross-bridge cycle and skeletal muscle fatigue. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 104, n. 2, p. 551–8, Feb. 2008.

FLORENCIO-SILVA, R. et al. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. **BioMed research international**, v. 2015, p. 421746, 2015.

FLÜCK, M. et al. Cellular Aspects of Muscle Specialization Demonstrate Genotype – Phenotype Interaction Effects in Athletes. **Frontiers in Physiology**, v. 10, 8 May 2019.

FORCE, T.; BONVENTRE, J. V. Growth Factors and Mitogen-Activated Protein Kinases. **Hypertension**, v. 31, n. 1, p. 152–161, Jan. 1998.

FORTIN, M. et al. Paraspinal Muscle Morphology and Composition: A 15-yr Longitudinal Magnetic Resonance Imaging Study ´ 1. p. 893–901, 2014.

FOX, M. A. et al. A synaptic nidogen: developmental regulation and role of nidogen-2 at the neuromuscular junction. **Neural development**, v. 3, p. 24, 25 Sep. 2008.

FRONTERA, W. R.; OCHALA, J. Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function. **Behavior Genetics**, v. 45, n. 2, p. 183–195, 2015.

FROST, H. M. The Utah paradigm of skeletal physiology: An overview of its insights for bone,

- cartilage and collagenous tissue organs. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 18, n. 6, p. 305–316, 2000.
- FULLER, K. et al. Macrophage colony-stimulating factor stimulates survival and chemotactic behavior in isolated osteoclasts. **Journal of Experimental Medicine**, v. 178, n. 5, p. 1733–1744, 1 Nov. 1993.
- GAO, C. et al. Bone biomaterials and interactions with stem cells. **Bone Research**, v. 5, n. 1, p. 17059, 21 Dec. 2017.
- GAUTEL, M.; DJINOVIĆ-CARUGO, K. The sarcomeric cytoskeleton: from molecules to motion. **The Journal of experimental biology**, v. 219, n. Pt 2, p. 135–45, Jan. 2016.
- GAUTHIER, G. F.; PADYKULA, H. A. CYTOLOGICAL STUDIES OF FIBER TYPES IN SKELETAL MUSCLE. **Journal of Cell Biology**, v. 28, n. 2, p. 333–354, 1 Feb. 1966.
- GILMORE, T. D. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. **Oncogene**, v. 25, n. 51, p. 6680–4, 30 Oct. 2006.
- GLASS, D. J. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 37, n. 10 SPEC. ISS., p. 1974–1984, 2005.
- GOMEZ, C. et al. Absence of mechanical loading in utero influences bone mass and architecture but not innervation in Myod-Myf5-deficient mice. **Journal of anatomy**, v. 210, n. 3, p. 259–71, Mar. 2007.
- GOODMAN, C. A. et al. Novel insights into the regulation of skeletal muscle protein synthesis as revealed by a new nonradioactive in vivo technique . **The FASEB Journal**, v. 25, n. 3, p. 1028–1039, 2011.
- GOODYEAR, L. J. et al. Effects of exercise and insulin on mitogen-activated protein kinase signaling pathways in rat skeletal muscle. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 271, n. 2, p. E403–E408, 1 Aug. 1996.
- GOUSPILLOU, G. et al. The relationship between muscle fiber type-specific PGC-1 $\alpha$  content and mitochondrial content varies between rodent models and humans. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. 1–14, 2014.
- GRAY, M. W. Lynn Margulis and the endosymbiont hypothesis: 50 years later. **Molecular Biology of the Cell**, v. 28, n. 10, p. 1285–1287, 2017.
- GRAY, M. W.; DOOLITTLE, W. F. *Phylogeny and the origin of eukaryotes*. v. 46, n. 1, p. 1–42, 1982.
- GREEN, C. J. et al. Elevated NF- $\kappa$ B activation is conserved in human myocytes cultured from obese type 2 diabetic patients and attenuated by AMP-activated protein kinase. **Diabetes**, v. 60, n. 11, p. 2810–9, Nov. 2011.

- GUTTRIDGE, D. C. et al. NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. **Molecular and cellular biology**, v. 19, n. 8, p. 5785–99, Aug. 1999.
- HALL, Z. W.; SANES, J. R. Synaptic structure and development: the neuromuscular junction. **Cell**, v. 72 Suppl, p. 99–121, Jan. 1993.
- HALLING, J. F. et al. Exercise training protects against aging-induced mitochondrial fragmentation in mouse skeletal muscle in a PGC-1 $\alpha$  dependent manner. **Experimental Gerontology**, v. 96, p. 1–6, 2017.
- HAN, Y. et al. Paracrine and endocrine actions of bone - The functions of secretory proteins from osteoblasts, osteocytes, and osteoclasts. **Bone Research**, v. 6, n. 1, p. 1–11, 2018.
- HAUGEN, F. et al. IL-7 is expressed and secreted by human skeletal muscle cells. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 298, n. 4, p. C807-16, Apr. 2010.
- HAUSCHKA, P. V et al. Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. **Physiological reviews**, v. 69, n. 3, p. 990–1047, Jul. 1989.
- HAUSCHKA, P. V; LIAN, J. B.; GALLOP, P. M. Direct identification of the calcium-binding amino acid, gamma-carboxyglutamate, in mineralized tissue. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 72, n. 10, p. 3925–9, Oct. 1975.
- HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, J. M. et al. The myogenic regulatory factors, determinants of muscle development, cell identity and regeneration. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 72, p. 10–18, 2017.
- HINDI, S. M. et al. Distinct roles of TRAF6 at early and late stages of muscle pathology in the mdx model of Duchenne muscular dystrophy. v. 23, n. 6, p. 1492–1505, 2014.
- HISCOCK, N. et al. Skeletal myocytes are a source of interleukin-6 mRNA expression and protein release during contraction: evidence of fiber type specificity. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 18, n. 9, p. 992–4, Jun. 2004.
- HONDARES, E. et al. PPARdelta, but not PPARalpha, activates PGC-1alpha gene transcription in muscle. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 354, n. 4, p. 1021–7, 23 Mar. 2007.
- HUA, N. et al. Influence of muscle fiber type composition on early fat accumulation under high-fat diet challenge. **PLOS ONE**, v. 12, n. 8, p. e0182430, 1 Aug. 2017.
- HUGHES, B. W.; KUSNER, L. L.; KAMINSKI, H. J. Molecular architecture of the neuromuscular junction. **Muscle & nerve**, v. 33, n. 4, p. 445–61, Apr. 2006.

- HURLEY, B. F.; ROTH, S. M. Strength training in the elderly: effects on risk factors for age-related diseases. **Sports medicine (Auckland, N.Z.)**, v. 30, n. 4, p. 249–68, Oct. 2000.
- IKEDA, F. et al. Critical roles of c-Jun signaling in regulation of NFAT family and RANKL-regulated osteoclast differentiation. **The Journal of clinical investigation**, v. 114, n. 4, p. 475–84, Aug. 2004.
- ISHII, K. A. et al. Coordination of PGC-1 $\beta$  and iron uptake in mitochondrial biogenesis and osteoclast activation. **Nature Medicine**, v. 15, n. 3, p. 259–266, 2009.
- IZAWA, T. et al. Crosstalk between RANKL and Fas signaling in dendritic cells controls immune tolerance. **Blood**, v. 110, n. 1, p. 242–250, 1 Jul. 2007.
- JACKMAN, R. W.; KANDARIAN, S. C. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 287, n. 4, p. C834-43, Oct. 2004.
- JACKOWSKI, S. A. et al. Does lean tissue mass accrual during adolescence influence bone structural strength at the proximal femur in young adulthood? **Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA**, v. 25, n. 4, p. 1297–304, Apr. 2014.
- JAGER, S. et al. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 . **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 29, p. 12017–12022, 2007.
- JEDRYCHOWSKI, M. P. et al. Detection and quantitation of circulating human irisin by tandem mass spectrometry. **Cell Metabolism**, v. 22, n. 4, p. 734–740, 2015.
- JIANG, L. Q. et al. Constitutively active calcineurin in skeletal muscle increases endurance performance and mitochondrial respiratory capacity. p. 8–16, 2019.
- JIANG, Y. et al. Characterization of the structure and function of the fourth member of p38 group mitogen-activated protein kinases, p38delta. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 48, p. 30122–8, 28 Nov. 1997.
- JIWLAWAT, N. et al. Current progress and challenges for skeletal muscle differentiation from human pluripotent stem cells using transgene-free approaches. **Stem Cells International**, v. 2018, n. 1, 2018.
- JOSIEN, R. et al. TRANCE, a TNF family member, is differentially expressed on T cell subsets and induces cytokine production in dendritic cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 162, n. 5, p. 2562–8, 1999.
- JOSIEN, R. et al. TRANCE, a tumor necrosis factor family member, enhances the longevity

- and adjuvant properties of dendritic cells in vivo. **The Journal of experimental medicine**, v. 191, n. 3, p. 495–502, 2000.
- KAHN, B. B. et al. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. **Cell metabolism**, v. 1, n. 1, p. 15–25, Jan. 2005.
- KAJI, H. Effects of myokines on bone. **BoneKEY Reports**, v. 5, n. February, p. 1–6, 2016.
- KARIYA, Y. et al. Vps33a mediates RANKL storage in secretory lysosomes in osteoblastic cells. **Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, v. 24, n. 10, p. 1741–52, Oct. 2009.
- KARSENTY, G.; OLSON, E. N. Bone and Muscle Endocrine Functions: Unexpected Paradigms of Inter-organ Communication. **Cell**, v. 164, n. 6, p. 1248–1256, 10 Mar. 2016.
- KAUFMAN, H. et al. The biological basis of the bone-muscle inter-relationship in the algorithm of fracture healing. **Orthopedics**, v. 31, n. 8, p. 751, Aug. 2008.
- KELLER, C. et al. Transcriptional activation of the IL-6 gene in human contracting skeletal muscle: influence of muscle glycogen content. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 15, n. 14, p. 2748–50, Dec. 2001.
- KEMPER, B. et al. Parathyroid secretion: discovery of a major calcium-dependent protein. **Science (New York, N.Y.)**, v. 184, n. 4133, p. 167–9, 12 Apr. 1974.
- KIRK, B. et al. Muscle, Bone, and Fat Crosstalk: the Biological Role of Myokines, Osteokines, and Adipokines. **Current Osteoporosis Reports**, v. 18, n. 4, p. 388–400, 2020.
- KLEIN-NULEND, J. et al. Mechanosensation and transduction in osteocytes. **Bone**, v. 54, n. 2, p. 182–90, Jun. 2013.
- KOMOLKA, K. et al. Locus Characterization and Gene Expression of Bovine FNDC5: Is the Myokine Irisin Relevant in Cattle? **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. e88060, 31 Jan. 2014.
- KONG, Y.-Y. et al. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. **Nature**, v. 397, n. 6717, p. 315–323, Jan. 1999.
- KOUSTENI, S.; BILEZIKIAN, J. P. The cell biology of parathyroid hormone in osteoblasts. **Current osteoporosis reports**, v. 6, n. 2, p. 72–6, Jun. 2008.
- KOVES, T. R. et al. Mitochondrial Overload and Incomplete Fatty Acid Oxidation Contribute to Skeletal Muscle Insulin Resistance. **Cell Metabolism**, v. 7, n. 1, p. 45–56, 2008.
- KRAMER, H. F.; GOODYEAR, L. J. Exercise, MAPK, and NF- $\kappa$ B signaling in skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, v. 103, n. 1, p. 388–395, 2007.
- KUMAGAI, H. et al. Role of selected polymorphisms in determining muscle fiber composition

- in Japanese men and women. **Journal of Applied Physiology**, v. 124, n. 5, p. 1377–1384, 1 May 2018.
- KUMAR, A.; BORIEK, A. M. Mechanical stress activates the nuclear factor-kappaB pathway in skeletal muscle fibers: a possible role in Duchenne muscular dystrophy. **The FASEB Journal**, v. 17, n. 3, p. 386–396, 2003.
- KUREK, J. B. et al. The role of leukemia inhibitory factor in skeletal muscle regeneration. **Muscle & Nerve**, v. 20, n. 7, p. 815–822, Jul. 1997.
- KURINAMI, H. et al. A Novel Therapeutic Peptide as a Partial Agonist of RANKL in Ischemic Stroke. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 38062, 29 Dec. 2016.
- KYRIAKIS, J. M.; AVRUCH, J. Mammalian Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Transduction Pathways Activated by Stress and Inflammation. **Physiological Reviews**, v. 81, n. 2, p. 807–869, 1 Apr. 2001.
- LACEY, D. L. et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. **Cell**, v. 93, n. 2, p. 165–176, 1998.
- LARA-CASTILLO, N.; JOHNSON, M. L. Bone-Muscle Mutual Interactions. p. 408–421, 2020.
- LEE-YOUNG, R. S. et al. AMPK activation is fiber type specific in human skeletal muscle: effects of exercise and short-term exercise training. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 107, n. 1, p. 283–9, Jul. 2009.
- LEE, H. J. et al. Irisin, a Novel Myokine, Regulates Glucose Uptake in Skeletal Muscle Cells via AMPK. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 29, n. 6, p. 873–81, Jun. 2015.
- LEE, N. K. et al. Endocrine Regulation of Energy Metabolism by the Skeleton. **Cell**, v. 130, n. 3, p. 456–469, Aug. 2007.
- LEPPER, C.; CONWAY, S. J.; FAN, C.-M. Adult satellite cells and embryonic muscle progenitors have distinct genetic requirements. **Nature**, v. 460, n. 7255, p. 627–31, 30 Jul. 2009.
- LEPPER, C.; PARTRIDGE, T. A.; FAN, C.-M. An absolute requirement for Pax7-positive satellite cells in acute injury-induced skeletal muscle regeneration. **Development (Cambridge, England)**, v. 138, n. 17, p. 3639–46, Sep. 2011.
- LESLIE, W. D. et al. The interaction of ethnicity and chronic disease as risk factors for osteoporotic fractures: a comparison in Canadian Aboriginals and non-Aboriginals. **Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA**, v. 17, n. 9, p. 1358–68, 2006.

- LI, X. et al. Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 20, p. 19883–7, 20 May 2005.
- LI, Z. et al. The primary structure of p38 gamma: a new member of p38 group of MAP kinases. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 228, n. 2, p. 334–40, 12 Nov. 1996.
- LIAN, J. B.; HAUSCHKA, P. V; GALLOP, P. M. Properties and biosynthesis of a vitamin K-dependent calcium binding protein in bone. **Federation proceedings**, v. 37, n. 12, p. 2615–20, Oct. 1978.
- LIEBER, R. L.; FRIDÉN, J. Functional and clinical significance of skeletal muscle architecture. **Muscle & nerve**, v. 23, n. 11, p. 1647–66, Nov. 2000.
- LIGHTOWLERS, R. N.; TAYLOR, R. W.; TURNBULL, D. M. What is new in mitochondrial disease, and what challenges remain? **Science**, v. 349, n. 6255, p. 1494–1499, 2015.
- LIN, J. et al. Transcriptional co-activator PGC-1 $\alpha$  drives the formation of slow-twitch muscle fibres. **Nature**, v. 418, n. 6899, p. 797–801, Aug. 2002.
- LIU, X. et al. Mitochondrial kiss-and-run: Interplay between mitochondrial motility and fusion-fission dynamics. **EMBO Journal**, v. 28, n. 20, p. 3074–3089, 2009.
- LOCKSLEY, R. M.; KILLEEN, N.; LENARDO, M. J. The TNF and TNF receptor superfamilies: Integrating mammalian biology. **Cell**, v. 104, n. 4, p. 487–501, 2001.
- LOSER, K. et al. Epidermal RANKL controls regulatory T-cell numbers via activation of dendritic cells. **Nature Medicine**, v. 12, n. 12, p. 1372–1379, 3 Dec. 2006.
- LOSON, O. C. et al. Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission. **Molecular Biology of the Cell**, v. 24, n. 5, p. 659–667, 2013.
- LOURENCO, M. V. et al. Exercise-linked FNDC5/irisin rescues synaptic plasticity and memory defects in Alzheimer's models. **Nature Medicine**, v. Accepted, n. January, p. Nov 2, 2018.
- LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biology**, v. 15, n. 12, p. 550, 5 Dec. 2014.
- LU, H. et al. Mechanical loading induced expression of bone morphogenetic protein-2, alkaline phosphatase activity, and collagen synthesis in osteoblastic MC3T3-E1 cells. **Chinese medical journal**, v. 125, n. 22, p. 4093–7, Nov. 2012.
- LUTHER, P. K. The vertebrate muscle Z-disc: sarcomere anchor for structure and signalling. **Journal of muscle research and cell motility**, v. 30, n. 5–6, p. 171–85, 2009.
- MAAK, S. et al. Progress and Challenges in the Biology of FNDC5 and Irisin. **Endocrine**

**Reviews**, v. 42, n. 4, p. 436–456, 2021.

MARUYAMA, K. et al. Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand and Osteoprotegerin Regulate Proinflammatory Cytokine Production in Mice. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 6, p. 3799–3805, 2006.

MATSUO, F. S. et al. RANKL induces beige adipocyte differentiation in preadipocytes. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, p. ajpendo.00397.2019, 21 Apr. 2020.

MATTHEWS, V. B. et al. Brain-derived neurotrophic factor is produced by skeletal muscle cells in response to contraction and enhances fat oxidation via activation of AMP-activated protein kinase. **Diabetologia**, v. 52, n. 7, p. 1409–18, Jul. 2009.

MAUREL, D. B.; JÄHN, K.; LARA-CASTILLO, N. Muscle-bone crosstalk: Emerging opportunities for novel therapeutic approaches to treat musculoskeletal pathologies. **Biomedicines**, v. 5, n. 4, 2017.

MAURO, A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. **The Journal of biophysical and biochemical cytology**, v. 9, p. 493–5, Feb. 1961.

MCCARTHY, J. J. et al. Effective fiber hypertrophy in satellite cell-depleted skeletal muscle. **Development (Cambridge, England)**, v. 138, n. 17, p. 3657–66, Sep. 2011.

MCFARLANE, C. et al. Human myostatin negatively regulates human myoblast growth and differentiation. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 301, n. 1, p. C195-203, Jul. 2011.

MERA, P. et al. Osteocalcin is necessary and sufficient to maintain muscle mass in older mice. **Molecular Metabolism**, v. 5, n. 10, p. 1042–1047, 2016.

MISHRA, P. et al. Mitochondrial Dynamics Is a Distinguishing Feature of Skeletal Muscle Fiber Types and Regulates Organellar Compartmentalization. **Cell Metabolism**, v. 22, n. 6, p. 1033–1044, 2015.

MISHRA, P.; CHAN, D. C. Metabolic regulation of mitochondrial dynamics. **Journal of Cell Biology**, v. 212, n. 4, p. 379–387, 2016.

MITCHELL, W. K. et al. Sarcopenia, dynapenia, and the impact of advancing age on human skeletal muscle size and strength; a quantitative review. **Frontiers in physiology**, v. 3, p. 260, 2012.

MIYAMOTO, T. et al. Bifurcation of osteoclasts and dendritic cells from common progenitors. **Blood**, v. 98, n. 8, p. 2544–2554, 2001.

MIZOKAMI, A.; KAWAKUBO-YASUKOCHI, T.; HIRATA, M. Osteocalcin and its



- endocrine functions. **Biochemical pharmacology**, v. 132, p. 1–8, 2017.
- MOON, H. Y. et al. Running-Induced Systemic Cathepsin B Secretion Is Associated with Memory Function. **Cell metabolism**, v. 24, n. 2, p. 332–40, 2016.
- MORROW, R. M. et al. Mitochondrial energy deficiency leads to hyperproliferation of skeletal muscle mitochondria and enhanced insulin sensitivity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 10, p. 2705–2710, 2017.
- MUKUND, K.; SUBRAMANIAM, S. Skeletal muscle: A review of molecular structure and function, in health and disease. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine**, v. 12, n. 1, p. 1–46, 2020.
- NADER, G. A.; ESSER, K. A. Intracellular signaling specificity in skeletal muscle in response to different modes of exercise. **Journal of Applied Physiology**, v. 90, n. 5, p. 1936–1942, 1 May 2001.
- NAKAGAWA, N. et al. RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 253, n. 2, p. 395–400, 1998.
- NICHOLLS, D. G. et al. Bioenergetic profile experiment using C2C12 myoblast cells. **Journal of Visualized Experiments**, n. 46, p. 1–6, 2010.
- NOVELLE, M. G. et al. Irisin, two years later. **International journal of endocrinology**, v. 2013, p. 746281, 2013.
- OGIHARA, T. et al. Oxidative stress induces insulin resistance by activating the nuclear factor-kappa B pathway and disrupting normal subcellular distribution of phosphatidylinositol 3-kinase. **Diabetologia**, v. 47, n. 5, p. 794–805, May 2004.
- OLGUIN, H. C.; OLWIN, B. B. Pax-7 up-regulation inhibits myogenesis and cell cycle progression in satellite cells: a potential mechanism for self-renewal. **Developmental biology**, v. 275, n. 2, p. 375–88, 15 Nov. 2004.
- OTTENHEIJM, C. A. C.; GRANZIER, H. Lifting the Nebula: Novel Insights into Skeletal Muscle Contractility. **Physiology**, v. 25, n. 5, p. 304–310, 2010.
- OWUSU-ANSAH, E.; PERRIMON, N. Stress signaling between organs in metazoa. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 31, p. 497–522, 2015.
- PAGEAU, S. C. Denosumab. **mAbs**, v. 1, n. 3, p. 210–215, 30 May 2009.
- PAPPONEN, H. et al. Evidence for gamma-actin as a Z disc component in skeletal myofibers. **Experimental cell research**, v. 315, n. 2, p. 218–25, 15 Jan. 2009.
- PEDERSEN, B. K. The anti-inflammatory effect of exercise: its role in diabetes and

- cardiovascular disease control. **Essays in biochemistry**, v. 42, p. 105–17, 2006.
- PEDERSEN, B. K. et al. Role of myokines in exercise and metabolism. **Journal of Applied Physiology**, v. 103, n. 3, p. 1093–1098, Sep. 2007.
- PEDERSEN, B. K. Muscle as a Secretory Organ. In: **Comprehensive Physiology**. [s.l.] Wiley, 2013. p. 1337–1362.
- PEDERSEN, B. K.; FEBBRAIO, M. A. Muscle as an Endocrine Organ: Focus on Muscle-Derived Interleukin-6. **Physiological Reviews**, v. 88, n. 4, p. 1379–1406, Oct. 2008.
- PEDERSEN, B. K.; FEBBRAIO, M. A. Muscles, exercise and obesity: Skeletal muscle as a secretory organ. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 8, n. 8, p. 457–465, 2012.
- PEDERSON, L. et al. Regulation of bone formation by osteoclasts involves Wnt/BMP signaling and the chemokine sphingosine-1-phosphate. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 52, p. 20764–20769, 30 Dec. 2008.
- PENG, Y. et al. Type H blood vessels in bone modeling and remodeling. **Theranostics**, v. 10, n. 1, p. 426–436, 2020.
- PERNIGO, S. et al. Binding of Myomesin to Obscurin-Like-1 at the Muscle M-Band Provides a Strategy for Isoform-Specific Mechanical Protection. **Structure (London, England : 1993)**, v. 25, n. 1, p. 107–120, 2017.
- PETERSEN, K. F. et al. Impaired Mitochondrial Activity in the Insulin-Resistant Offspring of Patients with Type 2 Diabetes. **New England Journal of Medicine**, v. 350, n. 7, p. 664–671, 2004.
- PETERSON, J. M.; BAKKAR, N.; GUTTRIDGE, D. C. **NF- $\kappa$ B signaling in skeletal muscle health and disease**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2011. v. 96
- PLOTKIN, D. L. et al. Muscle fiber type transitions with exercise training: Shifting perspectives. **Sports**, v. 9, n. 9, p. 1–11, 2021.
- POGOZELSKI, A. R. et al. P38 $\gamma$  Mitogen-Activated Protein Kinase Is a Key Regulator in Skeletal Muscle Metabolic Adaptation in Mice. **PLoS ONE**, v. 4, n. 11, 2009.
- POMERANTZ, J. L.; BALTIMORE, D. Two pathways to NF-kappaB. **Molecular cell**, v. 10, n. 4, p. 693–5, Oct. 2002.
- PRICE, F. D. et al. Corrigendum: Inhibition of JAK-STAT signaling stimulates adult satellite cell function. **Nature medicine**, v. 21, n. 4, p. 414, Apr. 2015.
- PRICE, P. A. et al. Characterization of a gamma-carboxyglutamic acid-containing protein from bone. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 73, n. 5, p. 1447–51, May 1976.

- QUARLES, L. D. Endocrine functions of bone in mineral metabolism regulation. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 12, p. 3820–3828, 1 Dec. 2008.
- QUINN, L. S. et al. Oversecretion of interleukin-15 from skeletal muscle reduces adiposity. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 296, n. 1, p. E191–E202, Jan. 2009.
- QUIRÓS, P. M.; MOTTIS, A.; AUWERX, J. Mitonuclear communication in homeostasis and stress. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 17, n. 4, p. 213–226, 2016.
- RABIEE, F. et al. New insights into the cellular activities of Fndc5/Irisin and its signaling pathways. **Cell and Bioscience**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2020.
- RANEY, M. A. et al. AMPK activation is not critical in the regulation of muscle FA uptake and oxidation during low-intensity muscle contraction. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 288, n. 3, p. E592-8, Mar. 2005.
- RANEY, M. A.; TURCOTTE, L. P. Regulation of contraction-induced FA uptake and oxidation by AMPK and ERK1/2 is intensity dependent in rodent muscle. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 291, n. 6, p. E1220-7, Dec. 2006.
- RAUCH, F. et al. The “muscle-bone unit” during the pubertal growth spurt. **Bone**, v. 34, n. 5, p. 771–5, May 2004.
- RAZANI, B. et al. Negative feedback in noncanonical NF-kappaB signaling modulates NIK stability through IKKalpha-mediated phosphorylation. **Science signaling**, v. 3, n. 123, p. ra41, 25 May 2010.
- REGINSTER, J. Y. et al. Osteoporosis and sarcopenia: Two diseases or one? **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 19, n. 1, p. 31–36, 2016.
- RISTOW, M.; SCHMEISSER, K. Mitohormesis: Promoting health and lifespan by increased levels of reactive oxygen species (ROS). **Dose-Response**, v. 12, n. 2, p. 288–341, 2014.
- RITOV, V. B. et al. Deficiency of subsarcolemmal mitochondria in obesity and type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 54, n. 1, p. 8–14, 2005.
- RIZZOLI, S. O.; BETZ, W. J. Synaptic vesicle pools. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 6, n. 1, p. 57–69, Jan. 2005.
- ROBINSON, L. J.; BORYSENKO, C. W.; BLAIR, H. C. Tumor necrosis factor family receptors regulating bone turnover: New observations in osteoblastic and osteoclastic cell lines. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1116, p. 432–443, 2007.
- ROCA-RIVADA, A. et al. FNDC5/Irisin Is Not Only a Myokine but Also an Adipokine. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. 1–10, 2013.

- ROGERS, R. S.; NISHIMUNE, H. The role of laminins in the organization and function of neuromuscular junctions. **Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology**, v. 57–58, p. 86–105, 2017.
- ROODMAN, G. D. Cell biology of the osteoclast. **Experimental Hematology**, v. 27, n. 8, p. 1229–1241, 1999.
- RUSS, D. W.; LOVERING, R. M. Influence of activation frequency on cellular signalling pathways during fatiguing contractions in rat skeletal muscle. **Experimental physiology**, v. 91, n. 6, p. 957–66, Nov. 2006.
- SACLIER, M. et al. Differentially activated macrophages orchestrate myogenic precursor cell fate during human skeletal muscle regeneration. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 31, n. 2, p. 384–96, Feb. 2013.
- SAFDAR, A.; SALEEM, A.; TARNOPOLSKY, M. A. The potential of endurance exercise-derived exosomes to treat metabolic diseases. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 12, n. 9, p. 504–517, 2016.
- SAFDAR, A.; TARNOPOLSKY, M. A. Exosomes as mediators of the systemic adaptations to endurance exercise. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 8, n. 3, p. 1–24, 2018.
- SAITO, H. et al. Circulating FGF-23 Is Regulated by  $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and Phosphorus in Vivo. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 4, p. 2543–2549, Jan. 2005.
- SALEEM, A. et al. Effect of p53 on mitochondrial morphology, import, and assembly in skeletal muscle. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 308, n. 4, p. C319–C329, 2015.
- SAMBASIVAN, R. et al. Pax7-expressing satellite cells are indispensable for adult skeletal muscle regeneration. **Development (Cambridge, England)**, v. 138, n. 17, p. 3647–56, Sep. 2011.
- SANJO, H. et al. Allosteric regulation of the ubiquitin:NIK and ubiquitin:TRAF3 E3 ligases by the lymphotoxin-beta receptor. **The Journal of biological chemistry**, v. 285, n. 22, p. 17148–55, 28 May 2010.
- SAPIR-KOREN, R.; LIVSHITS, G. Osteocyte control of bone remodeling: is sclerostin a key molecular coordinator of the balanced bone resorption-formation cycles? **Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA**, v. 25, n. 12, p. 2685–700, Dec. 2014.
- SCHIAFFINO, S. Fibre types in skeletal muscle: A personal account. **Acta Physiologica**, v.

199, n. 4, p. 451–463, 2010.

SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C. FIBER TYPES IN MAMMALIAN SKELETAL MUSCLES. p. 1447–1531, 2019.

SCHIESSL, H.; FROST, H. M.; JEE, W. S. S. Estrogen and bone-muscle strength and mass relationships. **Bone**, v. 22, n. 1, p. 1–6, 1998.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101–1108, 2008.

SCHUMACHER, M. A. et al. The structure of irisin reveals a novel intersubunit  $\beta$ -sheet fibronectin type III (FNIII) dimer: implications for receptor activation. **The Journal of biological chemistry**, v. 288, n. 47, p. 33738–33744, 22 Nov. 2013.

SEALE, P. et al. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. **Cell**, v. 102, n. 6, p. 777–86, 15 Sep. 2000.

SENFTLEBEN, U. et al. Activation by IKK $\alpha$  of a second, evolutionary conserved, NF- $\kappa$ B signaling pathway. **Science (New York, N.Y.)**, v. 293, n. 5534, p. 1495–9, 24 Aug. 2001.

SERRANO, A. L. et al. Interleukin-6 Is an Essential Regulator of Satellite Cell-Mediated Skeletal Muscle Hypertrophy. **Cell Metabolism**, v. 7, n. 1, p. 33–44, Jan. 2008.

SERRANO, N. et al. Extraordinary fast-twitch fiber abundance in elite weightlifters. **PLOS ONE**, v. 14, n. 3, p. e0207975, 27 Mar. 2019.

SEVERINSEN, M. C. K.; PEDERSEN, B. K. Muscle–Organ Crosstalk: The Emerging Roles of Myokines. **Endocrine Reviews**, v. 41, n. 4, p. 594–609, 2020.

SHAH, K. et al. The role of muscle in bone repair: the cells, signals, and tissue responses to injury. **Current osteoporosis reports**, v. 11, n. 2, p. 130–5, Jun. 2013.

SHARIR, A. et al. Muscle force regulates bone shaping for optimal load-bearing capacity during embryogenesis. **Development (Cambridge, England)**, v. 138, n. 15, p. 3247–59, Aug. 2011.

SHEA, K. L. et al. Sprouty1 regulates reversible quiescence of a self-renewing adult muscle stem cell pool during regeneration. **Cell stem cell**, v. 6, n. 2, p. 117–29, 5 Feb. 2010.

SHIMAMURA, M. et al. OPG/RANKL/RANK axis is a critical inflammatory signaling system in ischemic brain in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 22, p. 8191–8196, 2014.

SILVA, I.; BRANCO, J. C. RANK/RANKL/OPG: LITERATURE REVIEW. **Acta reumatologia portuguesa**, v. 36, n. 3, p. 209–218, 2011.

- SIMONEAU, J.; BOUCHARD, C. Genetic determinism of fiber type proportion in human skeletal muscle. **The FASEB Journal**, v. 9, n. 11, p. 1091–1095, Aug. 1995.
- SIMONET, W. . et al. Osteoprotegerin: A Novel Secreted Protein Involved in the Regulation of Bone Density. **Cell**, v. 89, n. 2, p. 309–319, 1997.
- SIVARAJ, K. K.; ADAMS, R. H. Blood vessel formation and function in bone. **Development (Cambridge, England)**, v. 143, n. 15, p. 2706–15, 2016.
- SOMWAR, R. et al. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase alpha and beta by insulin and contraction in rat skeletal muscle: potential role in the stimulation of glucose transport. **Diabetes**, v. 49, n. 11, p. 1794–800, Nov. 2000.
- STEENBERG, A. et al. Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6. **The Journal of Physiology**, v. 529, n. 1, p. 237–242, Nov. 2000.
- STEENBERG, A. et al. IL-6 and TNF-alpha expression in, and release from, contracting human skeletal muscle. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 283, n. 6, p. E1272-8, Dec. 2002.
- STENGEL, A. et al. Circulating levels of irisin in patients with anorexia nervosa and different stages of obesity--correlation with body mass index. **Peptides**, v. 39, p. 125–30, Jan. 2013.
- SUCHACKI, K. J. et al. Skeletal energy homeostasis: A paradigm of endocrine discovery. **Journal of Endocrinology**, v. 234, n. 1, p. R67–R79, 2017.
- TANAKA, T. et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor induces fatty acid -oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 26, p. 15924–15929, 23 Dec. 2003.
- TAT, S. K. et al. New Perspective in Osteoarthritis: The OPG and RANKL System as a Potential Therapeutic Target? **The Keio Journal of Medicine**, v. 58, n. 1, p. 29–40, 2009.
- TESCH, P. A.; KARLSSON, J. Muscle fiber types and size in trained and untrained muscles of elite athletes. **Journal of Applied Physiology**, v. 59, n. 6, p. 1716–1720, 1 Dec. 1985.
- TEUFEL, A. et al. Frbp1 and Frbp2, two novel fibronectin type III repeat containing genes. **Gene**, v. 297, n. 1–2, p. 79–83, 4 Sep. 2002.
- TIDBALL, J. G. Inflammatory cell response to acute muscle injury. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 27, n. 7, p. 1022–32, Jul. 1995.
- TOYOSAWA, S. et al. Dentin Matrix Protein 1 Is Predominantly Expressed in Chicken and Rat Osteocytes But Not in Osteoblasts. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 16, n. 11, p. 2017–2026, 1 Nov. 2001.

- TRAPPE, S. et al. Skeletal muscle signature of a champion sprint runner. **Journal of Applied Physiology**, v. 118, n. 12, p. 1460–1466, 15 Jun. 2015.
- TRENDELENBURG, A. U. et al. Myostatin reduces Akt/TORC1/p70S6K signaling, inhibiting myoblast differentiation and myotube size. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 296, n. 6, p. C1258-70, Jun. 2009.
- TSUDA, E. et al. Isolation of a Novel Cytokine from Human Fibroblasts That Specifically Inhibits Osteoclastogenesis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 234, n. 1, p. 137–142, May 1997.
- TURCOTTE, L. P.; RANEY, M. A.; TODD, M. K. ERK1/2 inhibition prevents contraction-induced increase in plasma membrane FAT/CD36 content and FA uptake in rodent muscle. **Acta physiologica Scandinavica**, v. 184, n. 2, p. 131–9, Jun. 2005.
- URAKAWA, I. et al. Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. **Nature**, v. 444, n. 7120, p. 770–774, 29 Dec. 2006.
- UTVÅG, S. E. et al. Influence of extensive muscle injury on fracture healing in rat tibia. **Journal of orthopaedic trauma**, v. 17, n. 6, p. 430–5, Jul. 2003.
- VAN HALL, G. et al. Interleukin-6 stimulates lipolysis and fat oxidation in humans. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 88, n. 7, p. 3005–10, Jul. 2003.
- VEGA, D.; MAALOUF, N. M.; SAKHAEI, K. The Role of Receptor Activator of Nuclear Factor- $\kappa$ B (RANK)/RANK Ligand/Osteoprotegerin: Clinical Implications. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 92, n. 12, p. 4514–4521, 2007.
- VIKNE, H. et al. Human skeletal muscle fiber type percentage and area after reduced muscle use: A systematic review and meta-analysis. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v. 30, n. 8, p. 1298–1317, 4 Aug. 2020.
- VINCENT, B. et al. ACTN3 (R577X) genotype is associated with fiber type distribution. **Physiological Genomics**, v. 32, n. 1, p. 58–63, Dec. 2007.
- VON MALTZAHN, J. et al. Pax7 is critical for the normal function of satellite cells in adult skeletal muscle. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 41, p. 16474–9, 8 Oct. 2013.
- VON MALTZAHN, J.; BENTZINGER, C. F.; RUDNICKI, M. A. Characteristics of Satellite Cells and Multipotent Adult Stem Cells in the Skeletal Muscle. In: [s.l: s.n.]. p. 63–73.
- WALLENIUS, V. et al. Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. **Nature medicine**, v. 8, n. 1, p. 75–9, Jan. 2002.
- WALSH, M. C. et al. OSTEOIMMUNOLOGY: Interplay Between the Immune System and

- Bone Metabolism. **Annual Review of Immunology**, v. 24, n. 1, p. 33–63, 2006.
- WANG, K.; MCCLURE, J.; TU, A. Titin: major myofibrillar components of striated muscle. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n. 8, p. 3698–702, Aug. 1979.
- WANG, Y.-X. et al. Regulation of Muscle Fiber Type and Running Endurance by PPAR $\delta$ . **PLoS Biology**, v. 2, n. 10, p. e294, 24 Aug. 2004.
- WIDEGREN, U. et al. Influence of exercise intensity on ERK/MAP kinase signalling in human skeletal muscle. **Pflugers Archiv : European journal of physiology**, v. 441, n. 2–3, p. 317–22, Dec. 2000.
- WINDER, W. W. et al. Activation of AMP-activated protein kinase increases mitochondrial enzymes in skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, v. 88, n. 6, p. 2219–2226, 2000.
- WOLFE, R. R. The underappreciated role of muscle in health and disease. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 84, n. 3, p. 475–482, 1 Dec. 2006.
- WONG, B. B. R. et al. Activation-induced Cytokine  $\gamma$ , a New TNF Family Member Cell – specific Survival Factor. **Brief Definitive Report**, v. 186, n. 12, p. 2075–2080, 1997.
- WRANN, C. D. et al. Exercise induces hippocampal BDNF through a PGC-1 $\alpha$ /FNDC5 pathway. **Cell metabolism**, v. 18, n. 5, p. 649–59, 5 Nov. 2013.
- WRETMAN, C. et al. Effects of concentric and eccentric contractions on phosphorylation of MAPK(erk1/2) and MAPK(p38) in isolated rat skeletal muscle. **The Journal of physiology**, v. 535, n. Pt 1, p. 155–64, 15 Aug. 2001.
- XIAO, S.; GRÄTER, F. Molecular basis of the mechanical hierarchy in myomesin dimers for sarcomere integrity. **Biophysical journal**, v. 107, n. 4, p. 965–73, 19 Aug. 2014.
- YAMADA, M. et al. High concentrations of HGF inhibit skeletal muscle satellite cell proliferation in vitro by inducing expression of myostatin: a possible mechanism for reestablishing satellite cell quiescence in vivo. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 298, n. 3, p. C465-76, Mar. 2010.
- YAMASHITA, T. et al. NF- $\kappa$ B p50 and p52 regulate receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) and tumor necrosis factor-induced osteoclast precursor differentiation by activating c-Fos and NFATc1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 25, p. 18245–18253, 2007.
- YANG, W. et al. Myostatin induces cyclin D1 degradation to cause cell cycle arrest through a phosphatidylinositol 3-kinase/AKT/GSK-3 $\beta$  pathway and is antagonized by insulin-like growth factor 1. **The Journal of biological chemistry**, v. 282, n. 6, p. 3799–808, 9 Feb. 2007.
- YANG, Z. et al. Decreased irisin secretion contributes to muscle insulin resistance in high-fat



diet mice. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 8, n. 6, p. 6490–7, 2015.

YIN, H.; PRICE, F.; RUDNICKI, M. A. Satellite cells and the muscle stem cell niche. **Physiological reviews**, v. 93, n. 1, p. 23–67, Jan. 2013.

YU, M. et al. Marathon running increases ERK1/2 and p38 MAP kinase signalling to downstream targets in human skeletal muscle. **The Journal of physiology**, v. 536, n. Pt 1, p. 273–82, 1 Oct. 2001.

YU, M. et al. Metabolic and mitogenic signal transduction in human skeletal muscle after intense cycling exercise. **The Journal of physiology**, v. 546, n. Pt 2, p. 327–35, 15 Jan. 2003.

ZHANG, Y. et al. Irisin stimulates browning of white adipocytes through mitogen-activated protein kinase p38 MAP kinase and ERK MAP kinase signaling. **Diabetes**, v. 63, n. 2, p. 514–25, Feb. 2014.

ZOT, A. S.; POTTER, J. D. Structural Aspects of Troponin-Tropomyosin Regulation of Skeletal Muscle Contraction. **Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry**, v. 16, n. 1, p. 535–559, Jun. 1987.

## ANEXOS

### Anexo A – Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



## AUTORIZAÇÃO

A CEUA-FMRP autoriza a execução do projeto intitulado: “*Sinalização RANK-RANKL na dinâmica mitocondrial do tecido muscular esquelético*”, registrado com o número do protocolo **069/2020**, sob a responsabilidade da **Profa. Dra. Mariana Kioomy Osako**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O Protocolo foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em reunião de 29 de junho de 2020.

Colaborador: Paulo Henrique Cavalcanti de Araújo

**Lembramos da obrigatoriedade do Relatório Final, em modelo da CEUA, para emissão do Certificado, como disposto nas Resoluções Normativas do CONCEA.**

Finalidade		() Ensino (X) Pesquisa Científica		
Vigência da autorização		29/06/2020 a 01/07/2023		
Espécie/Linhagem	Nº de Animais	Peso/Idade	Sexo	Origem
Camundongo / C57BL-6J	16	20g / 60 dias	Macho	Jackson Laboratory
Camundongo / C57BL-6J	16	20g / 60 dias	Fêmea	Jackson Laboratory
Camundongo / B6.129S4-Tnfrsf11b tm1Eac / J	08	20g / 60 dias	Macho	Jackson Laboratory
Camundongo / B6.129S4-Tnfrsf11b tm1Eac / J	08	20g / 60 dias	Fêmea	Jackson Laboratory
Camundongo /heterozigoto B6.129S4-Tnfrsf11b tm1Eac / J	08	20g / 60 dias	Macho	Jackson Laboratory
Camundongo / heterozigoto B6.129S4-Tnfrsf11b tm1Eac / J	08	20g / 60 dias	Fêmea	Jackson Laboratory

Ribeirão Preto, 29 de junho de 2020

**Profa. Dra. Katiuchia Uzun Sales**  
Coordenadora da CEUA-FMRP-USP

## ANEXOS B – Artigos publicados em colaboração

Título: *RANKL induces beige adipocyte differentiation in preadipocytes*

*Am J Physiol Endocrinol Metab* 318: E866–E877, 2020.  
First published April 21, 2020; doi:10.1152/ajpendo.00397.2019.

**RESEARCH ARTICLE** | *Browning and Beiging of Adipose Tissue: Its Role in the Regulation of Energy Homeostasis and as a Potential Target for Alleviating Metabolic Diseases*

**RANKL induces beige adipocyte differentiation in preadipocytes**

Flávia Sayuri Matsuo,<sup>1</sup> Paulo Henrique Cavalcanti de Araújo,<sup>1</sup> Ryerson Fonseca Mota,<sup>1</sup> Ana Júlia Rossoni Carvalho,<sup>1</sup> Mariana Santos de Queiroz,<sup>1</sup> Beatriz Baldo de Almeida,<sup>1</sup> Karen Cristine de Oliveira Santos Ferreira,<sup>1</sup> Rodrigo Jair Morandi Metzner,<sup>1</sup> Gustavo Duarte Ferrari,<sup>2</sup> Luciane Carla Alberici,<sup>2</sup> and Mariana Kiomy Osako<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Cell and Tissue Biology, Department of Cell and Molecular Biology and Pathogenic Bioagents, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil; and <sup>2</sup>Department of Biomolecular Sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo, São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

Submitted 20 September 2019; accepted in final form 9 April 2020

**Matsuo FS, Cavalcanti de Araújo PH, Mota RF, Carvalho AJ, Santos de Queiroz M, Baldo de Almeida B, Ferreira KC, Metzner RJ, Ferrari GD, Alberici LC, Osako MK.** RANKL induces beige adipocyte differentiation in preadipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 318: E866–E877, 2020. First published April 21, 2020; doi: 10.1152/ajpendo.00397.2019.—The receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) (RANK), its ligand (RANKL), and the decoy receptor osteoprotegerin (OPG) are a triad of proteins that regulate bone metabolism, and serum OPG is considered a biomarker for cardiovascular diseases and Type 2 diabetes; however, the implications of OPG in adipose tissue metabolism remains elusive. In this study, we investigate RANK-RANKL-OPG signaling in white adipose tissue browning. Histological analysis of osteoprotegerin knockout (OPG<sup>-/-</sup>) mice showed subcutaneous white adipose tissue (sWAT) browning, resistance for high-fat diet-induced weight gain, and preserved glucose metabolism compared with wild-type (WT) mice. Stromal vascular fraction (SVF) cells from sWAT of OPG<sup>-/-</sup> mice showed multilocular morphology and higher expression of brown adipocyte marker genes compared with those from the WT group. Infusion of RANKL induced browning and elevated respiratory rates in sWAT, along with increased whole body oxygen consumption in mice measured by indirect calorimetry. Subcutaneous WAT-derived SVF and 3T3-L1 cells, but not mature white adipocytes, differentiated into beige adipose tissue in the presence of RANKL. Moreover, SVF cells, even under white adipocyte differentiation, showed multilocular lipid droplet, lower lipid content, and increased expression of beige adipocyte markers with RANKL stimulation. In this study, we show for the first time the contribution of RANKL to increase energy expenditure by inducing beige adipocyte differentiation in preadipocytes.

beige adipocyte; browning; OPG; RANK; RANKL

**INTRODUCTION**

Obesity is defined as abnormal fat accumulation caused by the energy imbalance between calorie intake and energy expenditure, and it impacts public health as a risk factor for cardiovascular diseases, ischemic stroke, and Type 2 diabetes (58).

The white adipose tissue (WAT) stores energy in adipocytes as a unilocular lipid droplet and is divided into two main types named according to its location: visceral (vWAT) and subcutaneous (sWAT), which show differences in gene expression, metabolic profile, and cell composition (30). The vWAT is resistant to acquire a thermogenic profile and is usually related to metabolic disease (46), and sWAT exhibits high proliferation and differentiation capacity because it contains larger adipogenic precursor subpopulation (51, 52, 55, 56). In contrast, the brown adipose tissue (BAT) presents adipocytes with multilocular lipid droplets, high mitochondrial content, and is responsible for nonshivering thermogenesis (4, 46). Recently, beige (also called brite) adipose tissue has been described as WAT with acquired BAT characteristics through a process called browning (16, 25). Uncoupling protein 1 (UCP1) is found in the mitochondrial inner membrane, where it uncouples the electron transport in the respiratory chain from ATP synthesis by leaking protons back into mitochondrial matrix in a process that releases heat (38). Thus, brown and beige adipocytes consume their lipid reservoir and drive part of the glucose and lipid oxidation into thermogenesis. Beyond this thermogenic ability, beige adipocytes improve insulin response and glucose and lipid metabolism; consequently, the WAT browning has been reported as protective against high-fat diet (HFD)-induced diabetes. Therefore, the understanding of the mechanisms involved in the differentiation and maintenance of beige adipocyte is on the spot of investigations for treating obesity and metabolic diseases (16, 17).

The receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) (RANK), its ligand (RANKL), and the decoy receptor osteoprotegerin (OPG) are a triad of proteins that regulate bone metabolism as RANKL secreted from osteoblasts stimulates RANK in preosteoclasts to osteoclastogenesis and bone resorption. OPG is a decoy receptor for RANKL, also produced by osteoblasts, which inhibits RANK activation and negatively regulates bone turnover. OPG and RANKL expression are under hormonal control in bone to finely regulate blood calcium level, and serum OPG and RANKL levels highly correlate with the bone metabolism status (24, 29). However, RANK is expressed in other cell types, and RANKL is described to regulate mammary gland development (7), vascular

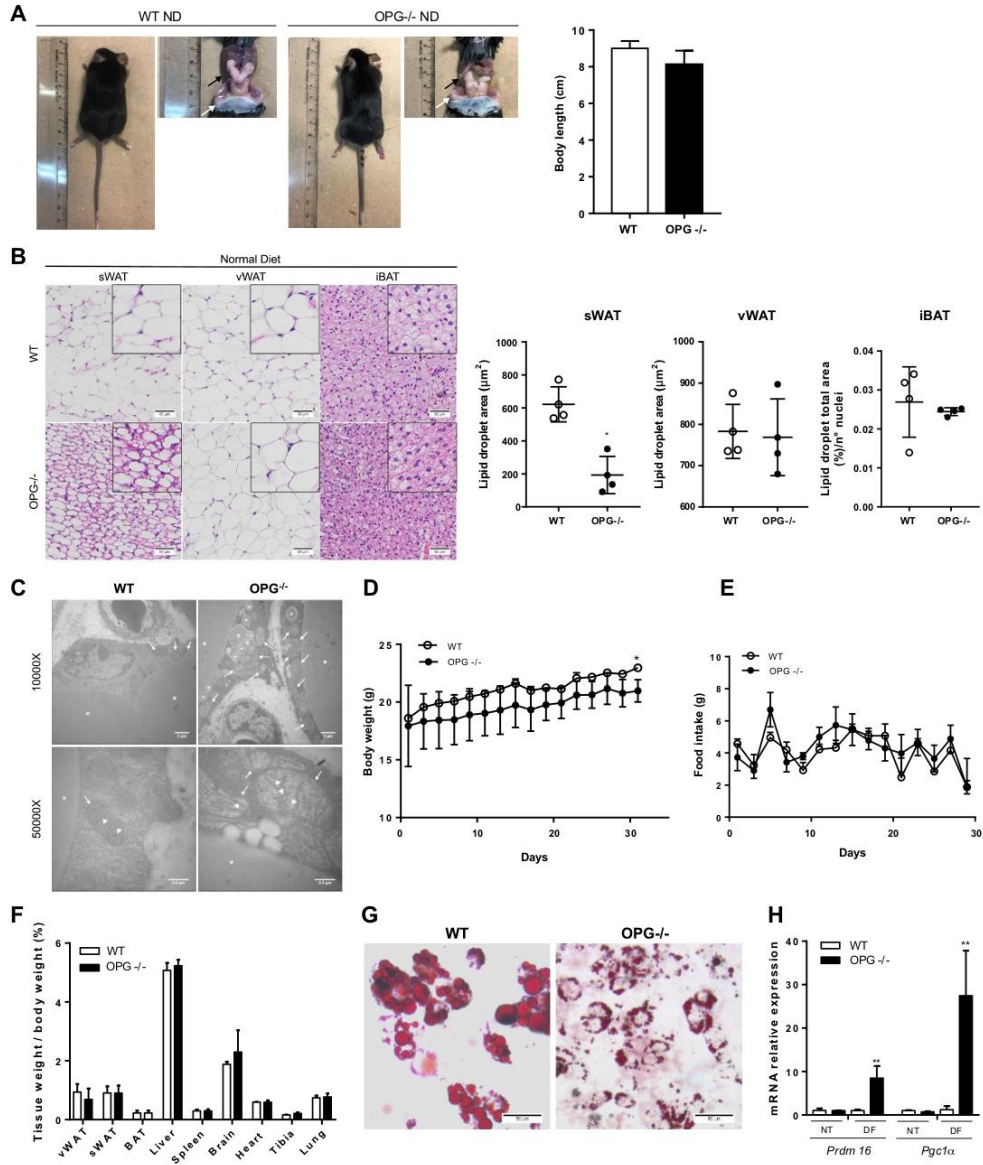
Correspondence: M. K. Osako (mko@fmrp.usp.br).

E866

0193-1849/20 Copyright © 2020 the American Physiological Society

http://www.ajpendo.org

Downloaded from journals.physiology.org/journal/ajpendo at CAPES-USP (143.107.198.064) on May 27, 2020.



calcification (39, 40), brain ischemia (39), dendritic cell communication (41), and regulatory T-cell development (45). Also, endothelial cells and endocrine pancreas were reported to secrete OPG (19, 32, 47). Therefore, the expression of this protein triad is tissue specific; regulated and secreted OPG and RANKL may impact different tissues.

High-serum OPG level is related to obesity, insulin resistance, and cardiovascular diseases, and it is considered a biomarker for Type 2 diabetes, and metabolic syndrome (1, 12, 18, 36, 43). OPG expression levels increase in WAT of animals fed a high-fat diet (3); however, the implications of OPG in adipose tissue metabolism remains elusive, and the explanation for the rise of plasmatic OPG level and its impact on these pathologies remains largely unclear.

In this study, OPG<sup>-/-</sup> mice show browning of subcutaneous WAT (sWAT), lower weight gain, preserved glucose metabolism compared with wild-type (WT) mice fed an HFD, and RANKL treatment stimulates beige differentiation of preadipocytes, browning of sWAT depots, and increased energy expenditure in mice.

## METHODS

**Animal studies.** Animal care and experimentation were performed in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA), and this study was approved under the protocol number: 047/2017 by Ribeirão Preto Medical School Animal Care and Use Committee of University of São Paulo.

The wild-type C57BL/6J (WT) and the B6.129S4-Tnfrsf11b tm1EacJ (OPG<sup>-/-</sup>) mice were obtained from the Jackson Laboratory. All animals used in this study were 8-wk-old male mice. Normal diet (ND) consisted of AIN-93G diet, and a high-fat diet (HFD) consisted of AIN-93G modified to contain 35% lipids (4% soy oil and 31% lard). Mice were subjected to a normal diet (ND) or a high-fat diet (HFD) for up to 3 mo. Animals had access to water and food ad libitum. All mice were housed in the animal facility at 20°C-22°C under a 12:12-h light-dark cycle.

**Histological analysis.** The dissected adipose tissues consisted of visceral white adipose tissue (vWAT) located in the epididymal region, the subcutaneous white adipose tissue (sWAT) located in the inguinal depot, and the interscapular brown adipose tissue (iBAT). Paraffin sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E), and images were taken by ScanScope (Olympus BX61VS). The mean lipid droplet area was quantified with the open-source software Adiposoft developed as a plug-in for Fiji (advanced distribution of ImageJ) (11). For brown adipose tissue, the percentage of the total area occupied with lipid droplets was normalized by the number of nuclei.

**Transmission electron microscopy.** Subcutaneous (inguinal) white adipose tissue from WT and OPG<sup>-/-</sup> mice were cut in 1 mm, and

fixed in cacodylate buffer 0.1 M (pH = 7.3) containing 2.5% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde. Postfixation was performed with cacodylate buffer 0.1 M (pH = 7.3) with 1% osmium tetroxide. Uranyl acetate was used as a contrast. Transmission electron micrographs (70 nm) were captured using JEM-100CXII.

**Cell differentiation into white and beige adipocytes.** Stromal vascular fraction (SVF) cell isolation was performed as described before (26). SVF cell and cell lineage 3T3-L1 differentiation into white adipocytes were performed according to the differentiation protocol used throughout literature (31, 37, 61). Briefly, cells were cultured in the induction medium containing DMEMc (DMEM complemented with 10% FBS, 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin), 1 µM dexamethasone (Sigma), 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX; Sigma), and 1.5 µg/ml insulin (Sigma). Two days after incubation with the induction medium, cells were maintained in DMEMc supplemented with 1.5 µg/ml insulin (maintenance medium) in an interval up to 7 days, and the medium was refreshed every other day until the 5th day and stimulated with recombinant murine soluble RANKL (RANKL) (20 ng/ml) for additional 2 days when specified. The beige adipocyte differentiation was performed using induction medium containing DMEMc with 125 µM indomethacin (Sigma), 2 µg/ml dexamethasone (Sigma), 0.5 mM IBMX (Sigma), and 0.5 µM rosiglitazone (Sigma). After 2 days, the medium was changed to DMEMc supplemented with triiodothyronine (T3; Sigma) (2, 23, 35) and 5 µg/ml insulin (Sigma), and refreshed every other day following protocol as reported by Liisberg et al. (26). When specified, the differentiation of preadipocytes occurred with or without RANKL (20 ng/ml) stimulation. Oil Red O (Sigma-O0625) staining was performed according to the manufacturer's instructions.

**Real-time quantitative PCR.** RNA was extracted using Qiazol reagent (Qiagen), samples were digested with DNase (Sigma) to exclude DNA contamination, and the cDNA conversion was performed using reverse-transcriptase high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems). The gene expression was analyzed by quantitative PCR using QuantiFast SYBR Green (Qiagen). Reactions were performed in a 96-well format using ABI PRISM 7500 instrument (Applied Biosystems), and relative mRNA levels were calculated through comparative CT normalized to GAPDH expression (28). All experiments were performed in triplicate. The primer sequences are as follows: *Pgc1α* forward: 5'-GCTATGGTTTCATCACCTACC-3' and reverse: 5'-GTACAGCTCGAAGTCAGTTTC-3'; *Ucp1* forward: 5'-GAACAGCTCGTTGACTTTC-3' and reverse: 5'-TCATACACTCCACCTCTC-3'; *Gapdh* forward: 5'-AACGGATTTGGCCGTATTG-3' and reverse: 5'-GTGGTGAAGACACCAGTAGA-3'; *Cpt1* forward: 5'-CAACATGGGAAGACAGTGG-3' and reverse: 5'-GTGAGGATCAAGAACCGAAG-3'; *Prdm16* forward: 5'-AGGATGATGACAGCTTAGCC-3' and reverse: 5'-GTGGTTCCTCATCCTCTTCA-3'; and *Tmem26* F: 5'-CTAGACCAAGGTGACATTCC-3' and R: 5'-CAGTGTCTCACTCACTATG-3'.

**Enzyme-linked immunosorbent assay.** Serum RANKL level was measured using the 96-well strip plate Quantikine mouse TRANCE/RANK L/TNFSF11 ELISA Kit (R&D Systems, MTR00), serum

Fig. 1. Analysis of wild-type (WT) and osteoprotegerin-null (OPG<sup>-/-</sup>) mice fed a normal diet. *A*: representative images of male WT and OPG<sup>-/-</sup> mice on a normal diet (ND). Black arrows indicate visceral white adipose tissue, and white arrows indicate subcutaneous white adipose tissue and body length from WT and OPG<sup>-/-</sup> fed a ND. *B*: representative images of hematoxylin-and-eosin (H&E; ×200 magnification)-stained sections and quantification of lipid droplet area in subcutaneous white adipose tissue (sWAT), visceral white adipose tissue (vWAT), and lipid droplet area (%)/nuclei number in interscapular brown adipose tissue (iBAT) from 8-wk-old male WT and OPG<sup>-/-</sup> mice fed a ND. *C*: transmission electron micrographs of sWAT from WT and OPG<sup>-/-</sup> mice fed a ND (\* represents lipid droplet, white arrows indicate mitochondria, and arrowheads indicate mitochondrial cristae, ×10,000 and ×50,000 magnification). *D*: body weight of WT and OPG<sup>-/-</sup> mice during ND. *E*: food intake from WT and OPG<sup>-/-</sup> mice during ND. *F*: tissue weight in relation to total body weight (%) from WT and OPG<sup>-/-</sup> mice. *G*: Oil Red O staining in stromal vascular fraction (SVF) cells from WT and OPG<sup>-/-</sup> mice differentiated into beige adipocytes. *H*: quantitative PCR for *Prdm16* and *Pgc1α* expression in SVF from WT and OPG<sup>-/-</sup> mice-derived SVF cells under differentiation to beige adipocytes for 1 day (NT represents nontreated group and DF, differentiated group). Animal experiments performed with *n* = 4 mice. Unpaired Student's *t* test was performed to compare difference between two groups, and one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparisons test was performed to compare all groups. (\**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01). All data are presented as means ± SD.

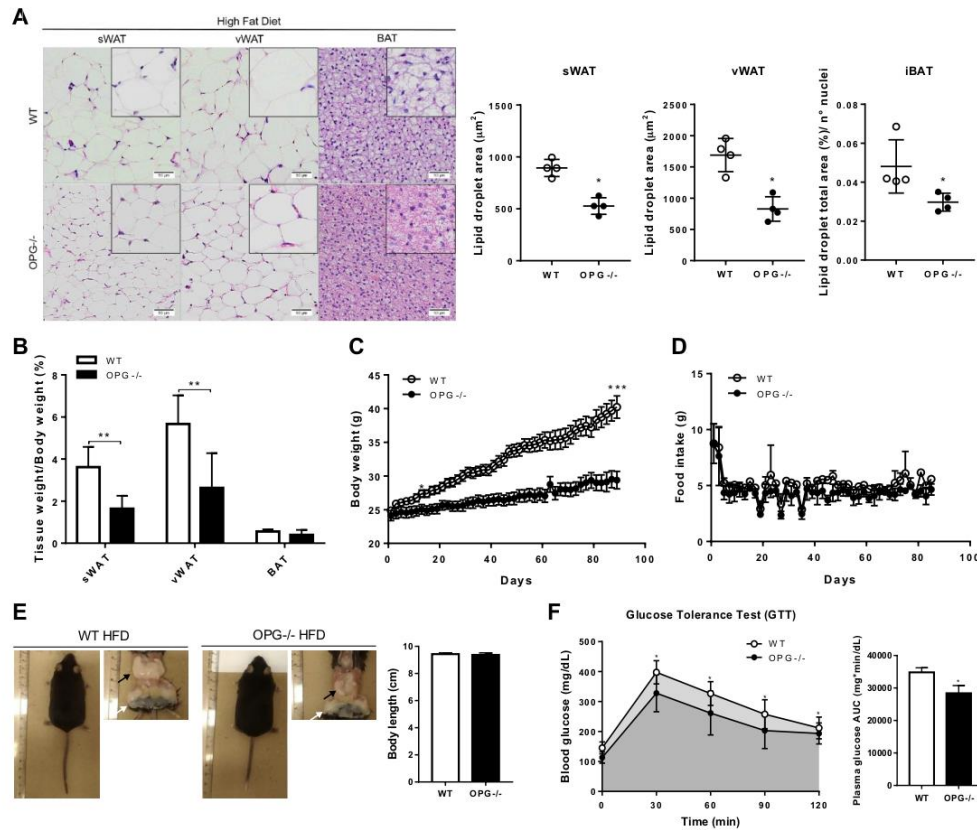


Fig. 2. Analysis of wild-type (WT) and osteoprotegerin-null (OPG<sup>-/-</sup>) mice submitted to high-fat diet (HFD). **A**: representative images of hematoxylin-and-eosin (H&E;  $\times 200$  magnification)-stained sections and quantification of lipid droplet area in subcutaneous white adipose tissue (sWAT), visceral white adipose tissue (vWAT), and lipid droplet area (%)/nuclei number in interscapular brown adipose tissue (iBAT) from 8-wk-old male WT and OPG<sup>-/-</sup> mice on a high-fat diet (HFD) for 3 mo. **B**: adipose tissue weight in relation to total body weight (%) from WT and OPG<sup>-/-</sup> mice after HFD. **C**: Body weight and **D**: food intake from WT and OPG<sup>-/-</sup> mice during HFD. **E**: representative images and body length of WT and OPG<sup>-/-</sup> mice under HFD (black arrows indicate visceral white adipose tissue, and white arrows indicate subcutaneous white adipose tissue). **F**: flow cytometry from WT and OPG<sup>-/-</sup> mice vWAT SVF-derived cells labeled with the conjugated fluorescent antibody F4/80 and iNOS. **G**: serum OPG and RANKL levels in WT mice under ND and HFD. **H**: correlation between OPG serum levels and area under the curve from GTT of WT mice under HFD. **I**: OPG levels in sWAT, vWAT, and iBAT ex vivo cultured explant from WT mice under ND or HFD. **J**: serum receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand (RANKL), osteocalcin, and adiponectin levels in WT and OPG<sup>-/-</sup> mice. Animal experiments were performed with  $n = 6$  mice. Unpaired Student's  $t$  test was performed to compare difference between two groups. (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ ). All data are presented as means  $\pm$  SD.

adiponectin was quantified with mouse adiponectin/Acrp30 Quantikine ELISA kit (R&D Systems; MRP300), osteoprotegerin was detected with mouse osteoprotegerin/TNFRSF11B Quantikine ELISA kit (R&D Systems; MOP00), and serum osteocalcin level was determined with mouse-Glu-Osteocalcin High Sensitive EIA kit (Takara; MK129). All reactions were performed as described by the manufacturers.

**Insulin tolerance test and glucose tolerance test.** The insulin tolerance test (ITT) was performed 2 wk before the end of the diet in animals submitted to 6 h of fasting, and after intraperitoneal injection

of insulin (0.75 U/kg). The blood glucose was determined through caudal vein puncture at 0, 30, 60, 90, and 120 min. The glucose tolerance test (GTT) was performed at the end of the diet period in animals submitted to 16 h of fasting; after intraperitoneal injection of glucose (1.5 g/kg), blood glucose was measured in a caudal vein puncture at intervals 0, 30, 60, 90, and 120 min (42).

**Miniosmotic pump implantation.** Wild-type, 8-wk-old male mice received subcutaneous implantation of miniosmotic pump (Alzet, Cupertino, CA) after anesthesia with ketamine and xylazine. The dose of RANKL administered was 1  $\mu$ g/mouse released during

E870

RANKL INDUCES BROWNING OF SUBCUTANEOUS WHITE ADIPOSE TISSUE

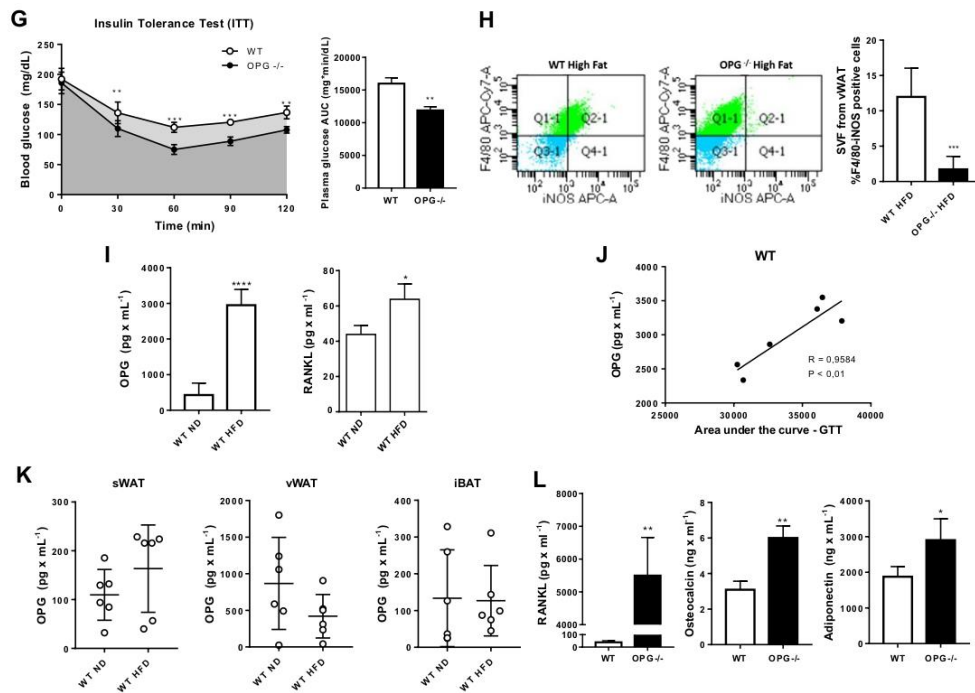


Fig. 2.—Continued

28 days. The control group was implanted with saline-filled pumps.

**Respiratory rate measurement.** Respiratory rates were determined by oxygen consumption monitored in a high-resolution Oxygraph-2 k (Oroboros, Innsbruck, Austria) (34) containing 2.1 mL of air saturated MiR05 (0.5 mM EGTA, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 60 mM K-lactobionate, 20 mM taurine, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 mM HEPES, 110 mM sucrose, and 1 g/L albumin; pH 7.1). The respiration protocol followed that of Pesta and Gnaiger (44). Approximately 12 mg of tissue were mechanically permeabilized using needles and incubated with saponin (50 μg/mL) for 20 min for chemical permeabilization. Respiration was supported by 2 mM pyruvate, 2 mM glutamate, and 2 mM malate. The respiratory rates were determined after the addition of 1 mM ADP (phosphorylation or OXPHOS state) and 1 μg/mL oligomycin, an ATP synthase inhibitor (nonphosphorylating or LEAK state). After the oxygen consumption, the reaction mixture was completely removed from the oxygraph chamber and submitted to protein quantification using the Bradford method for normalization.

**Indirect calorimetry.** After a 48-h environmental adaptation, the body metabolism and locomotor activity assessment of the animals were performed. The groups treated with saline (WT) and RANKL (WT+RL) were placed at the same time into a hermetic chamber for each group connected to an indirect calorimetry system with a sensor for locomotor activity (Oxylet, Pan Laboratory, Spain); animals had water and food access ad libitum (*n* = 4). The oxygen consumption (V<sub>O<sub>2</sub></sub>), CO<sub>2</sub> production (V<sub>CO<sub>2</sub></sub>), and number of movements were recorded for 48 h.

**Flow cytometry.** After visceral (epididymal) white adipose tissue digestion to obtain stromal vascular fraction (SVF) containing macrophages from WT and OPG<sup>-/-</sup> mice, cells were counted in a Neubauer chamber, and 1 × 10<sup>6</sup> cells were labeled with the conjugated fluorescent antibodies for F4/80 (Invitrogen) and iNOS (Invitrogen) during 1 h. After staining, cells were submitted to immunophenotyping using a BD FACS Canto I flow cytometry. The cells were gated by forward versus side scatter density plots (FSC vs. SSC) together with the membrane-impermeant dye, propidium iodide, to exclude debris, and identify living cells of interest based on size and granularity.

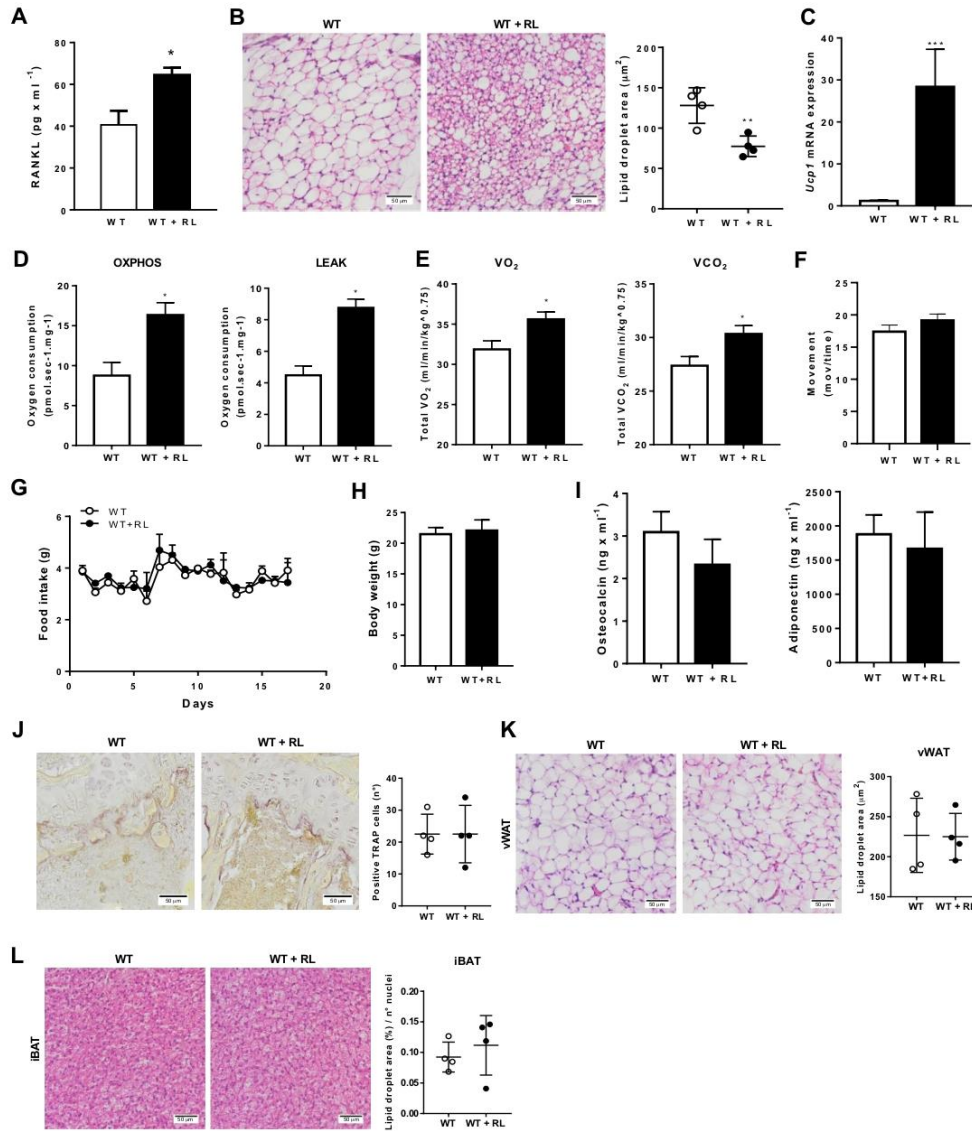
**Tartrate-resistant acid phosphatase assay.** The dissected tibia was decalcified in 0.1 M EDTA (pH = 7.4 adjusted with NaOH pellets) for 4 wk. For detection of acid phosphatase in tibia, we used acid phosphatase leukocyte kit (Sigma; 387A). Briefly, paraffin-embedded 5-μm-thick tibia sections were incubated with freshly prepared solution containing naphthol AS-BI phosphoric acid, diazotized fast garnet GBC, and L<sup>+</sup>-tartrate solution at 37°C for 1 h. Images were taken by Scanscope (Olympus BX61VS), and all positive tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) cells were counted with ImageJ software.

**Ex vivo culture.** The ex vivo explant culture was performed as described before (54). Tissues were dissected, washed in PBS (136 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO) with penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 μg/mL), cut in small pieces, weighted, distributed in a 24-well plate, after 24-h incubation with RPMI complemented with 10% FBS, penicillin (100 U/mL), strepto-

mycin (100 µg/mL), the supernatant was collected and centrifuged, and then ELISA assays were performed.

**Time-lapse microscopy.** Images of cell differentiation time course were taken by Bio-Station IM-Q (Nikon) every 5 min in seven different fields for 48 h. Data were analyzed by ImageJ Fiji software.

**Statistical analysis.** Differences between two groups were analyzed by Student's *t* test, and differences among three groups or more groups were calculated using the one-way or two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test. All data are presented as means ± SD and were analyzed using GraphPad Prism v. 7.0 (San





Diego, CA). Significance difference was presented at  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ , and  $P < 0.0001$ .

## RESULTS

*OPG deficiency increases browning of subcutaneous white adipose tissue and improves glucose metabolism on a high-fat diet.* Serum OPG level has been described as a biomarker for Type 2 diabetes, metabolic syndrome, and obesity (1, 12, 59), and it is elevated in the high-fat diet-fed mice (3). In this context, we investigated the effect of RANK-RANKL activation in adipose tissue depots of 8-wk-old OPG<sup>-/-</sup> mice fed a normal (ND) or a high-fat diet (HFD) up to 3 mo and compared them to wild-type (WT) mice. OPG<sup>-/-</sup> mice breeding generates littermates with phenotype variation in body weight and length, and some pups already show a curved spine due to osteoporosis. Thus, to minimize this interference, we used OPG<sup>-/-</sup> mice without significant size difference of age-paired WT mice (Fig. 1A).

In groups under ND, we observed smaller and multilocular lipid droplets in sWAT from OPG<sup>-/-</sup> mice compared with WT mice, as shown by histological analysis (Fig. 1B), and adipocytes presented higher mitochondria volume, denser mitochondria cristae, and smaller lipid droplets, as observed by transmission electron microscopy (Fig. 1C). OPG<sup>-/-</sup> showed a slight decrease in weight gain compared with WT on a ND (Fig. 1D, both groups showed no difference in food intake (Fig. 1E) and presented organs and tissues with similar weights (Fig. 1F). Stromal vascular fraction (SVF) cells collected from sWAT of OPG<sup>-/-</sup> mice and induced to differentiate into beige adipocytes presented multilocular and smaller lipid droplets in contrast to sWAT-derived SVF cells from WT mice, as shown by Oil Red O on day 7 of differentiation (Fig. 1G). Furthermore, SVF cells from OPG<sup>-/-</sup> mice showed increased expression of brown adipocyte-related genes, such as *Prdm16* and *Pgc1α* as early as 1 day of differentiation (Fig. 1H). These results indicate that OPG<sup>-/-</sup> mice present sWAT browning, as this depot encloses SVF cell reservoir more responsive to differentiate into beige adipocytes correlated with lower body weight gain compared with WT mice fed a ND.

Under HFD treatment, we observed smaller lipid droplet area in sWAT and vWAT, and decreased lipid deposition in iBAT of OPG<sup>-/-</sup> mice (Fig. 2A), which correlated with smaller sWAT and vWAT compared with WT mice (Fig. 2B). Importantly, the weight gain was mitigated in OPG<sup>-/-</sup> mice, as significant difference in body weight was observed before 1 mo on an HFD compared with WT mice (Fig. 2C) despite similar food intake (Fig. 2D) and body length (Fig. 2E). We also found preserved glucose and insulin sensitivity in OPG<sup>-/-</sup> mice, as shown by lower glycemia and glucose area

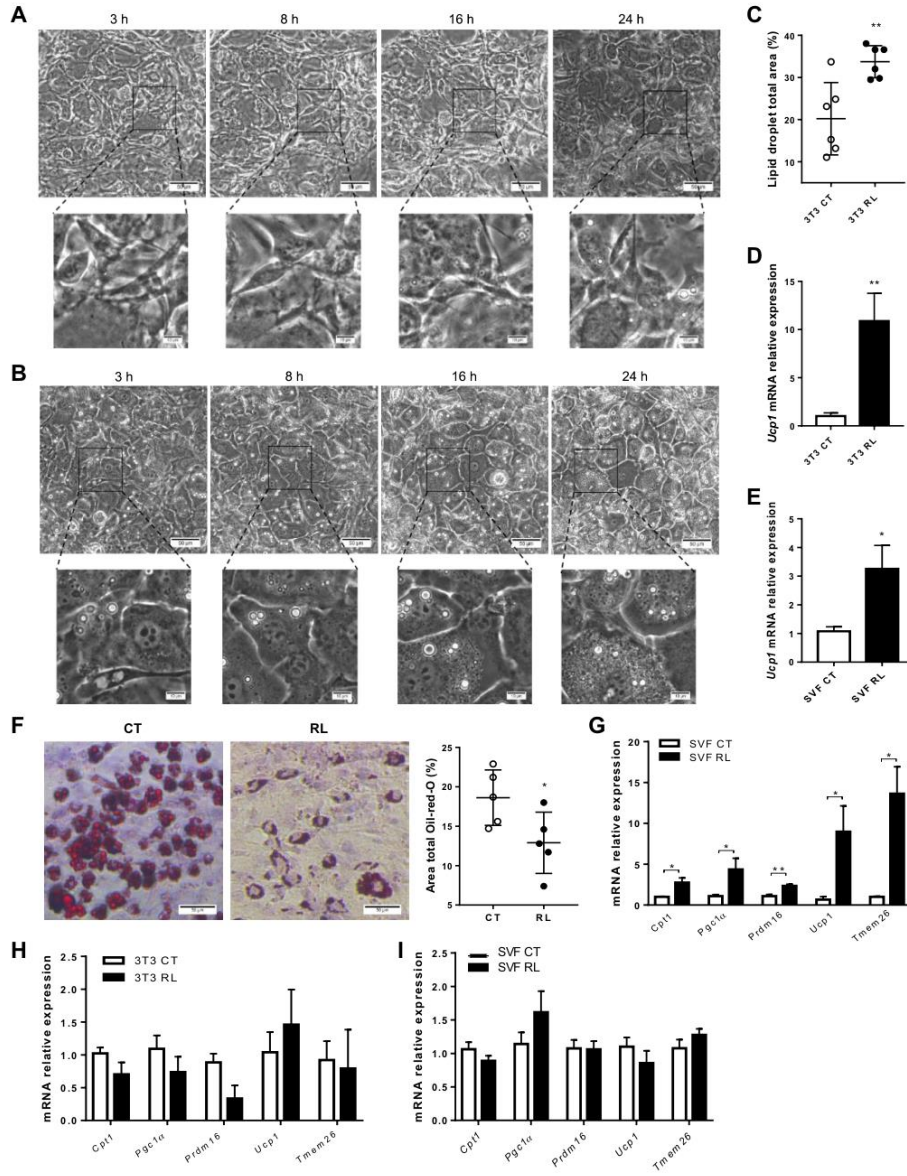
under the curve in both GTT and ITT (Fig. 2, F and G). The HFD is classically related to proinflammatory changes that impair insulin transduction signaling and induce insulin resistance (14, 57). Accordingly, SVF from vWAT of HFD-fed OPG<sup>-/-</sup> mice showed a significant decrease in iNOS-positive cells compared with WT group (Fig. 2H).

We confirmed that HFD increases both serum OPG and RANKL (Fig. 2I) and found that OPG level positively correlated with glucose area under the curve (AUC) during GTT from WT during HFD (Fig. 2J). However, in the supernatant of ex vivo culture of sWAT, vWAT, and iBAT depots, RANKL was undetectable (data not shown), and vWAT seems to secrete higher OPG levels compared with sWAT and iBAT (Fig. 2K). However, in all the three depots from WT mice under ND or HFD, we detected no difference in OPG levels (Fig. 2K). Therefore, adipose tissue may not be responsible for increasing circulating RANKL and OPG in HFD context. OPG<sup>-/-</sup> mice show a higher level of free circulating RANKL, but also elevated osteocalcin and adiponectin levels (Fig. 2L), compared with WT mice under HFD, and both proteins have already been reported to improve glucose metabolism and induce browning of WAT (8, 9, 15, 27).

Taken together, OPG<sup>-/-</sup> mice show browning of sWAT under ND, lower sWAT and vWAT weight correlated with decreased weight gain and improved glucose metabolism under HFD compared with WT group, but the high levels of osteocalcin and adiponectin may limit the interpretation of RANKL contribution in browning and metabolism in this OPG-deficient model.

*RANKL stimulation increases energy expenditure and induces beige adipocyte differentiation.* To test the hypothesis that RANKL induces WAT browning, we administered RANKL for 28 days in 8-wk-old male WT mice using a miniosmotic pump. Serum RANKL level increased in the treated group (WT+RL) (Fig. 3A), and histological analysis indicated evident sWAT browning and smaller lipid droplet area of multilocular adipocytes (Fig. 3B), higher *Ucp1* gene expression (Fig. 3C), increased oxygen consumption in both phosphorylating (OXPHOS) state, which indicates improved mitochondrial content, and nonphosphorylating (LEAK) state, which is associated with uncoupling proteins activity (Fig. 3D) (38). Moreover, mice treated with RANKL presented higher energy expenditure, as shown by higher levels of  $\dot{V}O_2$  consumption and  $\dot{V}CO_2$  production measured by indirect calorimetry (Fig. 3E). The RANKL treatment induced no changes in locomotor activity (Fig. 3F), food intake (Fig. 3G), body weight (Fig. 3H), serum osteocalcin, and adiponectin levels (Fig. 3I), nor in the number of TRAP-positive cells in tibia (Fig. 3J) compared with saline-infused group. Also, the effect

Fig. 3. Effects of receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand (RANKL) treatment in adipose tissue depots. A: serum RANKL levels in wild-type (WT), and RANKL-treated (WT+RL) mice. B: representative histological images of subcutaneous white adipose (sWAT) tissue from saline-treated wild-type (WT) mice and WT infused with RANKL (WT+RL) and quantification of lipid droplet area of sWAT from WT and WT+RL. C: quantitative PCR for *Ucp1* gene expression in sWAT from WT and WT+RL mice. D: quantification of oxidative phosphorylation (OXPHOS) and proton leakage (LEAK) in sWAT from WT and WT+RL groups. E: quantification of oxygen volume ( $\dot{V}O_2$ ) consumption and gas carbon dioxide ( $\dot{V}CO_2$ ) production by indirect calorimetry. Locomotor activity (F), food intake (G), and body weight (H) of WT and WT+RL groups. I: serum osteocalcin and adiponectin levels in WT and WT+RL mice. J: representative images of TRAP-stained tibia from WT and WT+RL mice and quantification of positive cells. K: representative images and quantification of lipid droplet areas of visceral white adipose tissue (vWAT). L: lipid droplet area (%)/nuclei number of interscapular brown adipose tissue (iBAT) from WT and WT+RL mice. Animal experiments performed with  $n = 4$  mice. Unpaired Student's *t* test was performed to compare difference between two groups. (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ). All data are presented as means  $\pm$  SD.



was restricted to the sWAT depot, as adipocyte morphology and lipid droplet size in vWAT and iBAT were unchanged (Fig. 3, *K* and *L*).

Altogether these data indicate that RANKL can directly induce browning of sWAT and increase energy expenditure in vivo.

**RANK-RANKL stimulation accelerates preadipocytes to differentiate into beige adipocytes.** To better understand the direct effect of RANKL in adipocytes, we differentiated the preadipocyte lineage 3T3-L1 into beige adipocytes with or without RANKL stimulation, and the morphological changes were time lapse recorded. The preadipocyte line 3T3-L1 has been reported for displaying phenotypic characteristics of multiple adipocyte lineages; for example, Morrison and McGee (37) described that 3T3-L1 cells under classical adipogenesis protocol develop into adipocytes with gene expression profile and basal energetics consistent with white adipocytes; however, 3T3-L1 increased uncoupled respiration with similar mechanisms of beige and brown adipocytes under acute stimulation with norepinephrine. Other studies also reported the differentiation of 3T3-L1 into beige adipocyte in the presence of T3 hormone in 7–10 days (2, 5, 23). We found that 3T3-L1 maintained undifferentiated in fibroblastoid form in the initial 4 days of beige adipocyte differentiation, and lipid droplets started to be detected at 16 h of the 5th day (Fig. 4A). In contrast, 3T3-L1 cells treated with RANKL showed a rounded shape, increased cell volume, and lipid droplet formation as early as 3 h (Fig. 4B), increased total lipid droplet content at the end of 5 days of differentiation (Fig. 4C), and elevated *Ucp1* expression (Fig. 4D), compared with the nontreated group on 1 day after differentiation. We confirmed that SVF cells under beige adipocyte differentiation also showed higher expression of *Ucp1* when stimulated with RANKL (Fig. 4E).

Interestingly, SVF-derived cells, even under differentiation into white adipocytes, turned into multilocular adipocytes with smaller lipid droplet area in the presence of RANKL stimulation, as detected by Oil Red O staining (Fig. 4F). Accordingly, we detected higher expression of beige adipocyte-related profile, such as *Cpt1*, *Pgc1 $\alpha$* , *Prdm16*, *Ucp1*, and *Tmem26*, in the RANKL-treated group at the 7th day of differentiation compared with control (Fig. 4G). However, 3T3-L1 cells differentiated into white adipocyte for 5 days showed lipid droplet accumulation and RANKL stimulation for a further 48 h could not induce beige adipocyte-related gene expression (Fig. 4H). This finding was confirmed in SVF cells of sWAT from WT mice differentiated for 5 days to white adipocytes (Fig. 4I).

Thus, our data indicate that RANKL directly induces beige adipocyte differentiation in preadipocytes, increases beige adi-

pocyte gene expression, and cannot stimulate browning in mature white adipocytes.

#### DISCUSSION

In the present study, we report, for the first time, that RANKL induces beige adipocyte differentiation of preadipocytes and browning of subcutaneous WAT in vivo. The different responses observed in sWAT and vWAT of our animal models of OPG $^{-/-}$  mice fed a normal or high-fat diet, and in WT mice infused with RANKL, might be explained by 1) the difference in serum RANKL level, and 2) the effect of RANKL in inducing beige differentiation of preadipocytes, but not mature white adipocytes. The serum-free RANKL level in OPG $^{-/-}$  mice was higher than in WT mice (33), and the increment was significant after RANKL infusion in WT mice, but still lower than the level found in OPG $^{-/-}$  mice.

Recent studies have shown bone to be an endocrine organ, with effects in metabolism. Lee et al. (22) and Ferron et al. (10) demonstrated that osteocalcin increases insulin release from  $\beta$  pancreatic cells and improves insulin response in target tissues. Osteocalcin is released from bone and becomes undercarboxylated in the acidity generated in the osteoclast pit during bone resorption. Osteoclasts are activated by RANKL, and the unopposed RANK-RANKL signaling found in OPG $^{-/-}$  mice leads to an early onset of osteoporosis. Indeed, OPG $^{-/-}$  mice show increased serum Glu-osteocalcin, but also very high levels of serum RANKL compared with WT mice (33). Although RANKL and OPG expression is not restricted to bone tissue, it is released from osteoblasts, and its levels strongly correlate with bone metabolism. It has been reported that OPG $^{-/-}$  mice show smaller vWAT depot, and lower glycemia under GTT and ITT compared with WT mice at a young age and fed a normal diet (20). However, the authors attribute the observed phenotype to circulating Glu-osteocalcin, and there is no information regarding RANKL's effect in adipose tissue and metabolism.

We observed intense browning of sWAT and vWAT in pups from OPG $^{-/-}$  mice with marked osteoporotic phenotype, but with smaller size than WT mice. The influence of animal size in WAT browning has already been reported in experiments with 5-wk-old mice as the higher ratio of body surface-body volume found in newborns and pups aggravates the cold stress under animal facility conditions (21). Therefore, we used age-paired WT and OPG $^{-/-}$  mice with similar weight and length in all the experiments, and found decreased body weight gain, and improved glucose metabolism in OPG $^{-/-}$  mice despite the same food intake compared with WT group under HFD. To support our findings, Ferron et al (10) and Lacombe

Fig. 4. Receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL) treatment accelerates preadipocytes to differentiate into beige adipocytes in vitro. *A* and *B*: representative images of control 3T3-L1 cells differentiated into beige adipocytes (*A*) and under RANKL treatment (*B*) recorded during 24 h on the fifth day of differentiation (*top*:  $\times 20$  magnification; *bottom*:  $\times 80$  magnification). *C*: quantification of cell lipid droplet area at 8 h of the time-lapse recording in 3T3CT and 3T3RL groups;  $n = 6$  mice. *D*: quantitative PCR for *Ucp1* gene expression in 3T3-L1 cells treated or not with RANKL on first day under beige adipocyte differentiation. *E*: in stromal vascular fraction (SVF) cells treated or not with RANKL until the seventh day. *F*: representative images of SVF cells differentiated into white adipocytes (*CT*) treated with RANKL (*RL*) for 9 days and stained with Oil Red O, and quantification of positive stained area (average of five fields for each plate,  $n = 5$  mice). *G*: quantitative PCR for beige adipocyte-related gene expression in WT mice-derived SVF cells treated or not with RANKL until 7th day of white adipocyte differentiation. *H*: quantitative PCR for beige adipocyte-related gene expression in 3T3-L1 cells in the fifth day of white adipocyte differentiation (*CT*) treated with RANKL (*RL*) for 48 h. *I*: quantitative PCR for beige adipocyte-related gene expression in WT mice-derived SVF cells in the 5th day of white adipocyte differentiation (*CT*) treated with RANKL (*RL*) for 48 h. Experiments were performed in triplicate. Unpaired Student's *t* test was performed to compare groups. (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ). All data are presented as means  $\pm$  SD.

et al. (20) reported similar results of the contribution of osteoclast activity in improving glucose metabolism using OPG<sup>-/-</sup> and WT mice.

The interpretation of OPG<sup>-/-</sup> phenotype is complex, as we could not exclude the contribution of elevated osteocalcin and adiponectin levels in this model of unopposed RANK-RANKL activation. Also, OPG<sup>-/-</sup> mice showed decreased weight gain under ND compared with WT mice, and we attributed to sWAT browning found in the mutant mice, but we could not eliminate effects of a different genetic background in this metabolic phenotype. As a limitation of this study, the OPG<sup>-/-</sup> mice were generated with C57BL/6J genetic background, but the OPG<sup>-/-</sup> and WT groups were not littermates generated from heterozygous pair mating.

Thus, to test our hypothesis that RANKL induces WAT browning, we infused WT mice with RANKL for 28 days, and found sWAT browning, and improved energy expenditure. RANKL infusion for this same period has been reported to increase bone turnover at a dose of 175  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$  (60), but we found neither changes in osteoclast activity nor in osteocalcin level when treating mice with RANKL in a dose equivalent to 1.8  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ . We hypothesized that RANKL was effective in inducing sWAT browning, since it encloses a different profile of preadipocyte reservoir compared with vWAT depot (13, 48). Subcutaneous WAT show higher lipid accumulation and adipogenesis than mesenteric or omental visceral WAT (51), and this regional variation may indicate that sWAT is a potential target for obesity treatment, as sWAT in vivo transplantation showed beneficial effects on body weight control and metabolism (55). Accordingly, our data show sWAT browning in OPG<sup>-/-</sup> mice, and sWAT-derived SVF cells display increased expression of *Pgc1 $\alpha$*  and *Prdm16* compared with those from WT mice. Moreover, the RANKL treatment-induced sWAT browning was sufficient to increase sWAT oxidative phosphorylation capacity and the whole animal oxygen consumption. Interestingly, RANKL infusion increased energy expenditure without changing body weight, which indicates possible changes in the body mass composition. Further studies are necessary to evaluate RANKL treatment in mice fed an HFD, as it still presents the hurdle of excluding secondary effects of a chronic treatment.

Subcutaneous WAT allocates a larger preadipocyte population prone to differentiation, which requires fewer growth factors than those from vWAT (30, 51, 53, 55). We provide evidence that RANKL potentiates beige adipocyte differentiation of both 3T3-L1 cells and SVF cells, but not in mature white adipocytes. Interestingly, SVF cells induced to white adipocyte differentiation in the presence of RANKL showed increased expression of beige adipocyte markers, multilocular lipid droplets, and less lipid content, which indicates RANKL could induce beige adipocyte differentiation without rosiglitazone and T3 hormone stimulation. We could not clearly detect the activation of classical signaling pathways related to WAT browning, such as p38 and CREB under RANKL incubation (data not shown); therefore, the molecular mechanism underpinning this process remains to be elucidated.

The serum OPG level correlates with obesity (3, 18), which is considered a biomarker for Type 2 diabetes and metabolic syndrome (36, 43, 50). OPG is secreted from white adipose tissue (6), and OPG mRNA expression has been reported to increase in WAT of HFD-fed mice (3). Indeed, HFD-fed mice

showed increased circulating OPG level that positively correlated with glucose area under the curve in GTT, and we detected OPG secretion from adipose tissue depots. However, supernatant from ex vivo culture of sWAT and vWAT of WT mice fed HFD showed no difference in secreted OPG amount compared with ND group. OPG is expressed by other cells, such as endothelial (32) and vascular smooth muscle cells (62) and endocrine pancreas (19, 47), which could contribute to circulating OPG level in an HFD context. RANKL is also secreted from various cells, including osteoblasts, osteocytes, and T lymphocytes, and its expression is increased in bone marrow stromal cell line ST2 induced to differentiate to adipocytes (49). We found that serum RANKL level increased in WT mice under an HFD, but the expression was undetectable in sWAT and vWAT depots. Thus, the cell source that accounts for serum RANKL and OPG increases on an HFD, and obesity remains to be clearly identified.

On the basis of our study described herein, we postulate that the rise in serum OPG level is deleterious because it blocks RANKL from stimulating beige adipocyte differentiation and impairs adipose tissue metabolism. Our findings also shed light on a new contribution of RANK-RANKL-OPG system in adipose tissue and provide insights into mechanisms of bone-endocrine role in metabolism.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank V. M. Alves and S. R. Andrade Nascimento for technical assistance in this work.

#### GRANTS

We are grateful to Sao Paulo Research Foundation (FAPESP), National Council for Scientific and Technological Development Research (CNPq), Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), and Foundation for Support to Teaching, Research and Assistance of HCFMRP-USP (FAEPA) for the financial support.

#### DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

F.S.M. and M.K.O. conceived and designed research; F.S.M., P.H.C.d.A., R.F.M., A.J.R.C., B.B.d.A., K.C.d.O.S.F., R.J.M.M., G.D.F., and L.C.A. performed experiments; F.S.M., P.H.C.d.A., R.F.M., A.J.R.C., M.S.d.Q., G.D.F., L.C.A., and M.K.O. analyzed data; F.S.M., L.C.A., and M.K.O. interpreted results of experiments; F.S.M. prepared figures; F.S.M. drafted manuscript; M.K.O. edited and revised manuscript; F.S.M., P.H.C.d.A., R.F.M., A.J.R.C., M.S.d.Q., B.B.d.A., K.C.d.O.S.F., R.J.M.M., L.C.A., and M.K.O. approved final version of manuscript.

#### REFERENCES

1. Akinci B, Celtik A, Yuksel F, Gene S, Yener S, Secil M, Ozcan MA, Yesil S. Increased osteoprotegerin levels in women with previous gestational diabetes developing metabolic syndrome. *Diabetes Res Clin Pract* 91: 26–31, 2011. doi:10.1016/j.diabres.2010.09.028.
2. Asano H, Kanamori Y, Higurashi S, Nara T, Kato K, Matsui T, Funaba M. Induction of beige-like adipocytes in 3T3-L1 cells. *J Vet Med Sci* 76: 57–64, 2014. doi:10.1292/jvms.13-0359.
3. Bernardi S, Fabris B, Thomas M, Toffoli B, Tikellis C, Candido R, Catena C, Mulatero P, Barbone F, Radillo O, Zauli G, Secchiero P. Osteoprotegerin increases in metabolic syndrome and promotes adipose tissue proinflammatory changes. *Mol Cell Endocrinol* 394: 13–20, 2014. doi:10.1016/j.mce.2014.06.004.
4. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 84: 277–359, 2004. doi:10.1152/physrev.00015.2003.

5. Cawthorn WP, Scheller EL, Learman BS, Parlee SD, Simon BR, Mori H, Ning X, Bree AJ, Schell B, Broome DT, Soliman SS, DelProposto JL, Lumeng CN, Mitra A, Pandit SV, Gallagher KA, Miller JD, Krishnan V, Hui SK, Bredella MA, Fazeli PK, Klibanski A, Horowitz MC, Rosen CJ, MacDougald OA. Bone marrow adipose tissue is an endocrine organ that contributes to increased circulating adiponectin during caloric restriction. *Cell Metab* 20: 368–375, 2014. doi:10.1016/j.cmet.2014.06.003.
6. Fain JN, Tague BM, Cheema P, Madan AK, Tichansky DS. Release of 12 adipokines by adipose tissue, nonfat cells, and fat cells from obese women. *Obesity (Silver Spring)* 18: 890–896, 2010. doi:10.1038/oby.2009.335.
7. Fata JE, Kong Y-Y, Li J, Sasaki T, Irie-Sasaki J, Moorehead RA, Elliott R, Scully S, Voura EB, Lacey DL, Boyle WJ, Khokha R, Penninger JM. The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. *Cell* 103: 41–50, 2000. doi:10.1016/S0092-8674(00)00103-3.
8. Ferron M, Hinoi E, Karsenty G, Ducy P. Osteocalcin differentially regulates  $\beta$  cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 5266–5270, 2008. doi:10.1073/pnas.0711191105.
9. Ferron M, McKee MD, Levine RL, Ducy P, Karsenty G. Intermittent injections of osteocalcin improve glucose metabolism and prevent type 2 diabetes in mice. *Bone* 50: 568–575, 2012. doi:10.1016/j.bone.2011.04.017.
10. Ferron M, Wei J, Yoshizawa T, Del Fattore A, DePinho RA, Teti A, Ducy P, Karsenty G. Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling and energy metabolism. *Cell* 142: 296–308, 2010. doi:10.1016/j.cell.2010.06.003.
11. Galarraga M, Campión J, Muñoz-Barrutia A, Boqué N, Moreno H, Martínez JA, Milagro F, Ortiz-de-Solórzano C. Adiposoft: automated software for the analysis of white adipose tissue cellularity in histological sections. *J Lipid Res* 53: 2791–2796, 2012. doi:10.1194/jlr.D023788.
12. Golledge J, Leicht AS, Crowther RG, Glanville S, Clancy P, Sangla KS, Spinks WL, Quigley F. Determinants of endothelial function in a cohort of patients with peripheral artery disease. *Cardiology* 111: 51–56, 2008. doi:10.1159/000113428.
13. Grégoire F, Todoroff G, Hauser N, Remacle C. The stroma-vascular fraction of rat inguinal and epididymal adipose tissue and the adipoconversion of fat cell precursors in primary culture. *Biol Cell* 69: 215–222, 1990. doi:10.1016/0248-4900(90)90348-7.
14. Hirosumi J, Tunceman G, Chang L, Görgün CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 420: 333–336, 2002. doi:10.1038/nature01137.
15. Hui X, Gu P, Zhang J, Nie T, Pan Y, Wu D, Feng T, Zhong C, Wang Y, Lam KSL, Xu A. Adiponectin enhances cold-induced browning of subcutaneous adipose tissue via promoting M2 macrophage proliferation. *Cell Metab* 22: 279–290, 2015. doi:10.1016/j.cmet.2015.06.004.
16. Ishihashi J, Seale P. Medicine. Beige can be slimming. *Science* 328: 1113–1114, 2010. doi:10.1126/science.1190816.
17. Kajimura S, Spiegelman BM, Seale P. Brown and beige fat: physiological roles beyond heat generation. *Cell Metab* 22: 546–559, 2015. doi:10.1016/j.cmet.2015.09.007.
18. Kotanidou EP, Kotanidis CP, Giza S, Serbis A, Tsinopoulou VR, Karalazou P, Tzimogiorgis G, Galli-Tsinopoulou A. Osteoprotegerin increases parallel to insulin resistance in obese adolescents. *Endocr Res* 44: 9–15, 2019. doi:10.1080/07435800.2018.1480630.
19. Kuroda Y, Maruyama K, Fujii H, Sugawara I, Ko SBH, Yasuda H, Matsui H, Matsuo K. Osteoprotegerin regulates pancreatic  $\beta$ -cell homeostasis upon microbial invasion. *PLoS One* 11: e0146544, 2016. doi:10.1371/journal.pone.0146544.
20. Lacombe J, Karsenty G, Ferron M. In vivo analysis of the contribution of bone resorption to the control of glucose metabolism in mice. *Mol Metab* 2: 498–504, 2013. doi:10.1016/j.molmet.2013.08.004.
21. Lee MW, Odegaard JI, Mukundan L, Qiu Y, Molofsky AB, Nussbaum JC, Yun K, Locksley RM, Chawla A. Activated type 2 innate lymphoid cells regulate beige fat biogenesis. *Cell* 160: 74–87, 2015. doi:10.1016/j.cell.2014.12.011.
22. Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C, Dacquin R, Mee PJ, McKee MD, Jung DY, Zhang Z, Kim JK, Mauvais-Jarvis F, Ducy P, Karsenty G. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* 130: 456–469, 2007. doi:10.1016/j.cell.2007.05.047.
23. Lemecha M, Morino K, Imamura T, Iwasaki H, Ohashi N, Ida S, Sato D, Sekine O, Ugi S, Maegawa H. MiR-494-3p regulates mitochondrial biogenesis and thermogenesis through PGC1- $\alpha$  signalling in beige adipocytes. *Sci Rep* 8: 15096, 2018. doi:10.1038/s41598-018-33438-3.
24. Li J, Sarosi I, Yan XQ, Morony S, Capparelli C, Tan HL, McCabe S, Elliott R, Scully S, Van G, Kaufman S, Juan SC, Sun Y, Tarpley J, Martín L, Christensen K, McCabe J, Kostenuik P, Hsu H, Fletcher F, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ. RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 1566–1571, 2000. doi:10.1073/pnas.97.4.1566.
25. Lidell ME, Betz MJ, Dahlqvist Leinhard O, Heglind M, Elander L, Slawik M, Mussack T, Nilsson D, Romu T, Nuutila P, Virtanen KA, Beuschlein F, Persson A, Borga M, Enerbäck S. Evidence for two types of brown adipose tissue in humans. *Nat Med* 19: 631–634, 2013. doi:10.1038/nm.3017.
26. Aune UL, Ruiz L, Kajimura S. Isolation and differentiation of stromal vascular cells to beige/brite cells. *J Vis Exp* 73: 2013. doi:10.3791/50191.
27. Liu L, Zhang T, Hu J, Ma R, He B, Wang M, Wang Y. Adiponectin/SIRT1 axis induces white adipose browning after vertical sleeve gastrectomy of obese rats with Type 2 diabetes. *Obes Surg* 30: 1392–1403, 2020. doi:10.1007/s11695-019-04295-4.
28. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods* 25: 402–408, 2001. doi:10.1006/meth.2001.1262.
29. Ma YL, Cain RL, Halladay DL, Yang X, Zeng Q, Miles RR, Chandrasekhar S, Martin TJ, Onyia JE. Catabolic effects of continuous human PTH (1–38) in vivo is associated with sustained stimulation of RANKL and inhibition of osteoprotegerin and gene-associated bone formation. *Endocrinology* 142: 4047–4054, 2001. doi:10.1210/endo.142.9.8356.
30. Macotela Y, Emanuelli B, Mori MA, Gesta S, Schulz TJ, Tseng Y-H, Kahn CR. Intrinsic differences in adipocyte precursor cells from different white fat depots. *Diabetes* 61: 1691–1699, 2012. doi:10.2337/db11-1753.
31. Madsen L, Petersen RK, Sørensen MB, Jørgensen C, Hallenborg P, Pridal L, Fleckner J, Amri EZ, Krieg P, Furstemberger G, Berge RK, Kristiansen K. Adipocyte differentiation of 3T3-L1 preadipocytes is dependent on lipoxygenase activity during the initial stages of the differentiation process. *Biochem J* 375: 539–549, 2003. doi:10.1042/bj20030503.
32. Malyankar UM, Scatena M, Suchland KL, Yun TJ, Clark EA, Giachelli CM. Osteoprotegerin is an  $\alpha$ , $\beta$ -induced, NF- $\kappa$ B-dependent survival factor for endothelial cells. *J Biol Chem* 275: 20959–20962, 2000. doi:10.1074/jbc.C000290200.
33. Maruyama K, Takada Y, Ray N, Kishimoto Y, Penninger JM, Yasuda H, Matsuo K. Receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand and osteoprotegerin regulate proinflammatory cytokine production in mice. *J Immunol* 177: 3799–3805, 2006. doi:10.4049/jimmunol.177.6.3799.
34. Mason MG, Holladay RS, Nicholls P, Shepherd M, Cooper CE. A quantitative approach to nitric oxide inhibition of terminal oxidases of the respiratory chain. *Methods Enzymol* 437: 135–159, 2008. doi:10.1016/S0076-6879(07)37008-0.
35. Miller CN, Yang J-Y, England E, Yin A, Baile CA, Rayalam S. Isoproterenol increases uncoupling, glycolysis, and markers of beigeing in mature 3T3-L1 adipocytes. *PLoS One* 10: e0138344, 2015. doi:10.1371/journal.pone.0138344.
36. Monseu M, Dubois S, Boursier J, Aubé C, Gagnadoux F, Lefthériotis G, Duchateau P-H. Osteoprotegerin levels are associated with liver fat and liver markers in dysmetabolic adults. *Diabetes Metab* 42: 364–367, 2016. doi:10.1016/j.diabet.2016.02.004.
37. Morrison S, McGee SL. 3T3-L1 adipocytes display phenotypic characteristics of multiple adipocyte lineages. *Adipocyte* 4: 295–302, 2015. doi:10.1080/21623945.2015.1040612.
38. Nicholls DG, Locke RM. Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol Rev* 64: 1–64, 1984. doi:10.1152/physrev.1984.64.1.1.
39. Osako MK, Nakagami H, Koibuchi N, Shimizu H, Nakagami F, Koriyama H, Shimamura M, Miyake T, Rakugi H, Morishita R. Estrogen inhibits vascular calcification via vascular RANKL system: common mechanism of osteoporosis and vascular calcification. *Circ Res* 107: 466–475, 2010. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.216846.
40. Osako MK, Nakagami H, Shimamura M, Koriyama H, Nakagami F, Shimizu H, Miyake T, Yoshizumi M, Rakugi H, Morishita R. Crosstalk of receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand signaling with renin-angiotensin system in vascular calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33: 1287–1296, 2013. doi:10.1161/ATVBAHA.112.301099.

41. Page G, Miossec P. RANK and RANKL expression as markers of dendritic cell-T cell interactions in paired samples of rheumatoid synovium and lymph nodes. *Arthritis Rheum* 52: 2307–2312, 2005. doi:10.1002/art.21211.
42. Pang Z, Nakagami H, Osako MK, Koriyama H, Nakagami F, Tomioka H, Shimamura M, Kurinami H, Takami Y, Morishita R, Rakugi H. Therapeutic vaccine against DPP4 improves glucose metabolism in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 111: E1256–E1263, 2014. doi:10.1073/pnas.1322009111.
43. Pérez de Ciriza C, Moreno M, Restituto P, Bastarrika G, Simón I, Colina I, Varo N. Circulating osteoprotegerin is increased in the metabolic syndrome and associates with subclinical atherosclerosis and coronary arterial calcification. *Clin Biochem* 47: 272–278, 2014. doi:10.1016/j.clinbiochem.2014.09.004.
44. Pesta D, Gnaiger E. High-resolution respirometry: OXPHOS protocols for human cells and permeabilized fibers from small biopsies of human muscle. *Methods Mol Biol* 810: 25–58, 2012. doi:10.1007/978-1-61779-382-0\_3.
45. Roberts NA, White AJ, Jenkinson WE, Turchinovich G, Nakamura K, Withers DR, McConnell FM, Desanti GE, Benezech C, Parnell SM, Cunningham AF, Paolino M, Penninger JM, Simon AK, Nitta T, Ohigashi I, Takahama Y, Caamano JH, Hayday AC, Lane PJJ, Jenkinson EJ, Anderson G. Rank signaling links the development of invariant  $\gamma\delta$  T cell progenitors and Aire<sup>+</sup> medullary epithelium. *Immunity* 36: 427–437, 2012. doi:10.1016/j.immuni.2012.01.016.
46. Rosen ED, Spiegelman BM. What we talk about when we talk about fat. *Cell* 156: 20–44, 2014. doi:10.1016/j.cell.2013.12.012.
47. Schrader J, Rennekamp W, Niebergall U, Schoppert M, Jahr H, Brendel MD, Hörsch D, Hofbauer LC. Cytokine-induced osteoprotegerin expression protects pancreatic beta cells through p38 mitogen-activated protein kinase signalling against cell death. *Diabetologia* 50: 1243–1247, 2007. doi:10.1007/s00125-007-0672-6.
48. Sztalryd C, Faust IM. Depot-specific features of adipocyte progenitors revealed by primary cultures plated at low density. *Int J Obes* 14, Suppl 3: 165–175, 1990.
49. Takeshita S, Fumoto T, Naoe Y, Ikeda K. Age-related marrow adipogenesis is linked to increased expression of RANKL. *J Biol Chem* 289: 16699–16710, 2014. doi:10.1074/jbc.M114.547919.
50. Tavintharan S, Pek LTS, Liu JJ, Ng XW, Yeoh LY, Su Chi L, Chee Fang S. Osteoprotegerin is independently associated with metabolic syndrome and microvascular complications in type 2 diabetes mellitus. *Diab Vasc Dis Res* 11: 359–362, 2014. doi:10.1177/1479164114539712.
51. Tchkonja T, Giorgadze N, Pirtskhalava T, Tchoukalova Y, Karagiannides I, Forse RA, DePonte M, Stevenson M, Guo W, Han J, Waloga G, Lash TL, Jensen MD, Kirkland JL. Fat depot origin affects adipogenesis in primary cultured and cloned human preadipocytes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282: R1286–R1296, 2002. doi:10.1152/ajpregu.00653.2001.
52. Tchkonja T, Giorgadze N, Pirtskhalava T, Thomou T, DePonte M, Koo A, Forse RA, Chinnappan D, Martin-Ruiz C, von Zglinicki T, Kirkland JL. Fat depot-specific characteristics are retained in strains derived from single human preadipocytes. *Diabetes* 55: 2571–2578, 2006. doi:10.2337/db06-0540.
53. Tchkonja T, Thomou T, Zhu Y, Karagiannides I, Pothoulakis C, Jensen MD, Kirkland JL. Mechanisms and metabolic implications of regional differences among fat depots. *Cell Metab* 17: 644–656, 2013. doi:10.1016/j.cmet.2013.03.008.
54. Thalmann S, Juge-Aubry CE, Meier CA. Explant cultures of white adipose tissue. *Methods Mol Biol* 456: 195–199, 2008. doi:10.1007/978-1-59745-245-8\_14.
55. Tran TT, Yamamoto Y, Gesta S, Kahn CR. Beneficial effects of subcutaneous fat transplantation on metabolism. *Cell Metab* 7: 410–420, 2008. doi:10.1016/j.cmet.2008.04.004.
56. Van Harmelen V, Röhrig K, Hauner H. Comparison of proliferation and differentiation capacity of human adipocyte precursor cells from the omental and subcutaneous adipose tissue depot of obese subjects. *Metabolism* 53: 632–637, 2004. doi:10.1016/j.metabol.2003.11.012.
57. Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 115: 1111–1119, 2005. doi:10.1172/JCI25102.
58. World Health Organization. *Obesity and Overweight: Fact sheet*. Basel, Switzerland: WHO Media Cent. 2016. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.
59. Yaturu S, Rains J, Jain SK. Relationship of elevated osteoprotegerin with insulin resistance, CRP, and TNF- $\alpha$  levels in men with type 2 diabetes. *Cytokine* 44: 168–171, 2008. doi:10.1016/j.cyto.2008.07.471.
60. Yuan YY, Kostenuik PJ, Ominsky MS, Morony S, Adamu S, Simionescu DT, Basalyga DM, Asuncion FJ, Bateman TA. Skeletal deterioration induced by RANKL infusion: a model for high-turnover bone disease. *Osteoporos Int* 19: 625–635, 2008. doi:10.1007/s00198-007-0509-7.
61. Zebisch K, Voigt V, Wabitsch M, Brandisch M. Protocol for effective differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes. *Anal Biochem* 425: 88–90, 2012. doi:10.1016/j.ab.2012.03.005.
62. Zhang J, Fu M, Myles D, Zhu X, Du J, Cao X, Chen YE. PDGF induces osteoprotegerin expression in vascular smooth muscle cells by multiple signal pathways. *FEBS Lett* 521: 180–184, 2002. doi:10.1016/S0014-5793(02)02872-7.

## ANEXO C – Artigos em colaboração submetidos para publicação

### Projeto em colaboração 1

Título do artigo: *RANKL impairs the TLR4 pathway by increasing TRAF6 and RANK interaction in macrophages.*

The screenshot shows the article details page on the Hindawi platform. At the top left is the Hindawi logo. The user name 'Mariana' is visible in the top right. The navigation bar includes a back arrow, 'DASHBOARD / ARTICLE DETAILS', and a document icon. The article is updated on 2021-09-22 and is version 1. A 'SUBMIT REVISION' button is present next to the article title. The article title is 'RANKL impairs the TLR4 pathway by increasing TRAF6 and RANK interaction in macrophages' with ID 7740079. The authors listed are Ryerson Mota, Paulo Cavalcanti de Araújo, Flavia Matsuo, Rodrigo Metzner, Carlos de Biagi Junior, Kamila Peronni, Hiroki Hayashi, Munehisa Shimamura, Hironori Nakagami, and Mariana Osako. Their affiliations are listed with superscript numbers 1, 2, 3, and 4. The article type is 'Research Article' and the section is 'Immunology'. The journal is 'BioMed Research International'. The section editor is Harry W. Schroeder, and the academic editor is Luca Liberale. The article was submitted on 2021-09-22 (5 months ago). The recommendation is 'Major Revision Requested' from Luca Liberale AE on 02.11.2021. The message for the author states: 'The authors are asked to revised their manuscript in light of the reviewers' comments'.

Hindawi Mariana

← BACK DASHBOARD / ARTICLE DETAILS Updated on 2021-09-22 Version 1

**RANKL impairs the TLR4 pathway by increasing TRAF6 and RANK interaction in macrophages** ID 7740079

[SUBMIT REVISION](#)

Ryerson Mota<sup>1</sup>, Paulo Cavalcanti de Araújo<sup>1</sup>, Flavia Matsuo<sup>1</sup>, Rodrigo Metzner<sup>1</sup>, Carlos de Biagi Junior<sup>2</sup>, Kamila Peronni<sup>2</sup>, Hiroki Hayashi<sup>3</sup>, Munehisa Shimamura<sup>3</sup>, Hironori Nakagami<sup>3</sup>, Mariana Osako SA CA<sup>4</sup> – [Hide Affiliations](#)

Department of Cell and Molecular Biology, Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo<sup>1</sup>  
 Institute for Cancer Research, Guarapuava, Parana, Brazil<sup>2</sup>  
 Department of Health Development and Medicine, Osaka University Graduate School of Medicine, Suita, Osaka<sup>3</sup>  
 University of Sao Paulo, Medical School of Ribeirao Preto<sup>4</sup>

**Article Type** Section  
 Research Article Immunology

**Journal**  
 BioMed Research International

**Section Editor** Harry W. Schroeder **Academic Editor** Luca Liberale **Submitted on** 2021-09-22 (5 months ago)

> Abstract  
 > Author Declaration  
 > Files 2

– **Editorial Comments**

**Recommendation** Luca Liberale AE 02.11.2021  
 Major Revision Requested

**Message for Author**  
 The authors are asked to revised their manuscript in light of the reviewers' comments

## Projeto em colaboração 2

Título do artigo: *SARS-CoV-2 infects adipocytes in a fat depot- and viral lineage-dependent manner*



Mariana Kiomy Osako <mko@fmrp.usp.br>

### You have been listed as a co-author on a new submission to Cell Metabolism

1 mensagem

Cell Metabolism <cm@editorialmanager.com>  
Responder a: Cell Metabolism <metabolism@cell.com>  
Para: Mariana Osako <mko@fmrp.usp.br>

17 de janeiro de 2022 20:18

Dear Dr. Osako,

This is an automated notice to confirm that you have been listed as an author on a manuscript that has been submitted to Cell Metabolism. Information on this manuscript is included below.

You have the option to both verify your authorship and to provide your ORCID ID, which you may do via following the link: [Yes, I am affiliated](#). If the manuscript is ultimately accepted for publication, your ORCID ID would be included alongside the published author information. Please note that ORCID IDs may only be submitted and verified through Editorial Manager (EM) at initial submission. We are not able to manually add and verify ORCID IDs at later stages.

Please note that verifying authorship and/or adding your ORCID ID to the submission will not create an EM profile for you or change any information if you already have an EM profile, nor will it provide you with access to the submitted manuscript or its status. All status updates will be shared with the submitting author (Dr. Marcelo A. Mori), and we ask that the submitting author share relevant status updates back with the author group as necessary. If you would like, you may register for an EM profile for Cell Metabolism at <https://www.editorialmanager.com/cell-metabolism/>. We encourage you to do so since it can help expand and diversify the set of reviewers we consult and facilitate with future submissions.

If you were not aware that you were listed as an author on this paper, or if you have concerns about this submission or its status, you can contact the paper's corresponding author (Dr. Marcelo A. Mori) via email at [morima@unicamp.br](mailto:morima@unicamp.br).

Thank you,  
Cell Metabolism

#### SARS-CoV-2 infects adipocytes in a fat depot- and viral lineage-dependent manner

Tatiana Saccon; Felipe Mousovich-Neto; Raissa Ludwig; Victor Corasolla; Ana Dos Anjos; Amanda Passos; Matheus Martini; Priscilla Barbosa; Gabriela Souza; **Stefanie Muraro**; Julia Forato; Marlene Amorim; Rafael Marques; Flavio Veras; Ester Barreto; Tiago Gonçalves; Narayana Fazolini; Carolina Onodera; Ronaldo Bragança; **Paulo Araújo**; Sabrina Batah; Rosa Viana; Danilo Melo; Alexandre Fabro; Eurico Arruda; Fernando Cunha; Marco Pretti; Bradley Smith; Henrique Souza; Thiago Knittel; **Gabriel Ruiz**; Gerson Souza; Mariana Boroni; Marco Vinolo; Alessandro Farias; Pedro Vieira; Joyce Bizzacchi; Tamber Teesalu; Felipe Chaim; Everton Cazzo; Elinton Chaim; José Proença-Módena; Daniel Martins-de-Souza; Mariana Osako; Luiz Leiria; Marcelo A. Mori

Visceral adiposity is a risk factor for severe COVID-19 and a link between adipose tissue infection and disease progression has been proposed. Here we demonstrate that SARS-CoV-2 undergoes productive infection in adipocytes, although the permissiveness to infection and cellular response depend on the anatomical origin of the adipocyte and the viral lineage. Adipocytes derived from human visceral adipose tissue express more ACE2 and are more permissive to SARS-CoV-2 infection than their subcutaneous counterpart. Infection of subcutaneous adipocytes leads to inhibition of lipolysis, while infection of visceral adipocytes results in higher expression of pro-inflammatory cytokines. Viral load and cellular response are attenuated when adipocytes are infected with the SARS-CoV-2 gamma variant. A similar degree of cell death occurs 4-days

<https://mail.google.com/mail/u/1/?ik=e551e0f548&view=pt&search=all&permthid=thread-F%3A1722245731111093177&siml=msg-f%3A1722245731111093177>

1/2

18/02/2022 16:39

E-mail de Universidade de São Paulo - You have been listed as a co-author on a new submission to Cell Metabolism

after SARS-CoV-2 infection, regardless of the adipocyte origin or viral lineage. Hence, SARS-CoV-2 infects adipocytes, where it replicates and alters cell function and viability in a fat depot- and viral lineage-dependent fashion.

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. ([Remove my information/details](#)). Please contact the publication office if you have any questions.