

ÉRIQUE DE CASTRO

mTORC2 em adipócitos é essencial para o aumento da capacidade termogênica induzida pelo frio e melhora da sensibilidade à insulina induzida pelo frio e ingestão de dieta rica em ácidos graxos ômega 3

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

São Paulo
2021

ÉRIQUE DE CASTRO

mTORC2 em adipócitos é essencial para o aumento da capacidade termogênica induzida pelo frio e melhora da sensibilidade à insulina induzida pelo frio e ingestão de dieta rica em ácidos graxos ômega 3

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

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: William Tadeu Lara Festuccia

Versão Corrigida

São Paulo
2021

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

de Castro, Érique
mTORC2 em adipócitos é essencial para o aumento
da capacidade termogênica induzida pelo frio e
melhora da sensibilidade à insulina induzida pelo
frio e ingestão de dieta rica em ácidos graxos ômega
3 / Érique de Castro; orientador William Tadeu
Lara Festuccia. -- São Paulo, 2021.
145 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. mTORC2. 2. tecido adiposo. 3. termogênese .
4. ômega 3. 5. resistência à insulina. I. Tadeu Lara
Festuccia, William , orientador. II. Título.



ATA DE DEFESA

Aluno: 42137 - 9483002 - 1 / Página 1 de 1

Ata de defesa de Tese do(a) Senhor(a) Érique de Castro no Programa: Ciências (Fisiologia Humana), do(a) Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Aos 16 dias do mês de julho de 2021, no(a) Via remota realizou-se a Defesa da Tese do(a) Senhor(a) Érique de Castro, apresentada para a obtenção do título de Doutor intitulada:

"mTORC2 em adipócitos é essencial para o aumento da capacidade termogênica induzida pelo frio e melhora da sensibilidade à insulina induzida pelo frio e ingestão de dieta rica em ácidos graxos ômega 3"

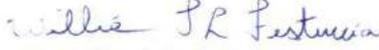
Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passa a palavra ao candidato para exposição e a seguir aos examinadores para as devidas arguições que se desenvolvem nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclama o resultado:

Nome dos Participantes da Banca	Função	Sigla da CPG	Resultado
William Tadeu Lara Festuccia	Presidente	ICB - USP	Não Votante
Alice Cristina Rodrigues	Titular	ICB - USP	<u>APROVADO</u>
Vanessa de Souza Mello	Titular	UERJ - Externo	<u>APROVADO</u>
Luiz Osório Silveira Leiria	Titular	FMRP - USP	<u>APROVADO</u>

Resultado Final: APROVADO

Parecer da Comissão Julgadora *

Eu, Lucianna Vicente da Silva , lavrei a presente ata, que assino juntamente com os(as) Senhores(as). São Paulo, aos 16 dias do mês de julho de 2021.


para Alice Cristina Rodrigues

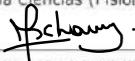

para Vanessa de Souza Mello


para Luiz Osório Silveira Leiria


William Tadeu Lara Festuccia
Presidente da Comissão Julgadora

* Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.

A defesa foi homologada pela Comissão de Pós-Graduação em 10/08/2021 e, portanto, o(a) aluno(a) faz jus ao título de Doutor em Ciências obtido no Programa Ciências (Fisiologia Humana) - Área de concentração: Fisiologia Humana.


Presidente da Comissão de Pós-Graduação

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*Caracterização do envolvimento do sensor de nutrientes mTOR no desenvolvimento de doenças metabólicas crônicas associadas a obesidade*", registrado sob o protocolo nº **115/2016**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, 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 e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **24/09/2016** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) William Tadeu Lara Festuccia**

- Departamento: *Fisiologia e Biofísica*

- Membros da Equipe: *Thiago Belchior (Pós-doutorando), Fernanda Janku Cabral (Pós-doutorando), Alex Shimura Yamashita (Pós-doutorando), Juliana Magdalon (Pós-graduando), Maynara Lucca Andrade (Pós-graduando), Rafael Junges Moreira (Pós-graduando), Tiago Eugênio de Oliveira da Silva (Pós-graduando), Érique de Castro (Pós-graduando), Milene Ortiz Silva (Pós-graduando), Thayna dos Santos Vieira (Treinamento técnico), Carlos Mario Donado Pestana (Pós-doutorando)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico www.icb.usp.br/ceua. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "*Involvement of the nutrient sensor mTOR in the development of obesity associated chronic metabolic diseases*", protocol nº **115/2016**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **9/24/2016** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.) William Tadeu Lara Festuccia**

- Team members: *Thiago Belchior (Postdoctoral Researcher), Fernanda Janku Cabral (Postdoctoral Researcher), Alex Shimura Yamashita (Postdoctoral Researcher), Juliana Magdalon (Graduate Student), Maynara Lucca Andrade (Graduate Student), Rafael Junges Moreira (Graduate Student), Tiago Eugênio de Oliveira da Silva (Graduate Student), Érique de Castro (Graduate Student), Milene Ortiz Silva (Graduate Student), Thayna dos Santos Vieira (Technical Trainee), Carlos Mario Donado Pestana (Postdoctoral Researcher)*

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/ Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
Mus musculus	C57BL/6J	Macho/Male	8 semanas/weeks	230
	Tsc1 floxed adiponectina Cre +/-	Macho/Male	8 semanas/weeks	140
	Raptor floxed adiponectina Cre +/-	Macho/Male	8 semanas/weeks	80
	Pten floxed albumina Cre +/-	Macho/Male	8 semanas/weeks	80
	PTEN/Rictor duplo floxed albumina Cre +/- e PTEN/Raptor duplo floxed albumina Cre +/-	Macho/Male	8 semanas/weeks	90
	UCP1 KO - B6.129-UCP1 TM1KZ/J	Macho/Male	8 semanas/weeks	160
	Rictor floxed adiponectina Cre +/-	Macho/Male	8 semanas/weeks	40



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
CEUA-ICB/USP - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail cep@icb.usp.br

<i>Ulk1 floxed adiponectina Cre +/-</i>	<i>Macho/Male</i>	<i>8 semanas/weeks</i>	<i>40</i>
<i>Insulina receptor floxed adiponectina Cre +/-</i>	<i>Macho/Male</i>	<i>8 semanas/weeks</i>	<i>40</i>
<i>Pten floxed adiponectina Cre +/-</i>	<i>Macho/Male</i>	<i>8 semanas/weeks</i>	<i>40</i>
<i>Tsc1 floxed albumina Cre +/-</i>	<i>Macho/Male</i>	<i>8 semanas/weeks</i>	<i>30</i>
<i>Raptor floxed albumina Cre +/-</i>	<i>Macho/Male</i>	<i>8 semanas/weeks</i>	<i>30</i>
<i>PPARgamma floxed albumina Cre +/-</i>	<i>Macho/Male</i>	<i>8 semanas/weeks</i>	<i>45</i>
<i>NLRP3 KO</i>	<i>Macho/Male</i>	<i>8 semanas/weeks</i>	<i>40</i>

São Paulo, 26 de setembro de 2016.

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**
Coordenador CEUA-ICB/USP

Eliane Aparecida Gomes de M. Nascimento
Secretária CEUA-ICB/USP

À minha família e amigos

AGRADECIMENTOS

O doutorado foi uma longa jornada. Foram seis anos em que a constante foi a descoberta. Uma nova cidade, uma nova universidade, um novo cotidiano com pessoas de todo o canto do país, um desafio a todo momento. São tantas histórias, tantas pessoas, tantos agradecimentos. Não tentarei ser sucinto. Descrever sentimentos em palavras não é uma das tarefas mais fáceis.

Agradeço ao professor William, por diversos motivos. Quando procurei por um orientador eu buscava um pesquisador jovem, ativo e que trabalhasse com metabolismo. E encontrei. Encontrei muito mais. O professor William é um exemplo do que deve ser um pesquisador, tanto pela visão extremamente crítica sobre a ciência, quanto pela forma de lidar com as mais diversas situações da vida. Agradeço por cada direcionamento, ideia e questionamento que me fazem dia após dia um pesquisador melhor. Não foram poucas as vezes que cheguei na sua sala com problemas na câmara climática, biotério, protocolos, prazos e afins, mas talvez, mesmo sem perceber, os maiores ensinamentos que você me deu foram a paciência, calma e razão em resolver os problemas. Quando fui aprovado no programa de fisiologia recebi um e-mail do professor William com a seguinte mensagem: “Parabéns Érique! Ficamos todos felizes com seu sucesso!”. Hoje, ao recordar esse e-mail, dou atenção à palavra “todos”. O William, talvez também sem perceber, criou um ambiente saudável, um grupo forte e colaborativo, em que o que importa é o grupo. Antes da mudança de laboratório, uma das melhores lembranças que carrego é a sua parada quase que obrigatória na hora de ir embora de conversar com todo mundo por alguns minutos sobre qualquer assunto. Isso sem dúvidas fortaleceu o grupo. Presenciei três gerações de alunos, e o ambiente sempre manteve o mesmo estado de espírito e de longe isso é o que mais admiro. Que esse espírito se mantenha por muitos outros anos.

Agradeço aos meus pais que sempre estimularam e apoiaram a minha formação. Quando criança eu ganhava revistas da SuperInteressante, ainda guardadas e preservadas, que sem dúvidas despertaram o meu amor pela ciência. Foram muitos anos de suporte emocional e financeiro. A busca por um sonho e por

uma formação tiveram impactos, perdi momentos importantes da nossa família, estou perdendo o gradual envelhecimento dos meus pais, mas vocês estão sempre em meus pensamentos. Tenho a certeza de que ficaremos cada vez mais próximos. Obrigado minha amada mãe Nirlei Claudete Colognesi e meu pai Adilson Aparecido de Castro. Eu os amo. Agradeço ao meu irmão Lucas de Castro, só porque eu tenho que agradecer, brincadeira. Também te amo. Obrigado por preencher na vida dos nossos pais a falta física que eu faço.

Agradeço aos funcionários do Instituto de Ciências Biomédicas da USP pelo trabalho essencial. Em especial, meu agradecimento ao bioterista José Roberto Mendonça (Bob).

Agradeço a cada laboratório que me ajudou disponibilizando equipamentos e reagentes. Em especial, muito obrigado à técnica Rosângela Eichler por todo suporte e pela ótima forma que sempre me recebe.

Agradeço ao professor Alexandre Steiner e ao Eduardo Moretti pela ajuda nos experimentos de calorimetria indireta.

Agradeço ao professor Thiago Moreira e ao Cleyton Sobrinho pela ajuda nos experimentos de tremor muscular.

Agradeço à professora Patricia Reckziegel pela ajuda com a cultura primária de adipócitos.

Dentre os poemas de Maria Bethânia, sustento em minha memória o seguinte:

“Agradecer os amigos que fiz

E que mantém a coragem de gostar de mim, apesar de mim”.

A lista de amigos é imensa, não pelo número dos que fazem parte do dia a dia, mas pela presença na breve memória. Agradeço os amigos que me fizeram ser quem eu sou, os que me apoiaram, os de forte abraço, os de longa distância, os de proximidade presença e os da lembrança que acalanta o coração. Dentre esses, deixo meu agradecimento aos amigos do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de São Carlos: Phelipe Eduardo (Ph), Carina Falasco, Beatriz Robbi, Eduardo Habermann, Adriana Fernandes, Gabriela Pegler, Talita Alvarenga, Victor Martyn. Nos encontramos todos os anos e sempre é como se nunca tivéssemos nos distanciados

– fisicamente. Também agradeço em especial àquele que a cidade de São Carlos me apresentou, Tiago Medeiros, que por sua vez, me apresentou o mundo mágico de RuPaul's. **São Carlos é a saudades do dia a dia.**

Agradeço aos membros do Laboratório de Fisiologia Molecular e Metabolismo. São muitos e todos importantes. Aos que me receberam tão bem: Maynara Andrade pelos diversos bolos, pelos filmes no 132 que você dormia na metade, pelos inúmeros GTTs e eutanásias, pelos vinhos e pela sempre busca de tornar todo e qualquer ambiente o mais feliz e amigável possível, fico feliz por hoje você realmente ser Mãenara; Thiago Belchior pela capacidade de síntese, de tornar a aprendizagem de todo experimento mais fácil e de também prezar por um ambiente feliz e amigável. Belchior, embora você tenha seguido rumos além dos muros da academia, você sem dúvidas foi um grande exemplo de pessoa e de pesquisador que tento seguir; Juliana Magdalon é um exemplo de alegria, amizade, organização e pesquisadora. Ju, até hoje, quando tenho dúvida de algum experimento, eu procuro a solução no seu caderno. Também agradeço às professoras Patrícia Chimin e Fernanda Amaral por me ajudarem no meu início de caminhada na pós-graduação. Os estudos iniciais da participação de mTORC2 na termogênese adaptativa tiveram início com a professora Patrícia Chimin, eu e essa tese lhe devemos muito.

Agradeço ao Rafael Junges, um grande amigo que ultrapassou as barreiras do laboratório. Dividimos pizzas e o apartamento por anos. Nunca esqueceremos da unidade de 1 Rafarilo: 96 kg. Obrigado por cada momento. Ter você na minha vida, como você mesmo diz, é uma benção e uma maldição.

Agradeço ao Álbort Peixoto pelas altas discussões sobre como GSK e FoXO são ativados, pela disponibilidade para discutir Rupaul's, reality shows e papers a qualquer hora do dia. Obrigado por toda segunda-feira sentarmos para colocar a fofoca em dia. E de novo, fique feliz no final do dia quando tudo dá certo.

Agradeço à Caroline Tomazelli, uma amiga de todo momento. Uma mulher forte de grande coração que sempre está preocupada se eu comi ou se preciso de ajuda em qualquer coisa dentro e fora do laboratório. Obrigado por reacender o meu amor pela leitura. Suas histórias e risadas fazem o meu dia a dia melhor. O seu amor pela música e cultura brasileira me faz te amar ainda mais.

Agradeço ao Chico, também conhecido como Tiago Eugênio. Você foi o meu grande parceiro no laboratório. Amo as nossas discussões sobre a ciência e a vida.

Amo te escutar. Amo as suas histórias. Você é uma pessoa boa demais para esse mundo. Daqui poucos anos nos encontraremos nas bancas dos nossos alunos.

Agradeço à Thayna Vieira (Thay). Você sabe que foi uma peça chave no meu doutorado. De certa forma, te (des)orientar em vários processos durante a sua iniciação científica e agora no mestrado foi essencial para o meu desenvolvimento no doutorado. Toda vez que você vai na sala eu já tiro o meu fone de ouvido esperando a sua pergunta para te ajudar, aconselhar ou falar de BTS. Obrigado por tudo e por tanto.

Agradeço ao Gustavo Gilio pela parceria em shows, festas e por toda a ajuda no laboratório e extra laboratório.

Agradeço à Mayara Moreno. Minha eterna companheira do café. Sempre lembrarei de você falando: “ÉRIQUEEE me ajuda no computador”. Você é uma pessoa de luz e fico feliz do caminho que você está trilhando.

Agradeço à Milene Ortiz pela companhia e pelo ótimo gosto para músicas e filmes.

Agradeço ao Adriano Filho, Raphael Campos (a desnê), Vanessa Rocha e Bianca Leonardi por toda a ajuda.

Agradeço à Janayna Lima, uma amiga que a pós-graduação me deu para toda a vida. Uma mulher forte, paraibana, faladeira, que ama ajudar o próximo e que me serve de exemplo o tempo todo. Obrigado por me apresentar Pippo.

Agradeço ao Lucas Ariel, um amigo que eu divido não só o apartamento, mas também os dias bons e ruins, as comidas e o bom gosto musical. De longe vou sempre lembrar de você como a pessoa que passa horas e horas comigo escutando várias versões da mesma música, a pessoa que quando descobre uma banda nova (ou uma banda velha) logo me apresenta e ficamos viciados nessa banda, a pessoa que assim como eu ama versões ao vivo e que ama música. Seu único defeito é ficar repetindo os mesmos acordes milhares de vezes no violão - por causa disso deixei de gostar de There is a light that never goes out do The Smiths.

Agradeço aos eternos moradores do apartamento 191: Raony Moraes pelas várias noites cantando música pop e ao Lucas Agostini pelo melhor peixe cozido ever!

Mudar de cidade para fazer o doutorado não foi fácil. Mas agradeço imensamente à cidade de São Paulo. Aqui, me apaixonei pelo carnaval de rua, o qual também é uma desculpa para os encontros com os amigos de graduação. Todo

começo de fevereiro é a mesma coisa, a mesma vontade de aproveitar todos os fins de semana de carnaval. De longe, o meu maior amor é a música (desculpa ciência). Agradeço São Paulo por cada bloquinho do Alceu Valença, por cada vez que permitiu eu sentir e expressar o amor pela música e cultura brasileira. Também, agradeço à essa cidade pela oportunidade de ir nos shows mais incríveis da minha vida - U2 e Snow Patrol. Que essa cidade floresça de shows pós-pandemia.

Por fim, agradeço ao meu companheiro inseparável: o café. O café é algo inanimado, mas que tem uma capacidade incrível de permitir que as pessoas socializem. Toda manhã fazemos uma ou duas garrafas de café (saudades do café da Mayara). Sentamos juntos, todos os membros do laboratório, para tomar uma xícara de café e discutir ciência, discutir BBB, discutir filmes e músicas, focar, conversar sobre política e ficar indignado com a situação da pesquisa e do Brasil. E ainda, a hora do café é aquele momento em que você chama o colega do laboratório vizinho, cria redes de colaboração e de amizades. O café une. O cafézinho de todo dia foi e continua sendo o pilar essencial da minha história na pós-graduação.

Agradeço ao financiamento que permitiu o desenvolvimento dessa tese.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e verba PROEX (Programa de Excelência Acadêmica), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil (CNPq, processo: 162271/2015-8) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo: 2016/23169-9).

This study was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Financing Code 001 and PROEX fund (Academic Excellence Program), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil (CNPq, finance code: 162271/2015-8) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, finance code: 2016/23169-9).

“Science is more than a body of knowledge.
It's a way of thinking”

Carl Sagan

Resumo

Castro, É. **mTORC2 em adipócitos é essencial para o aumento da capacidade termogênica induzida pelo frio e melhora da sensibilidade à insulina induzida pelo frio e ingestão de dieta rica em ácidos graxos ômega 3.** [Tese (Fisiologia Humana)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2021.

Rictor é um componente essencial do complexo 2 da mTOR (mTORC2) que controla o crescimento, a proliferação e o metabolismo celular. Quando ativado por insulina, Rictor/mTORC2 promove, principalmente via fosforilação e ativação da Akt, a captação de glicose e a lipogênese *de novo* em adipócitos. Neste estudo, nós investigamos o envolvimento de mTORC2 em adipócitos como possível mediador do aumento da capacidade termogênica, captação de glicose no tecido adiposo e melhora na homeostase da glicose induzidos pela aclimação ao frio por 14 dias (Capítulo II), tratamento com o agonista de PPAR γ pioglitazona (Capítulo III), e ingestão de dieta hiperlipídica rica em ácidos graxos ômega 3 (Capítulo IV). Para atingir estes objetivos camundongos com deleção de Rictor exclusivamente em adipócitos (ARicKO, Rictor flox/flox adiponectina Cre+) e irmãos controles (ARicWT, Rictor flox/flox) foram ou mantidos à 30°C ou 10°C por 14 dias (Capítulo II); ou alimentados com dieta hiperlipídica (60% de lipídeos) suplementada ou não com o agonista de PPAR γ pioglitazona (Pio, 30 mg/ kg massa corporal/ dia) por 8 semanas a 23°C (Capítulo III); ou alimentados com dietas hiperlipídicas isocalóricas (60% de lipídeos) produzidas usando como fonte de gordura a banha de porco (HFD) ou óleo de peixe (HF ω 3) por 8 semanas a 23°C (Capítulo IV). Foram avaliados a massa corporal, gasto energético por calorimetria indireta, metabólitos séricos, consumo de oxigênio tecidual, homeostase da glicose e o metabolismo glicídico e lipídico. Nossos principais achados foram que camundongos ARicKO aclimatados a 10°C são resistentes à insulina, apresentam redução da massa do tecido adiposo marrom (TAM), do *browning* do tecido adiposo branco (TAB) inguinal, do conteúdo total da proteína desacopladora UCP-1 e da capacidade termogênica avaliada com agonista do receptor β 3-adrenérgico. Deficiência de Rictor em adipócitos, entretanto, não interferiu com o aumento da captação de glicose no TAM e TAB inguinal induzidos pela aclimação ao frio. ARicKO alimentados com HFD apresentam resistência à insulina e esteatose hepática, apesar do menor ganho de massa corporal e redução das massas dos TAM e TAB. O tratamento com Pio, por sua vez, não interfere com o

ganho de massa corporal, mas melhora a sensibilidade à insulina e exacerba a esteatose hepática em ARicKO. ARicKO alimentados com HF_n3 têm maior ganho de massa corporal, redução do *browning* e do consumo de oxigênio no TAB inguinal, também apresentam resistência à insulina, mas são protegidos do desenvolvimento de esteatose hepática. Em conjunto, nossos resultados demonstram que Rictor/mTORC2 em adipócitos é um importante mediador da expansão da massa do TAM e do *browning* do TAB inguinal induzidos pela aclimação ao frio, o que resulta em reduzida capacidade termogênica. mTORC2 é também um importante mediador da expansão do TAB induzida pela ingestão de dieta hiperlipídica HFD e da melhora da sensibilidade à insulina induzida pela dieta hiperlipídica rica em ácidos graxos ômega 3, mas não participa da melhora da sensibilidade à insulina induzida pelo tratamento com pioglitazona. Nossos dados também indicam que Rictor/mTORC2 em adipócitos participa de um eixo de comunicação com o fígado de controle da sensibilidade à insulina, por mecanismos que ainda precisam ser elucidados.

Palavras-chave: Rictor, mTORC2, tecido adiposo, *browning*, termogênese, pioglitazona, ácidos graxos ômega 3, UCP-1, resistência à insulina

Abstract

Castro, É. **mTORC2 in adipocytes is essential to the increase in thermogenic capacity induced by cold and improvement in insulin sensitivity induced by cold and intake of a diet rich in omega 3 fatty acids** [PhD Thesis (Human Physiology)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2021.

Rictor is an essential component of mTOR complex 2 (mTORC2) that regulates cell growth, proliferation and metabolism. Upon activation by insulin, Rictor/mTORC2 promotes mainly through the phosphorylation and activation of Akt, glucose uptake and *de novo* lipogenesis in adipocytes. We investigated herein the involvement of adipocyte mTORC2 as a possible mediator of the increase in adipose tissue thermogenic capacity and glucose uptake in adipose tissue and improvement in glucose homeostasis induced by either cold acclimation for 14 days (Chapter 2) or treatment with the PPAR γ ligand pioglitazone (Chapter 3) and intake of high-fat diet enriched with omega 3 fatty acids (Chapter 4). For this, mice with Rictor deletion exclusively in adipocytes (ARicKO, Rictor flox/flox adiponectina Cre+) and littermate controls (ARicWT, Rictor flox/flox) were maintained at 30°C or acclimated to cold (10°C) for 14 days (Chapter 2); or fed with a high-fat diet supplemented or not with pioglitazone (Pio, 30 mg/ kg body weight/ day) during 8 weeks at 23°C (Chapter 3); or fed with high-fat diets produced using either lard (HFD) or fish oil (HF ω 3) as fat source for 8 weeks at 23°C (Chapter 4). Mice were evaluated for body mass, energy expenditure, serum metabolites, tissue oxygen consumption, glucose homeostasis and lipid and glucose metabolism. Our main findings indicate that ARicKO mice acclimated to cold (10°C) are insulin intolerant, and display impairments in brown adipose tissue mass (BAT) and inguinal white adipose tissue (iWAT) browning and total UCP-1 content and therefore thermogenic capacity evaluated with a β 3-adrenergic receptor agonist. Adipocyte Rictor deficiency, however, did not affect the increase in BAT and iWAT glucose uptake induced by cold acclimation. Furthermore, ARicKO fed with a high-fat diet displayed insulin resistance and hepatic steatosis, despite the lower body weight gain and reduced adiposity. Treatment with Pio did not affect body weight, but improved insulin sensitivity in ARicKO, despite exacerbating hepatic steatosis. ARicKO fed with HF ω 3 are insulin resistant, display higher body weight gain, and reduced iWAT browning and oxygen consumption than ARicWT and reduced hepatic steatosis when compared to HFD-fed ARicKO. In conclusion, our findings indicate that adipocyte Rictor/mTORC2 is an important mediator of BAT

expansion and iWAT browning induced by cold acclimation, which results in an impaired total UCP-1 content and mediated thermogenic capacity. Rictor/mTORC2 is also an important mediator of iWAT expansion induced by intake of HFD, and mediate the improvement in insulin sensitivity induced by HFn3, but not by Pio. Our findings also indicate that adipocyte Rictor/mTORC2 is involved in adipose tissue-liver communication axis, through unknown molecular mechanisms.

Keywords: Rictor, mTORC2, adipose tissue, browning, thermogenesis, pioglitazone, omega-3 fatty acid, UCP-1, insulin resistance

Lista de Ilustrações

- Figura 1.** Composição estrutural e principais funções de mTORC1 e mTORC2. Imagem adaptada de [28] 35
- Figura 2.** Efetores e funções de mTORC2. Figura adaptada de [28]. 38
- Figura 3.** Representação esquemática da via da insulina-PI3K-mTORC2-Akt-mTORC1. Imagem autoral criada na plataforma Biorender..... 40
- Figura 4.** Tipos principais de adipócitos e tecidos adiposos em mamíferos. LD: *lipid droplet*/gotícula de gordura, N: núcleo, M: mitocôndria. Imagem autoral criada na plataforma Biorender. 45
- Figura 5. Via canônica de ativação da termogênese independente de tremor muscular em adipócitos marrons e beges. Imagem autoral criada na plataforma Biorender.... 49
- Figura 6.** Representação de dissipação do gradiente de prótons (H^+) pela UCP-1 em adipócitos marrons e beges com geração de calor. Imagem autoral criada na plataforma Biorender. 50
- Figura 7.** Adipocyte mTORC2 deficiency reduces BAT mass and total protein content in cold acclimated mice. Male A-RicKO and A-RicWT mice were either kept at thermoneutrality ($30 \pm 1^\circ C$) or acclimated to cold ($10 \pm 1^\circ C$) for 14 days and evaluated for brown adipose tissue (BAT, A-C) and inguinal white adipose tissue (iWAT, D-F) signaling, body weight (G), food intake (H), BAT (I), iWAT (J), liver (K) and lean (L) masses and BAT H/E staining (M), nuclei per field (N), relative (O) and total (P) protein contents and Ki67 (Q) and CCND1 (R) mRNA levels and iWAT H/E staining (S), electronic microscopy (T), mean adipocyte area (U), multilocular adipocytes (V), relative (W) and total (X) protein contents and Ki67 (Y) and CCND1 (Z) mRNA levels. Values are expressed as mean \pm SEM. Numbers inside or above bars represent mice number per group. Means not sharing a common superscript are significantly different from each other, $p \leq 0.05$ 66
- Figura 8.** Adipocyte mTORC2 deficiency attenuates cold-induced increased in mRNA levels of proteins involved in de novo fatty acid synthesis in BAT and iWAT and exacerbates adrenergically-stimulated lipolysis in iWAT. Male A-RicKO and A-RicWT mice were either kept at thermoneutrality ($30 \pm 1^\circ C$) or acclimated to cold ($10 \pm 1^\circ C$) for 14 days and evaluated serum glycerol (A) and NEFA (B) levels, brown adipose tissue (BAT) lipolysis (C) and mRNA levels GyK (D), D2 (E), LPL (F), CD36 (G), PPAR γ 2 (H), ACLY (I), ACC (J) and FAS (K) and inguinal white adipose tissue (iWAT)

lipolysis (L), and mRNA levels GyK (M), D2 (N), LPL (O), CD36 (P), PPAR γ 2 (Q), ACLY (R), ACC (S) and FAS (T) and serum adiponectin levels (U). Values are expressed as mean \pm SEM. Numbers inside or above bars represent mice number per group. Means not sharing a common superscript are significantly different from each other, $p \leq 0.05$.

..... 68

Figura 9. Adipocyte mTORC2 deficiency does not affect cold-induced increase in BAT and iWAT glucose uptake, but impairs insulin tolerance. Male A-RicKO and A-RicWT mice were either kept at thermoneutrality ($30 \pm 1^\circ\text{C}$) or acclimated to cold ($10 \pm 1^\circ\text{C}$) for 14 days and evaluated for brown adipose tissue (BAT) in vivo glucose uptake expressed per total tissue (A) or per mg of protein (B) and glucose transporter 1 (GLUT-1, C and D) and GLUT-4 (C and E) contents and inguinal white adipose tissue (iWAT) in vivo glucose uptake expressed per total tissue (F) or per mg of protein (G), and GLUT-1 (I) and GLUT-4 (J) contents, fasting insulin levels (K), insulin tolerance (ITT, L), kITT (M), pyruvate tolerance (PTT, N) and PTT area under the curve (AUC, O). Values are expressed as mean \pm SEM. Numbers inside or above bars represent mice number per group. Means not sharing a common superscript are significantly different from each other, $p \leq 0.05$.

..... 70

Figura 10. Adipocyte mTORC2 deficiency does not affect cold induced increase in BAT UCP-1 content. Male A-RicKO and A-RicWT mice were either kept at thermoneutrality ($30 \pm 1^\circ\text{C}$) or acclimated to cold ($10 \pm 1^\circ\text{C}$) for 14 days and evaluated for brown adipose tissue (BAT) protein content of uncoupling protein 1 (UCP-1, A and B), and content of respiratory complexes proteins NDUFB8 (A and C), SDHB (A and D), UQCRC2 (A and E) and ATP5A (A and F), and mitochondrial fission DRP-1 (A and G) and fusion L-OPA-1 (A and H) and mitophagy PARKIN (A and I) and mitochondria morphology (J). Values are expressed as mean \pm SEM. Numbers inside or above bars represent mice number per group. Means not sharing a common superscript are significantly different from each other, $p \leq 0.05$.

..... 71

Figura 11. Adipocyte mTORC2 deficiency attenuates cold-induced iWAT browning and increase in mitochondria mass. Male A-RicKO and A-RicWT mice were either kept at thermoneutrality ($30 \pm 1^\circ\text{C}$) or acclimated to cold ($10 \pm 1^\circ\text{C}$) for 14 days and evaluated for inguinal white adipose tissue (iWAT) content of uncoupling protein 1 (UCP-1, A and B), mRNA level of PRDM16 (C) and content of respiratory complexes proteins NDUFB8 (A and D), SDHB (A and E), UQCRC2 (A and F) and ATP5A (A and G), and mitochondrial fission DRP-1 (A and H) and fusion L-OPA-1 (A and I) and

mitophagy PARKIN (A and J), mitochondrial mass (citrate synthase, K). Values are expressed as mean \pm SEM. Numbers inside or above bars represent mice number per group. Means not sharing a common superscript are significantly different from each other, $p \leq 0.05$ 72

Figura 12. Adipocyte mTORC2 deficiency impairs cold-induced BAT and iWAT total UCP-1 content and thermogenic capacity and promotes scapular muscle shivering. Male A-RicKO and A-RicWT mice were either kept at thermoneutrality ($30 \pm 1^\circ\text{C}$) or acclimated to cold ($10 \pm 1^\circ\text{C}$) for 14 days and evaluated for CL-316,243 (1 mg/ Kg of body weight, A) induced oxygen consumption, total brown adipose tissue and inguinal white adipose tissue UCP-1 content (B), whole-body oxygen consumption (C), respiratory exchange rates (RER, D), rectal temperature (E), serum creatine kinase activity (H), scapular muscle electromyography (EMG, I and J) and serum FGF-21 levels (K). Panels D and E are rates of oxygen consumption and rectal temperature from male A-RicKO and A-RicWT mice food deprived and exposed to cold ($10 \pm 1^\circ\text{C}$) for 5 h. Values are expressed as mean \pm SEM. Numbers inside or above bars represent mice number per group. Means not sharing a common superscript are significantly different from each other, $p \leq 0.05$. * $p \leq 0.05$ versus cold acclimated A-RicKO mice. 74

Figura 13. PPAR γ então liga-se em um processo de heterodimerização obrigatória com RXR, com processor de recrutamento de coativadores que permitem a transcrição gênica. 82

Figura 14. Esquema dos cruzamentos para obtenção de camundongos controles e com deleção de Rictor em adipócitos. 87

Figura 15. Gel representativo de agarose 2% da separação por eletroforese de produtos da genotipagem de (A) Rictor floxeado e (B) adiponectin-Cre. 88

Figura 16. Esquema representativo do desenho experimental do capítulo 3. 90

Figura 17. Conteúdo proteico de Akt total e fosforilada em Ser473 estimulada ou não com insulina no TAM de camundongos controles (ARicWT) e com deleção de Rictor em adipócitos (ARicKO) alimentados por oito semanas com dieta hiperlipídica (HFD) suplementada ou não com pioglitazona (Pio, 30 mg/ kg). n =4-6 camundongos por grupo. Dados representados como média \pm EPM; letras diferentes acima das barras dos tratamentos representam diferença estatística, $p < 0,05$ 94

Figura 18. (ab) Curva de ganho de massa, (c) ganho de massa corporal, consumo alimentar (d) acumulado e (e) total, (f) porcentagem de massa gorda e magra, massas

do TAM (g) e dos (h) eTAB, iTAB e rTAB, (i) razão do TAB inguinal em relação a soma dos eTAB e rTAB, massas do (j) músculo gastrocnêmio e do (k) fígado de camundongos controles (ARicWT) e com deleção de Rictor em adipócitos (ARicKO) alimentados por oito semanas com dieta hiperlipídica (HFD) suplementada ou não com pioglitazona (Pio, 30 mg/ kg). n =4-12 camundongos por grupo. Dados representados como média±EPM; letras diferentes acima das barras dos tratamentos representam diferença estatística, p < 0,05. 96

Figura 19. (a, b) Curva glicêmica e (c) área sob a curva de teste de tolerância à glicose (GTT), (d,e) curva glicêmica e, (f) taxa de decaimento da glicemia de teste de tolerância à insulina (ITT), (g) concentração sérica de adiponectina, (h) glicemia de jejum, (i) insulinemia de jejum, (j) índice de resistência à insulina HOMA-IR, (k) massa do pâncreas, (l) fotomicrografia representativa de secções do pâncreas corado com H&E, (m, n) curva de distribuição das áreas das ilhotas pancreáticas e (o) área média das ilhotas pancreáticas de camundongos controles (ARicWT) e com deleção de Rictor em adipócitos (ARicKO) alimentados por oito semanas com dieta hiperlipídica (HFD) suplementada ou não com pioglitazona (Pio, 30 mg/ kg). n =3-12 camundongos por grupo. Dados representados como média±EPM; letras diferentes acima das barras dos tratamentos representam diferença estatística, p < 0,05..... 98

Figura 20. (a) Fotomicrografia representativa de secções do TAM corado com H&E, conteúdo de proteínas totais normalizado por (b) miligrama e por (c) massa total do TAM, ensaio de captação de glicose *in vitro* normalizado por (d) miligrama de proteínas e por (e) massa total do TAM, ensaio de liberação de glicerol por miligrama de proteína no TAM (f) e no iTAB (g), (h-k) conteúdo proteico de UCP-1, FAS e SCD1 no TAM de camundongos controles (ARicWT) e com deleção de Rictor em adipócitos (ARicKO) alimentados por oito semanas com dieta hiperlipídica (HFD) suplementada ou não com pioglitazona (Pio, 30 mg/ kg). n =3-6 camundongos por análise. Dados representados como média±EPM; letras diferentes acima das barras dos tratamentos representam diferença estatística, p < 0,05. 100

Figura 21. (a) Triacilglicerol e (b) ácido graxo livre circulantes, (c) fotomicrografia representativa de secções do TAM corado com H&E e PAS, (d) taxa de consumo de oxigênio e (e) razão do controle respiratório de mitocôndrias isoladas do fígado de camundongos controles (ARicWT) e com deleção de Rictor em adipócitos (ARicKO) alimentados por oito semanas com dieta hiperlipídica (HFD) suplementada ou não com pioglitazona (Pio, 30 mg/ kg). n =3-14 camundongos por grupo. Dados representados

como média±EPM; letras diferentes acima das barras dos tratamentos representam diferença estatística, $p < 0,05$	102
Figura 22. Desenho experimental do capítulo 4.....	111
Figura 23. Conteúdo proteico de Rictor, Akt fosforilada em Ser473 e Akt Total no (A) TAM e (B) iTAB de camundongos controles (ARicWT) e com deleção de Rictor em adipócitos (ARicKO) alimentados por oito semanas com HFD ou HF _n 3. $n = 5-6$ camundongos por grupo. Dados representados como média±EPM; letras diferentes acima das barras representam diferença estatística, $p < 0,05$	115
Figura 24. (A) Curva de ganho de massa corporal, (B) ganho de massa corporal, (C) curva de consumo alimentar, (D) consumo alimentar total, massas dos tecidos adiposos (E) marrom, (F) brancos epididimal, inguinal e retroperitoneal, massa do (G) fígado e (H) músculo gastrocnêmio, fotomicrografias de secções coradas com hematoxilina e eosina do (I) TAM e (J) iTAB, e consumo de oxigênio de fragmentos de tecido adiposo (K) branco inguinal e (L) marrom) de camundongos controles (ARicWT) e com deleção de Rictor em adipócitos (ARicKO) alimentados por oito semanas com HFD ou HF _n 3. $n = 5-6$ camundongos por grupo. Dados representados como média±EPM; letras diferentes acima das barras representam diferença estatística, $p < 0,05$	117
Figura 25. (A, B) Curva do teste de tolerância à glicose, (C) área sob a curva do GTT, (D,E) teste de tolerância à insulina, (F) taxa de decaimento da glicemia por min do ensaio de ITT, (G) teste de tolerância ao piruvato, (H) área sob a curva do PTT, (I) glicemia de jejum e realimentado e (J) insulinemia de camundongos controles (ARicWT) e com deleção de Rictor em adipócitos (ARicKO) alimentados por oito semanas com HFD. $n = 5-6$ camundongos por grupo. Dados representados como média±EPM; letras diferentes acima das barras representam diferença estatística, $p < 0,05$	119
Figura 26. Conteúdo de micrograma de (A) TNF α , IL-1 β , (C) IL-6 e (D) 1L-10 por miligrama de proteína de homogenato de TAB epididimal de camundongos controles (ARicWT) e com deleção de Rictor em adipócitos (ARicKO) alimentados por oito semanas com HFD. $n = 5-6$ camundongos por grupo. Dados representados como média±EPM; letras diferentes acima das barras representam diferença estatística, $p < 0,05$	120
Figura 27. (A) TAG e (B) ácido graxo livre circulante, (C) fotomicrografia do fígado corado com hematoxilina e eosina (escala da barra = 50 μ m), (D) conteúdo proteico	

de proteínas da sinalização de mTOR e da lipogênese *de novo* no fígado de camundongos controles (ARicWT) e com deleção de Rictor em adipócitos (ARicKO) alimentados por oito semanas com HFD ou HF_n3. $n = 5-6$ camundongos por grupo. Dados representados como média \pm EPM; letras diferentes acima das barras dos tratamentos representam diferença estatística, $p < 0,05$ 121

Lista de Tabelas

Tabela 1. Substratos de mTORC1 e mTORC2	37
Table 2. Primary antibodies used in Western Blotting.....	63
Tabela 3. Primers utilizados na genotipagem de camundongos controle e experimentais.....	88
Tabela 4. Composição da HFD (60% das calorias provenientes da banha de porco).....	89
Tabela 5. Composição da HFD e HF _n 3.....	112
Tabela 6. Composição de ácidos graxos da HFD e HF _n 3 (mg/g).....	113

Lista de Abreviaturas e Siglas

4E-BP1	proteína ligante do fator de iniciação eucariótico 4E
AC	adenilado ciclase
ACC	acetil-CoA carboxilase
acetil-CoA	acetilcoenzima A
ACLY	ATP citrato liase
ACS	acil-CoA sintetase
AG	ácidos graxos
AGPAT	1-acilglicerol-3-fosfato aciltransferase
Akt	proteína quinase B
AMPc	3'5'-adenosina-monofosfato-cíclico
AMPK	proteína quinase ativada por AMP
ARicKO	camundongos com deleção de Rictor em adipócitos
ARicWT	camundongos controles selvagens, controles de ARicKO
ATGL	lipase de triacilglicerol do adipócito
ATP	adenosina trifosfato
AUC	área sob a curva
BCAA	aminoácidos de cadeia ramificada
C/EBP α	proteína de ligação ao enhancer CCAAT
ChREBP	proteína de ligação ao elemento responsivo a carboidratos
CO ₂	gás carbônico
CREB	proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc
DAG	diacilglicerol
DBD	domínio de ligação ao DNA
DEPTOR	proteína de interação com mTOR que contem o domínio DEP
DGAT	diacilglicerol aciltransferase
DHA	ácido docosaenoico
DHAP	fosfato de diidroxiacetona
DM2	diabetes mellitus do tipo 2
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNL	lipogênese de novo
DPA	ácido docosapentaenoico
EPA	ácido graxo eicosapentaenoico
eTAB	tecido adiposo branco epididimal
FADH ₂	flavina adenina dinucleotídeo
FAS	ácido graxo sintase
FDA	Food and Drug Administration
FFAR4	receptor de ácido graxo 4
FKBP12	proteína 12 de ligação ao FKBP
G3P	glicerol-3-fosfato
GLUT-1	transportador de glicose 1
GLUT-4	transportador de glicose 4

GPAT	1-glicerol-3-fosfato aciltransferase
GPR120	receptor acoplado à proteína G
Grb10	proteína 10 de ligação ao receptor da insulina
GTP	trifosfato de guanosina
GTT	teste de tolerância à glicose
Gyk	gliceroquinase
H&E	hematoxilina e eosina
H ₂ O	água
HFD	dieta hiperlipídica com 60% das calorias provenientes da banha de porco
HF _n 3	dieta hiperlipídica com 60% das calorias provenientes do óleo de peixe
HIF1 α	fator induzível por hipóxia 1 α
HM	motivo hidrofóbico
HOMA-IR	índice de homeostase da resistência à insulina
HSL	lipase sensível a hormônio
IGF-1	fator de crescimento semelhante à insulina-I
IMC	índice de massa corpórea
IRS-1	substrato do receptor da insulina 1
iTAB	tecido adiposo branco inguinal
ITT	teste de tolerância à insulina
KITT	taxa de decaimento da glicemia do ITT
L-RicKO	camundongos com deleção de Rictor em hepatócitos
L-RicWT	camundongos controles selvagens, controles de L-RicKO
LDB	domínio de ligação de ligante
LPA	ácido lisofosfatídico
LPL	lipase lipoproteica
MAG	monoacilglicerol
miRNA	micro RNA
mLST8	proteína letal de mamíferos 8 com Sec13
mTOR	alvo mecanístico da rapamicina
mTORC1	complexo 1 do alvo mecanístico da rapamicina
mTORC2	complexo 2 do alvo mecanístico da rapamicina
Myf5	fator miogênico 5
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo
NST	nonshivering thermogenesis
p38-MAPK	p38 mitogen-activated protein kinase
PA	ácido fosfatídico
pAKT	AKT fosforilada em Ser473
PAP1	lipina ou PA fosfatase
PAS	ácido periódico + reativo de Schiff
PCR	reação em cadeia da polimerase
PDGFR α	fator de crescimento derivado de plaquetas α
PDK1	proteína quinase dependente de fosfoinosítídeo 1
PEPCK	fosfoenolpiruvato carboxilase

PET	tomografia de emissão de pósitrons
PGC1-a	co-ativador 1a de PPARg
Pio	pioglitazona
PIP2	fosfatidil-inositol 4,5-bifosfato
PIP3	fosfatidil-inositol 3,4,5-trifosfato
PKA	proteína quinase A
PKC	proteína quinase C
PPAR	receptor ativador da proliferação peroxissomal
PPARg	receptor ativador da proliferação peroxissomal gama
PPRE	região de elementos responsivos a PPAR
PRAS40	substrato da Akt rico em prolina de 40 kDa
PROTOR1	proteína associada com Rictor 1
PROTOR2	proteína associada com Rictor 2
PTEN	phosphatase and tensin homolog
PTT	teste de tolerância ao piruvato
PUFA	ácidos graxos poli-insaturados
RapKO	camundongos com deleção de Raptor em adipócitos
RAPTOR	proteína reguladora associada com mTOR
RICTOR	componente proteico de mTOR insensível à rapamicina
RNA	ácido ribonucleico
RSG	rosiglitazona
rTAB	tecido adiposo branco retroperitoneal
RXR	receptore do ácido retinoico
S6K	proteína quinase ribossomal S6
SERCA	Ca ²⁺ -ATPase do retículo sarcoplasmático
SGK1	proteína quinase regulada por soro e glicocorticoide
SREBP1	proteína 1 de ligação ao elemento regulador de esterol
ST	shivering thermogenesis
TA	tecido adiposo
TAB	tecido adiposo branco
TAG	triacilglicerol
TAM	tecido adiposo marrom
TM	motivo turn
TNF- α	fator de necrose tumoral α
TOR1	alvo da rapamicina 1
TOR2	alvo da rapamicina 2
TSC2	complexo da esclerose tuberosa
TZDs	tiazolidinedionas
UCP-1	proteína desacopladora 1
VLDL	lipoproteínas de muito baixa densidade
YY1	yin-yang 1
β 3-AR	receptor β 3-adrenérgico

Sumário

PREÂMBULO	29
CAPÍTULO I	30
INTRODUÇÃO	31
MTOR.....	33
<i>Composição estrutural de mTORC1 e mTORC2</i>	33
<i>Substratos e ações biológicas de mTORC1</i>	35
<i>Substratos e ações biológicas de mTORC2</i>	37
<i>Mecanismos de controle de mTORC2</i>	39
<i>Ativação de mTORC2 independentemente de fatores de crescimento</i>	40
<i>mTOR e Tecido Adiposo</i>	41
BIOLOGIA DO TECIDO ADIPOSEO	41
<i>Adipócitos</i>	43
<i>Metabolismo de lipídeos em adipócitos</i>	45
<i>Metabolismo da glicose em adipócitos</i>	48
<i>Termogênese independente de tremor muscular</i>	48
<i>Metabolismo do TAM ativado</i>	51
<i>Plasticidade e disfunção do tecido adiposo</i>	52
PARTICIPAÇÃO DE mTORC2 NA BIOLOGIA DO TECIDO ADIPOSEO	53
CAPÍTULO II	56
INTRODUCTION	58
MATERIAL AND METHODS.....	60
RESULTS	64
DISCUSSION	74
CAPÍTULO III	80
INTRODUÇÃO	81
COMUNICAÇÃO ENTRE PPAR γ E A VIA DA INSULINA	83
HIPÓTESE	86
OBJETIVOS	86
MATERIAL E MÉTODOS	86
<i>Camundongos</i>	86
<i>Genotipagem</i>	88
<i>Desenho experimental</i>	89
<i>Composição corporal</i>	90
<i>Homeostase da glicose</i>	90
<i>Ensaio de lipólise em fragmentos de tecido</i>	91
<i>Análise histológica</i>	91
<i>Western Blot</i>	91
<i>Análise Estatística</i>	93
RESULTADOS	94
<i>Pioglitazona aumenta atividade de mTORC2</i>	94
<i>Deficiência de mTORC2 em adipócitos reduz o ganho de massa corporal e adiposidade e bloqueia parcialmente o aumento de massa do TAM induzido pela Pio</i>	95

<i>Pio abole a intolerância à insulina e hipersinulinemia induzida pela deficiência de Rictor em adipócitos</i>	97
<i>Deficiência de Rictor/mTORC2 atenua o aumento no conteúdo de UCP-1 no TAM induzido pelo Pio</i>	99
<i>Pio exacerba a esteatose hepática em camundongos ARicKO</i>	101
DISCUSSÃO	103
CONCLUSÃO	106
CAPÍTULO IV	107
A DEFICIÊNCIA DE RICTOR/MTORC2 EM ADIPÓCITOS PREJUDICA A MELHORA NA SENSIBILIDADE À INSULINA INDUZIDA POR UMA DIETA HIPERLIPÍDICA RICA EM ÁCIDOS GRAXOS Ω-3	107
INTRODUÇÃO	108
MTOR E Ω -3	110
HIPÓTESE	110
OBJETIVOS	111
MATERIAL E MÉTODOS	111
<i>Desenho experimental</i>	111
<i>Cromatografia gasosa</i>	112
<i>Consumo de oxigênio tecidual</i>	113
<i>Homeostase da glicose</i>	114
RESULTADOS	114
<i>Dieta HFn3 aumenta a atividade de mTORC2 no iTAB, mas não no TAM</i> . 114	
<i>Deleção de Rictor em adipócitos reverte parcialmente a redução de ganho de peso induzida pela ingestão de dieta HFn3</i>	115
<i>Dieta rica em óleo de peixe melhora resistência à insulina por mecanismos parcialmente dependentes de mTORC2 em adipócitos</i>	118
<i>Rictor/mTORC2 em adipócitos não é necessário para a redução de citocinas pró inflamatórias induzidas pela dieta rica em óleo de peixe</i>	120
<i>Dieta rica em óleo de peixe protege camundongos ARicKO da esteatose hepática por mecanismo dependente de mTORC2, mas não de mTORC1</i>	120
DISCUSSÃO	122
CONCLUSÃO	125
CONSIDERAÇÕES FINAIS	126
BIBLIOGRAFIA	128

Preâmbulo

Nesta tese, investigamos o envolvimento de mTORC2 em adipócitos como possível mediador do aumento da captação de glicose no tecido adiposo e melhora na homeostase da glicose induzidos pela aclimatação ao frio por 14 dias (Capítulo II), tratamento com o agonista de PPAR γ pioglitazona (Capítulo III), e ingestão de dieta hiperlipídica rica em ácidos graxos ômega 3 (Capítulo IV). Abaixo detalho a organização desta tese:

Capítulo I. Introdução à biologia de mTOR e do tecido adiposo;

Capítulo II. A deficiência específica de mTORC2 em adipócitos reduz a capacidade termogênica do tecido adiposo marrom e branco inguinal sem afetar a captação de glicose e o gasto energético de camundongos aclimatados ao frio;

Capítulo III. mTORC2 em adipócitos é um importante mediador da expansão de massa do tecido adiposo marrom, mas não da melhora na sensibilidade à insulina induzida pela ativação farmacológica de PPAR γ com pioglitazona;

Capítulo IV. A deficiência de Rictor/mTORC2 em adipócitos prejudica a melhora na sensibilidade à insulina induzida por uma dieta hiperlipídica rica em ácidos graxos ω -3;

Capítulo V. Conclusão.

Capítulo I

Introdução à biologia de mTOR e do tecido adiposo

Parte do *rationale* deste capítulo foi publicado em:

Castro É, Silva TEO, Festuccia WT. (2017). *Critical review of beige adipocyte thermogenic activation and contribution to whole-body energy expenditure*. *HMBCI*.31, (2):1–9 [1]

Introdução

É trivial a observação de que todos os organismos vivos crescem (aumento da massa) apenas quando há disponibilidade de nutrientes. No livro “A História dos Animais” (350 a.C.), o filósofo Aristóteles discorre:

“A vida dos animais, então, pode ser dividida em dois atos: procriação e **alimentação**; pois nesses dois atos todos os seus interesses e vida se concentram. Seu alimento depende principalmente da substância da qual são constituídos separadamente; pois **a fonte de seu crescimento** em todos os casos será esta substância. E tudo o que está em conformidade com a natureza é agradável, e todos os animais buscam o prazer de acordo com sua natureza.” [2].

Entretanto, os mecanismos moleculares de detecção de nutrientes do meio que desencadeiam e permitem respostas de crescimento e proliferação celular começaram apenas recentemente a serem descobertos. A proteína alvo mecanístico da rapamicina (mTOR, *mechanistic target of rapamycin*) foi identificada nas últimas décadas como um importante regulador molecular do metabolismo, crescimento e consequentemente da função celular. A história da descoberta da proteína mTOR é um dos capítulos fascinantes não-lineares da ciência e será brevemente abordada a seguir.

Em 1964, sob o perigo eminente da construção de um aeroporto na Ilha de Páscoa (Rapa Nui, no idioma dos nativos rapanui) no Oceano Pacífico, pesquisadores canadenses realizaram uma missão de identificação e coleta de materiais biológicos desconhecidos, como plantas e amostras de solo, com o objetivo de identificar compostos que protegem os rapanui de contrair tétano [3,4]. Em 1972, o grupo de Surendra (Suren) Nath Sehgal, um pesquisador indiano contratado pela farmacêutica canadense Ayerst (essa farmacêutica foi posteriormente adquirida pela farmacêutica Pfizer, umas das líderes da produção de vacinas contra a pandemia do SARS-CoV-2) na esperança de descobrir novos antibióticos, analisou as amostras de solo da Ilha de Páscoa coletadas alguns anos antes e identificou uma biomolécula com propriedades antifúngicas produzida pela bactéria *Streptomyces hygroscopicus*, que denominaram de rapamicina [4,5]. O grupo liderado por Suren também iniciou os estudos que identificaram a rapamicina como um potente imunossupressor, que

posteriormente foi aprovado pela agência de regulamentação dos Estados Unidos, a FDA (*Food and Drug Administration*) para esse uso e também para o tratamento de doenças autoimunes [5]. Hoje, a rapamicina rende bilhões de dólares devido as suas aplicações na prevenção de rejeição de órgãos transplantados e do uso promissor no tratamento de tumores sólidos [6]. Há atualmente na plataforma ClinicalTrials.gov 239 testes clínicos que visam utilizar a rapamicina no tratamento das mais diversas doenças, como doença de Crohn, vários tipos de câncer, doenças vasculares e neurológicas, doenças metabólicas e até mesmo aplicações que visam o aumento da longevidade [7]. Fica assim evidente o imenso potencial econômico da rapamicina.

Apenas no início dos anos 90 os mecanismos de ação da rapamicina começaram a ser revelados pelo grupo do professor Stuart L. Schreiber, que demonstrou inicialmente que a rapamicina ao se ligar e formar um complexo com FKBP12, uma proteína da família das imunofilinas (proteínas que se ligam a imunossupressores), inibe vias de crescimento e proliferação celular [8]. Utilizando abordagens genéticas e bioquímicas, grupos independentes descobriram em um período de dois anos a proteína alvo da ação rapamicina: a mTOR. Inicialmente Michael Hall e George P. Livi descobriram dois genes com mutações em leveduras que conferiram resistência à ação da rapamicina, que então denominaram de genes *TOR1* e *TOR2* (*target of rapamycin*, alvo da rapamicina) [9]. Posteriormente, foi identificado uma proteína em células de mamíferos que se liga ao complexo FKBP12-rapamicina. Essa proteína foi purificada, sequenciada e clonada por David Sabatini, Stuart Schreiber e Robert T. Abraham [3,10]. Este último denominou essa proteína de TOR de mamíferos (mTOR, *mammalian TOR*) visto a homologia com a *TOR* de leveduras. Após uma revisão de nomenclatura, o acrônimo mTOR passou a ser definido como *mechanistic Target Of Rapamycin*, ou alvo mecanístico da rapamicina [3,11].

Estudos iniciais já haviam demonstrado que a rapamicina inibe a síntese proteica e o crescimento celular por mecanismos envolvidos com a fosforilação da proteína ligante do fator de iniciação eucariótico 4E (4E-BP1, *eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1*) e da proteína ribossomal S6 quinase (S6K) [12,13]. Posteriormente, após a descoberta de mTOR, estudos confirmaram que a mTOR é uma serina-treonina quinase que fosforila 4E-BP1 e S6K-1, entre outros alvos, e assim promove a síntese proteica e o crescimento celular [14]. Entretanto,

como será abordado nos tópicos e capítulos a seguir, a via de sinalização da mTOR é envolvida no controle de diversos processos celulares além da síntese proteica.

mTOR

A proteína mTOR (289 kDa) é uma serina/treonina quinase altamente conservada pertencente à família das “proteínas relacionadas às fosfatidilinositol 3-quinases” (família PIKK). Diferentemente de leveduras, os eucariotos superiores têm apenas um gene *MTOR* [15–17]. mTOR é o centro catalítico de dois complexos multiproteicos denominados de complexos 1 (mTORC1) e 2 (mTORC2) da mTOR que são diferentes em composição, estrutura, ativação, função e sensibilidade à rapamicina [18]. Em suma, a ativação de mTOR promove o crescimento e proliferação celular [15,19,20], salvo poucas exceções [21]. Esses processos celulares demandam energia, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos que são necessários para a síntese de novas células e organelas, e, portanto, a ativação de mTOR promove essencialmente processos anabólicos, e paralelamente, inibe processos catabólicos, como a autofagia e a lipólise (Fig. 1a).

Composição estrutural de mTORC1 e mTORC2

Além da quinase **mTOR**, mTORC1 é composto pela proteína reguladora associada com mTOR (**RAPTOR**, *regulatory protein associated with mTOR*), proteína letal de mamíferos 8 com Sec13 (**mLST8**, *mammalian lethal with Sec13 protein 8*) e **Tti1/Tel2**, além de duas subunidades inibitórias acessórias: o substrato da Akt rico em prolina de 40 kDa (**PRAS40**, *proline-rich Akt substrate of 40 kDa*) e a proteína de interação com mTOR que contém o domínio DEP (**DEPTOR**, *DEP domain containing mTOR interacting protein*). RAPTOR é essencial para a formação estrutural, direcionamento, localização subcelular e atividade de mTORC1. Raptor direciona mTORC1 ao lisossomo e interage com motivos TOR de alvos de mTORC1 recrutando esses substratos ao centro catalítico do complexo [22]. A deleção genética de RAPTOR abole a atividade de mTORC1 em diversos tipos celulares [23–25]. Em contraste a RAPTOR, mLST8 estabiliza o domínio quinase da mTORC1, mas não é essencial à atividade do complexo [26]. Tti1/Tel2 participam na montagem (*assembly*) e estabilização de mTORC1 e mTORC2. PRAS40 inibe RAPTOR, enquanto que DEPTOR inibe diretamente a proteína mTOR [27]. O complexo rapamicina-FKBP12

inibe parcialmente a atividade de mTORC1 ao ligar-se no domínio de ligação de FKBP12 na proteína mTOR [27]. Estudos estruturais demonstraram que mTORC1 e mTORC2 existem na forma de homodímeros com duas subunidades por complexo adotando um estrutura similar a um romboide (losango) [27] (Figura 1).

O núcleo de mTORC2, assim como o de mTORC1, também é formado por **mTOR**, **mLST8** e **Tti1/Tel2**, e por duas proteínas específicas desse complexo, o componente proteico de mTOR insensível à rapamicina (**RICTOR**, *rapamycin-insensitive companion of mTOR*) e a proteína de interação com a proteína quinase de mamíferos ativada por estresse (**mSIN1**, *mammalian stress-activated Map kinase-interacting*). As proteínas associadas a RICTOR 1 e 2 (**PROTOR1** e **PROTOR2**, *protein observed with RICTOR 1/2*) também fazem parte de mTORC2, mas não são essenciais à atividade do complexo (Figura 1). Diferentemente de mTORC1, mLST8 é essencial à atividade de mTORC2 [26]. RICTOR é um proteína de arcabouço (*scaffolding*) que se liga a mSIN. Por causa da ligação de mTOR com RICTOR e mSIN, o sítio de ligação do complexo rapamicina-FKBP12 na proteína mTOR fica inacessível pela rapamicina. Portanto, mTORC2 é insensível ao tratamento agudo com rapamicina. Surpreendentemente, o tratamento prolongado com rapamicina inibe mTORC2, por um mecanismo que envolve o sequestro de proteínas mTOR recém-sintetizadas antes da formação de mTORC2 [19,28]. O efeito inibitório da rapamicina em mTORC2 depende da dose, duração do tratamento e tipo celular envolvido. Embora ambos os complexos controlam o metabolismo, crescimento e proliferação celular, mTORC2 tem recebido menor atenção e assim aspectos importantes sobre a estrutura, regulação e função deste complexo ainda são desconhecidos. Em uma busca na base de dados Pubmed, em maio de 2021, encontramos aproximadamente 8000 trabalhos abordando mTORC1, e 2500 abordando mTORC2.

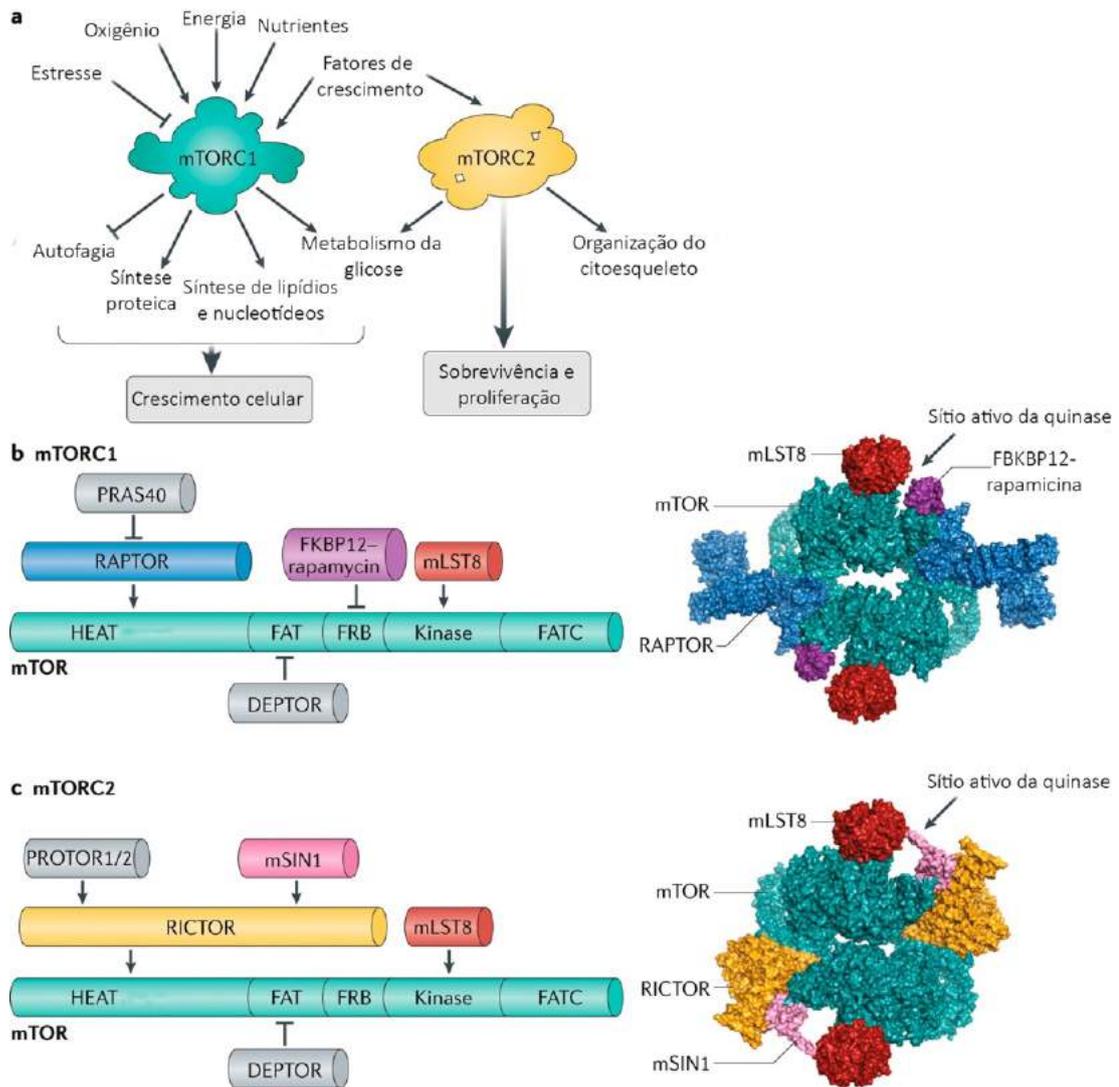


Figura 1. Composição estrutural e principais funções de mTORC1 e mTORC2. Imagem adaptada de [27]

Substratos e ações biológicas de mTORC1

Como mencionado anteriormente, mTORC1 promove a síntese proteica via fosforilação de S6K-1 em Tr389 e de 4E-BP1 em diversos resíduos, especialmente Tr37/46. Na ausência de fosforilação, a proteína 4E-BP1 inibe o fator de iniciação da tradução (eIF4E). Quando mTORC1 fosforila 4E-BP1, este dissocia-se de eIF4E, permitindo o início da tradução do RNAm. Após o início da tradução, ocorre um processo de alongação, no qual a S6K1 fosforila e inibe a quinase de eEF2K, que por sua vez, deixa de inibir o fator de alongação eEF2 (fator eucariótico de alongação 2) [29]. Além disso, mTORC1 também promove a síntese de nucleotídeos necessários para a replicação do DNA por ativar vias de síntese *de novo* de purinas pela ativação do fator de transcrição ATF4 e de síntese de pirimidinas dependente de S6K1 [27,30].

S6K1 também promove a síntese de RNA ribossomal ao fosforilar as proteínas UBF (*upstream binding factor*), o fator de iniciação da transcrição 1A (TIF-1A) e o repressor da transcrição da polimerase III de RNA MAF-1, que em conjunto, aumentam a atividade da polimerase de RNA I e III, e portanto, ativam a transcrição de RNA ribossomal [18,27,29]

Ainda, mTORC1 promove a síntese *de novo* de ácidos graxos necessária para a biogênese de novas membranas, bem como a síntese de triacilglicerol e fosfolípídeos, regulando a atividade de dois fatores de transcrição centrais do metabolismo lipídico, a proteína 1 de ligação ao elemento regulador de esterol (SREBP1, *sterol responsive elemento binding protein 1*), e o receptor ativador da proliferação peroxissomal gama (PPAR γ) [31]. mTORC1 promove tanto o processamento no retículo endoplasmático quanto a translocação ao núcleo de SREBPs, aumentando a expressão gênica das enzimas da lipogênese *de novo* ATP-citrato liase (ACLY), acetil-CoA carboxilase (ACC) e ácido graxo sintase (FAS). A ativação de mTORC1 aumenta também a expressão de genes envolvidos na captação e esterificação de ácidos graxos a triacilglicerol por mecanismo que envolve aumento na atividade transcricional de PPAR γ [32]. Os processos moleculares pelos quais mTOR controla PPAR γ são desconhecidos, mas parecem envolver o aumento do conteúdo do co-regulador de PPAR γ C/EBP α [33].

Além da síntese de lipídeos, em células em proliferação, mTORC1 aumenta também o fluxo de carbono na via glicolítica aumentando assim a disponibilidade de precursores para a síntese de fosfolípídeos, nucleotídeos e proteínas. Isso acontece pelo aumento da expressão do fator induzível por hipóxia 1 α (HIF1 α), que por sua vez, aumenta a expressão de genes de diversas enzimas da via glicolítica. Ainda, mTORC1 estimula a biogênese e respiração mitocondrial por um mecanismo que envolve 4E-BP1 e a ativação do complexo de transcrição yin-yang 1 (YY1) associado com o co-ativador 1 α de PPAR γ (PGC1- α) [27,34,35]. Por fim, mTORC1 inibe a autofagia, um dos principais processos catabólicos celulares, via fosforilação e inibição da ULK-1/2 e do fator de transcrição TFEB [30] (Tabela 1).

Tabela 1. Substratos de mTORC1 e mTORC2

Complexo	Substrato	Funções
mTORC1	4E-BP1 S6K1	Síntese de proteínas, nucleotídeos e RNA ribossomal
	Lipina-1	Controla a síntese de TAG via SREBP-1
	ULK1	Controle da autofagia
	Grb10	Regulador do <i>feedback</i> negativo no receptor de insulina e IGF1
mTORC2	PKC	Organização do citoesqueleto
	SGK1	Transporte de íons
	AKT/PKB	Crescimento, proliferação e sobrevivência celular e metabolismo
	ACLY	Controle da lipogênese <i>de novo</i>

Substratos e ações biológicas de mTORC2

mTORC2 controla, principalmente, a proliferação e sobrevivência celular, por fosforilar em motivos hidrofóbicos (HM) e de curvatura (*turns*) as proteínas da família das quinases AGC: a proteína quinase B (Akt ou PKB), quinase regulada por soro e glicocorticoide (SGK1) e a proteína quinase C (PKC) [36]. Além da família das ACG, mTORC2 fosforila proteínas diretamente envolvidas no metabolismo, dentre elas a proteína da lipogênese *de novo* ACLY que é fosforilada em Ser455 [37] (Tabela 1).

O primeiro substrato de mTORC2 identificado foi a PKC, que controla o remodelamento do citoesqueleto de actina e migração celular [18]. Enquanto que a SGK1 ativada por mTORC2 regula o transporte de íons, o volume celular, a absorção intestinal de glicose, bem como a proliferação celular e apoptose [18,27] (Figura 2).

O alvo mais estudado de mTORC2 é a Akt, que devido a sua atividade serina/treonina quinase, fosforila diversas proteínas celulares. Os principais alvos *downstream* da Akt são a proteína do complexo da esclerose tuberosa (TSC2) que em conjunto com TSC1 atua como um inibidor endógeno de mTORC1; proteínas de sobrevivência celular (FoxO1, Bim, Bax), de proliferação celular (p27 Kip, p21), do metabolismo (GSK3, AS160, PFKB2), entre outras [9] (Figura 2). Uma das ações principais da Akt é o controle da captação de glicose pela translocação do transportador de glicose 4 (GLUT-4, *glucose transporter*) à membrana plasmática induzida por insulina via mTORC2-Akt em adipócitos e miócitos [38–40].

Mecanicamente, mTORC2 fosforila Akt no motivo hidrofóbico no resíduo Ser473 [41] e no motivo de curvatura resíduo Thr450 [27]. A fosforilação de Akt em Thr450 parece ser importante na determinação da estabilidade do polipeptídeo nascente da Akt [27]. A Akt também é fosforilada em Thr308 pela quinase dependente de fosfoinosítido 1 (PDK1, *phosphoinositide-dependent protein kinase-1*). Fatores de crescimento como a insulina e o fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-1) estimulam o recrutamento de PDK1 e mTORC2 à membrana plasmática aumentando o conteúdo na membrana de fosfatidilinositol 3,4,5 fosfato (PIP3) que interage com o domínio homólogo à pleckstrina (um domínio de ligação com lipídeos) presente na proteína mSIN que compõe mTORC2. Esse recrutamento facilita a fosforilação da Akt na membrana plasmática. Hipóteses divergem sobre os mecanismos e passos iniciais da ativação da Akt por mTORC2 e PDK1 [36,42]. Juntas, as fosforilações em Thr308 e Ser473, promovem a atividade máxima da Akt [16].

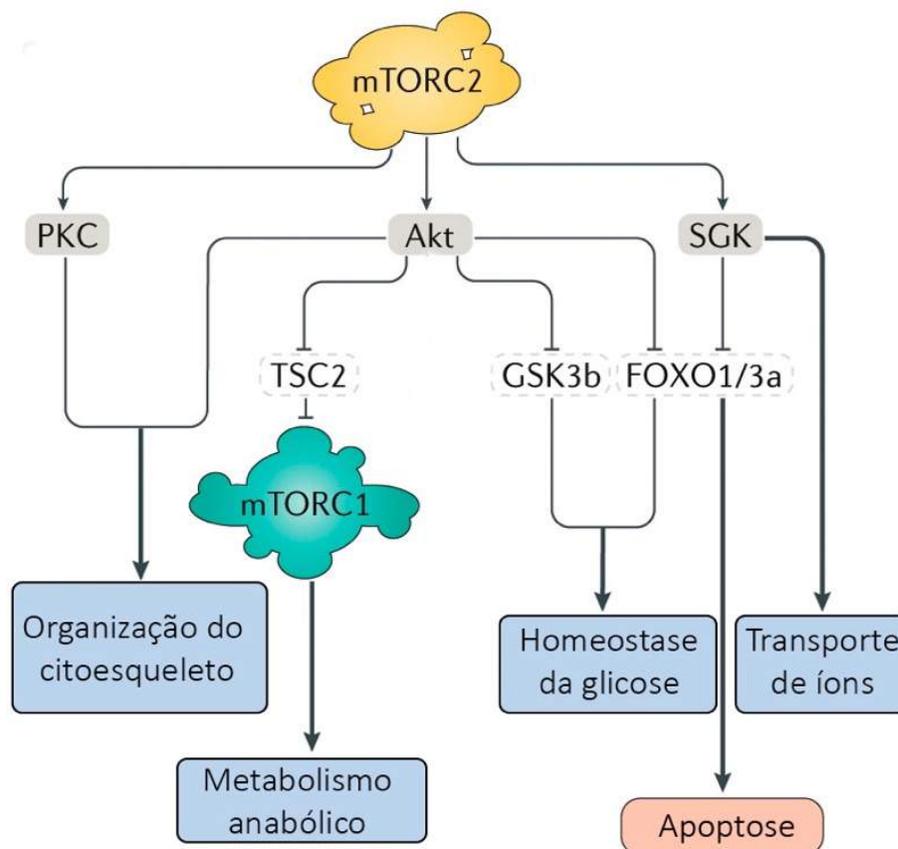


Figura 2. Efeitos e funções de mTORC2. Figura adaptada de [27].

Mecanismos de controle de mTORC2

Ativação por fatores de crescimento

Diferentemente de mTORC1 que pode ser ativada por nutrientes, mTORC2 é ativada principalmente em resposta a fatores de crescimento como a insulina e o IGF-1. A ativação desta via envolve a ativação de receptores com atividade tirosina quinase intrínseca, que catalisam a fosforilação do substrato do receptor da insulina (IRS) em resíduos de tirosina promovendo a ativação alostérica da fosfatidil-inositol 3-quinase (PI3K) [19,30]. Esta enzima catalisa a conversão de fosfatidil-inositol 4,5-bifosfato (PIP2) em fosfatidil-inositol 3,4,5-trifosfato (PIP3) na membrana plasmática promovendo o recrutamento e fosforilação da Akt pela PDK1 e mTORC2. A Akt então ativa mTORC1 pela fosforilação e inibição do complexo TSC1/TSC2, promovendo assim acúmulo de Rheb associado ao GTP na membrana lisossomal, que ativa mTORC1 alostericamente [19,30]. mTORC1 também pode ser ativada por aminoácidos e diidroxiacetona-3-fosfato em situações de disponibilidade energética [15,30].

Devido a sua importante participação no controle de processos como a proliferação e a sobrevivência celular, autofagia, metabolismo, apoptose e função mitocondrial, a atividade inadequada na via PI3K-mTORC2-Akt está associada ao desenvolvimento de um grande espectro de doenças neurodegenerativas, metabólicas, cânceres e no processo de envelhecimento [27,43].

Diversos mecanismos operam com o objetivo de manter a sinalização na via PI3K-mTORC2-Akt-mTORC1 dentro de níveis adequados ao bom funcionamento celular. Dentre eles, o supressor tumoral PTEN (*Phosphatase and tensin homolog*) exerce um papel primordial. PTEN é uma fosfatase de lipídeos e proteínas que atua em oposição à PI3K catalisando a conversão de PIP3 a PIP2, reduzindo assim a atividade na via (Figura 3). Interessantemente, mutações ou modificações epigenéticas que reduzem a atividade de PTEN e assim promovem a ativação constitutiva da via PI3K-mTORC2-Akt-mTORC1 são comumente encontradas em 60% dos tumores [44].

Um outro importante mecanismo de controle da sinalização na via PI3K-mTORC2-Akt-mTORC1 envolve uma alça de retroalimentação negativa catalisada pelos substratos de mTORC1 S6K-1 e a proteína 10 de ligação ao receptor da insulina

(Grb10). Quando ativada por fatores de crescimento e/ou aminoácidos, mTORC1 fosforila e ativa S6K-1 que então fosforila em resíduos de serina e inibe IRS bloqueando sua interação com a PI3K ou promovendo sua degradação (Figura 3) [27]. Já a Grb10 fosforilada inibe a PI3K por mecanismo que envolve sua ligação com resíduos de tirosina fosforilada devido a presença de domínios SH2 (*Src Homology 2*) em sua estrutura [45,46].

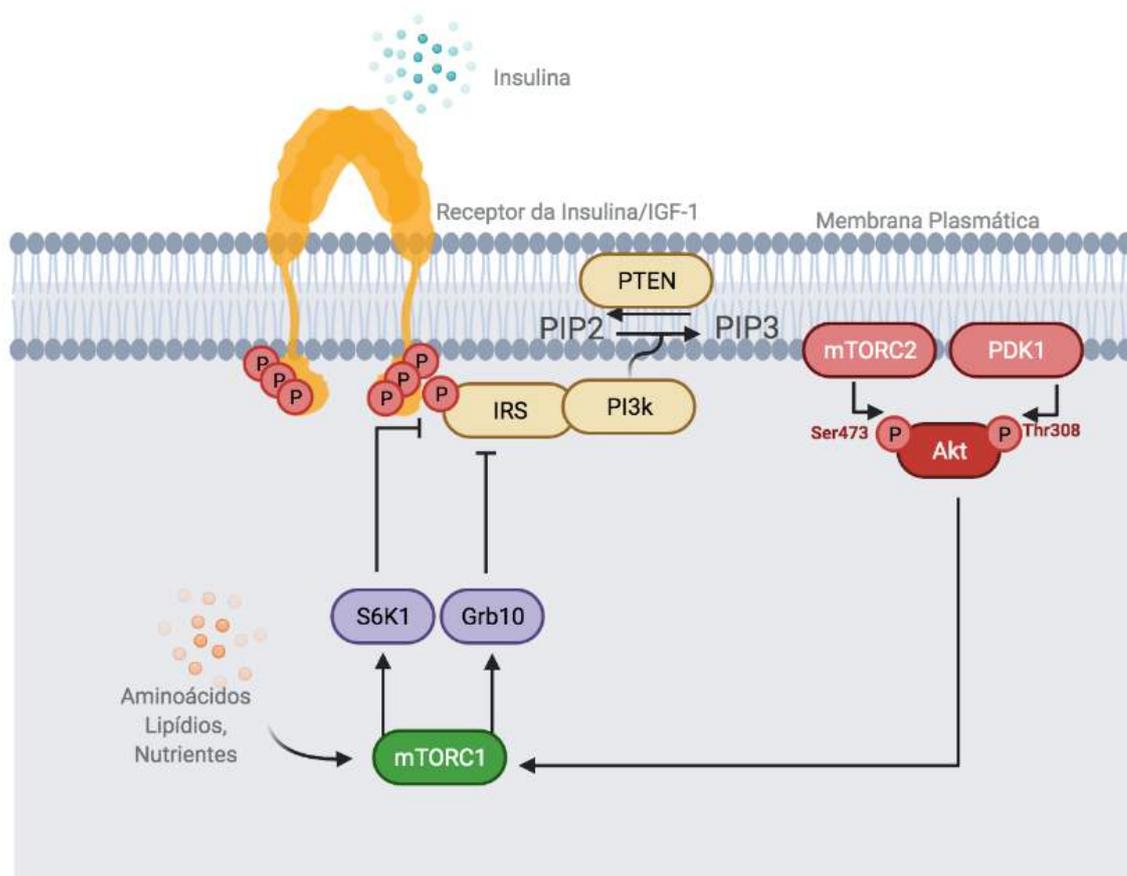


Figura 3. Representação esquemática da via da insulina-PI3K-mTORC2-Akt-mTORC1. Imagem autoral criada na plataforma Biorender.

Ativação de mTORC2 independentemente de fatores de crescimento

Além da insulina e IGF-1, mTORC2 também pode ser ativada por agonistas adrenérgicos em adipócitos marrons e brancos, principalmente após estímulo agudo [47–49]. Esta via parece envolver a ativação de receptores β -adrenérgicos, a formação de AMPc via adenilato ciclase, e a ativação da proteína quinase A (PKA) que fosforila a proteína mTOR em Ser2481 no complexo 2 da mTOR [47,50]. Alguns estudos sugerem que mTORC2 pode estar envolvida na translocação do

transportador de glicose GLUT-1 e aumento da captação de glicose induzida por estímulo adrenérgico em adipócitos marrons [42,49,51,52]. Esta hipótese, entretanto, não foi confirmada em outros estudos, inclusive do mesmo grupo de pesquisa [48,53]. Desta forma, estudos adicionais são necessários para a determinação do envolvimento de mTORC2 como mediador das ações de agonistas β -adrenérgicos em adipócitos marrons e brancos.

Outras moléculas como o ácido fosfatídico, citocinas pró- e anti-inflamatórias ($\text{TNF}\alpha$, $\text{IL1}\beta$, IL-4, IL-13, etc), padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) como o lipopolissacarídeo (LPS), entre outras, também ativam mTORC2 por mecanismos distintos ainda pouco caracterizados [36,54–57]. Finalmente, a proteína quinase ativada por AMP (AMPK), que atua como sensor celular de energia, também ativa mTORC2 [58]. A AMPK é ativada em situações de demanda energética (redução no conteúdo de ATP e aumento no conteúdo de ADP e AMP) e promove processos catabólicos, além de inibir processos anabólicos. AMPK ativa mTORC2 por dois mecanismos: 1. Inibindo mTORC1 e assim reduzindo o *feedback* negativo de mTORC1-S6K1/Grb10 na via da PI3K-mTORC2; 2. Fosforilando diretamente Rictor e mTOR durante o estresse energético [36,58]. Acredita-se que a ativação de mTORC2 pela AMPK seja uma estratégia de aumento da captação de glicose em situações de demanda energética [58]. Entretanto, ainda não se sabe se este mecanismo é ubíquo a todas as células do organismo.

mTOR e Tecido Adiposo

Fatores de crescimento como a insulina e IGF-1 desempenham papel importante no controle da função metabólica e endócrina do tecido adiposo por mecanismos que podem envolver ou não mTORC2. Nos tópicos abaixo, após uma breve introdução à biologia do tecido adiposo, abordaremos os estudos que avaliaram o envolvimento de mTORC2 no controle da função deste tecido, bem como seu envolvimento no desenvolvimento de doenças metabólicas como a obesidade e a resistência à insulina.

Biologia do tecido adiposo

Virtualmente, todos os seres vivos armazenam energia na forma de lipídeos, mas apenas os vertebrados tem células especializadas em armazenar lipídeos: os

adipócitos [59]. Humanos adultos podem armazenar de 130 mil a 1 milhão de kcal de energia na forma de triacilglicerol nos adipócitos, que são as células principais que determinam as funções do tecido adiposo [60]. A visão simplista de que o tecido adiposo apenas estoca energia prevaleceu por muito tempo. Embora o primeiro artigo sobre o tecido adiposo data de 1837 [61], somente em 1994 que essa visão mudou com a descoberta de que esse tecido secreta proteínas com função endócrina que controlam o metabolismo [62]. Hoje, sabemos que o tecido adiposo além de estocar energia, também é altamente sensível à insulina e secreta lipídeos [63], exossomos [64], citocinas inflamatórias [65–68], hormônios peptídeos [69–72] e miRNA [73–75] que atuam de forma autócrina, parácrina e endócrina. O tecido adiposo desempenha uma pletera de funções e hoje é reconhecido como um tecido central na determinação da homeostase energética e metabólica do organismo, e por consequência, a disfunção em algumas de suas funções principais (armazenamento, secreção de adipocinas e sensibilidade à insulina) contribui ao desenvolvimento de doenças metabólicas como a obesidade e a resistência à insulina [76].

O tecido adiposo é um tecido conjuntivo frouxo que pode ser dividido em dois tipos principais: o tecido adiposo branco (TAB) e o marrom (TAM). TAB e TAM são organizados em vários depósitos pelo corpo todo. O TAB pode ser classificado dependendo de sua localização em TAB subcutâneo, quando está presente abaixo da pele, e TAB visceral quando está localizado dentro da cavidade peritoneal ao redor das vísceras. O padrão de distribuição do TAB subcutâneo e visceral no organismo depende de fatores genéticos, hormonais, ambientais, e nutricionais [77]. Evidências obtidas nas últimas décadas indicam que a disfunção do TAB visceral está diretamente associada com o desenvolvimento de doenças metabólicas [78,79]. Em humanos, o acúmulo excessivo de lipídeos no TAB visceral, definido como obesidade visceral, é fator de risco para doenças cardiovasculares e mortalidade [80,81]. Os TAB e TAM são constituídos de diversos tipos celulares que inclui os adipócitos, células endoteliais, células do sistema imune (neutrófilos, macrófagos, linfócitos, entre outras) e células-tronco mesenquimais. Em conjunto, essas células determinam o funcionamento do tecido adiposo [82].

Adipócitos

Até recentemente, acreditava-se que mamíferos possuíam apenas dois tipos de adipócitos: os brancos, componentes principais do TAB que têm como funções principais armazenar energia na forma de triacilglicerol e secretar adipocinas que regulam diversos processos no organismo; e os adipócitos marrons, componentes do TAM, cuja principal função é produzir e liberar na forma de calor a energia obtida da oxidação de lipídeos e carboidratos, um processo denominado como termogênese independente de tremor muscular [83].

O processo de formação de adipócitos maduros a partir de células mesenquimais multipotentes é denominado de adipogênese. E acontece por três principais etapas, o comprometimento da linhagem (*commitment*), expansão clonal e diferenciação terminal [80,82]. A diferenciação terminal de adipócitos é controlada pelo receptor ativador da proliferação peroxissomal γ (PPAR γ) e pela proteína de ligação ao *enhancer* CCAAT (C/EBP α , CCAAT/*enhancer binding protein*), ambos são fatores de transcrição que regulam a expressão de genes envolvidos na captação e estoque de lipídeos [84]. Deleção ou mutações que inativam PPAR γ impedem a formação de novos adipócitos e induz a morte de adipócitos maduros, conduzindo a um quadro de lipodistrofia severa [85]. Os adipócitos se diferenciam a partir de diversas células precursoras que estão sendo identificadas por abordagens de rastreamento de linhagem. O que sabemos atualmente, é que os adipócitos tem uma grande heterogeneidade de precursores, e que a maioria dos adipócitos marrons são provenientes de células progenitoras positivas para o fator miogênico 5 (Myf5+), e que a maioria dos adipócitos brancos são provenientes de progenitores positivos para a proteína fator de crescimento derivado de plaquetas α (PDGFR α +) [77,81].

Geralmente, o adipócito branco apresenta diâmetro de 20 a 240 μm , uma única gotícula de gordura (unilocular) que desloca o núcleo e outras organelas para a periferia da célula e uma baixa densidade mitocondrial, que em conjunto, conferem a esse adipócito uma grande capacidade de armazenamento de energia [80,82] e reduzida capacidade oxidativa [86,87] (Figura 4). O adipócito marrom, em contraste, é pequeno (15-50 μm), tem formato elíptico, apresenta várias gotículas de gordura (multilocular), núcleo relativamente centralizado e é rico em mitocôndrias. O adipócito marrom, diferentemente do branco, é termogênico. A capacidade termogênica deste adipócito é conferida pela presença da proteína desacopladora 1 (UCP-1, *uncoupling*

protein -1) na membrana interna mitocondrial que gera calor ao desviar o gradiente prótons que seria usado na síntese de adenosina trifosfato (ATP) pela ATP-sintase (Figura 4). Esse processo será descrito com mais detalhes a seguir.

Nas últimas décadas também foi identificado e caracterizado um terceiro tipo de adipócito em mamíferos denominado adipócito bege ou *brite* (*brown-like in white*) [88,89]. O adipócito bege é encontrado principalmente em depósitos subcutâneos de gordura branca misturados com os adipócitos brancos. O adipócito bege, dependendo da condição vigente, pode ser unilocular ou multilocular e expressar ou não UCP-1 (Figura 4) [1]. O processo de recrutamento e aumento do número de adipócitos beges ricos em mitocôndrias e UCP-1 nos depósitos de TAB é denominado de *browning* [1,90]. Adipócitos beges podem ser formados a partir de adipócitos brancos maduros por um processo denominado de transdiferenciação [91–93] ou pela diferenciação a partir de um grupo específico de células mesenquimais progenitoras [94]. É importante ressaltar que nos adipócitos beges, diferentemente dos marrons, a maquinaria termogênica somente é expressa sob determinados estímulos, sendo os mais comuns e estudados a exposição crônica ao frio e os tratamentos com agonistas β -adrenérgicos ou ligantes de PPAR γ [1,90] (Figura 4). Recentemente, publicamos uma revisão sobre fatores que induzem o *browning* do tecido adiposo branco e o potencial de geração de calor pelos adipócitos beges [1].

Por fim, em 2014 foi identificado em camundongos fêmeas durante a gravidez e lactação um quarto tipo de adipócito denominado de adipócito rosa. Estudos indicam que esse adipócito surge na glândula mamária por um processo de transdiferenciação de adipócitos brancos maduros. Diferentemente do formato esférico dos adipócitos brancos, os adipócitos rosas apresentam projeções do citoplasma que lhe conferem características de células epiteliais. Além de várias gotículas de gordura, o adipócito rosa também tem a capacidade de produzir e secretar leite. Após o fim da lactação, o adipócito rosa se transdiferencia novamente a adipócitos brancos maduros [93,95].

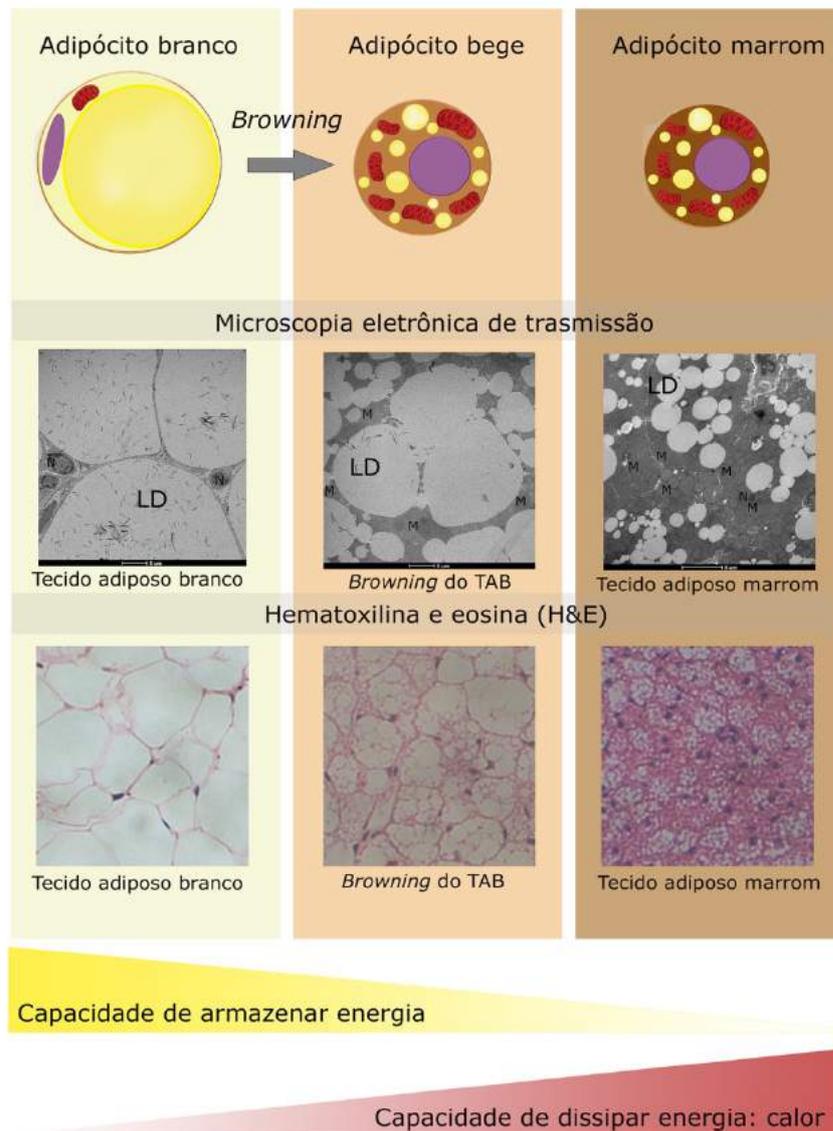


Figura 4. Tipos principais de adipócitos e tecidos adiposos em mamíferos. LD: *lipid droplet*/gotícula de gordura, N: núcleo, M: mitocôndria. Imagem autoral criada na plataforma Biorender.

Metabolismo de lipídeos em adipócitos

Os ácidos graxos são armazenados em gotículas de gordura nos adipócitos brancos, marrons e beges na forma de triacilglicerol (TAG). O TAG é um éster neutro que consiste de uma molécula de glicerol esterificada com três moléculas de ácidos graxos. Os ácidos graxos armazenados nos adipócitos são em sua maioria provenientes da dieta, mas os adipócitos também podem produzir ácidos graxos pelo

processo de lipogênese *de novo* usando como substratos principais a glicose e aminoácidos [96].

Resumidamente, a síntese de ácidos graxos a partir da glicose envolve a conversão desta hexose em piruvato, pela via glicolítica, o qual por sua vez, é direcionado à mitocôndria onde é convertido pela piruvato desidrogenase a acetil-coenzima A (acetil-CoA). O acetil-CoA é condensado com oxaloacetato formando citrato, que quando em excesso, é exportado ao citosol, onde é clivado a acetil-CoA pela ACLY, e carboxilado a malonil-CoA pela ACC. Em seguida o malonil-CoA é convertido pela FAS a palmitato, um ácido graxo de 16 carbonos (C:16). O palmitato pode ser alongado e dessaturado formando uma série de lipídeos. A insulina é a principal ativadora da lipogênese *de novo* em adipócitos por mecanismos que envolvem: 1- aumento da captação de glicose nos adipócitos e assim oferta de carbonos para a síntese de ácidos graxos; e 2. aumento da expressão e atividade das enzimas chaves da lipogênese, via ativação dos fatores de transcrição SREBP-1 e proteína de ligação ao elemento responsivo a carboidratos (ChREBP, *carbohydrate responsive element binding protein*) [97,98].

Os TAGs são sintetizados a partir do glicerol 3-fosfato (G3P) e ácidos graxos. Além dos ácidos graxos produzidos pela lipogênese *de novo*, adipócitos obtêm ácidos graxos da circulação na forma livre associados a albumina ou a partir da hidrólise no endotélio de TAG carregado por quilomícrons ou lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL, *very low density lipoprotein*) pela enzima lipase lipoproteica (LPL, *lipoprotein lipase*). Os ácidos graxos entram nos adipócitos por difusão ou transporte mediado por proteínas como CD36, FATP, FABP e caveolina [99]. No interior dos adipócitos, os ácidos graxos são convertidos a acil-CoA pela acil-CoA sintetase (ACS) e direcionados à síntese de TAG, fosfolipídeos ou outros lipídeos ou à oxidação mitocondrial ou peroxissomal. Já o G3P necessário para a síntese de TAG e fosfolipídeos são provenientes da glicólise curta [100], gliceroneogênese [101] e pela fosforilação direta do glicerol [102]. Na glicólise curta, a G3P-desidrogenase converte a diidroxiacetona-3-fosfato a G3P. Na gliceroneogênese, metabólitos de 3 carbonos como aminoácidos glicogênicos e lactato são convertidos a piruvato, que é convertido na mitocôndria a oxalacetato pela enzima piruvato carboxilase. O oxalacetato então é convertido em malato, deixa a mitocôndria e no citosol é convertido a fosfoenolpiruvato, que pela reversão parcial da via glicolítica é convertido a G3P. A enzima chave da gliceroneogênese é a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK).

Por fim, outra fonte de geração de G3P é pela gliceroquinase (Gyk) que fosforila o glicerol captado da circulação ou reciclado da hidrólise de TAG [103].

A síntese de TAG inicia-se com a acilação dos carbonos 1 e 2 do G3P pelas enzimas glicerol 3-fosfato aciltransferase (GPAT) e 1-acilglicerol 3-fosfato aciltransferase (AGPAT), respectivamente, formando o ácido fosfatídico. Na sequência, a fosfatase do ácido fosfatídico (PAP1), uma enzima também conhecida como lipina, retira o grupamento fosfato do carbono 3 do ácido fosfatídico formando o diacilglicerol. Por fim, o diacilglicerol é acilado no carbono 3 pela diacilglicerol aciltransferase (DGAT) formando TAG [104,105].

Em situações de demanda energética, como no jejum, exercício e exposição ao frio [106], o TAG estocado nos adipócitos pode ser hidrolisado a ácidos graxos e glicerol, e então liberados para a circulação para servirem como substratos para outros tecidos. A hidrólise de TAG em glicerol e ácidos graxos acontece por reações enzimáticas sequenciais denominadas em conjunto de lipólise. Inicialmente, o TAG é hidrolisado a DAG pela lipase de triacilglicerol do adipócito (ATGL, *adipose triglyceride lipase*), liberando o primeiro ácido graxo e formando diacilglicerol, que é hidrolisado a monoacilglicerol (MAG) pela lipase sensível a hormônio (HSL, *hormone-sensitive lipase*), liberando outro ácido graxo e formando monoacilglicerol que é hidrolisado pela lipase de monoacilglicerol (MGL) liberando glicerol e o último ácido graxo. Os ácidos graxos e glicerol provenientes da lipólise podem ser reesterificados em TAG ou liberados para a circulação. A lipólise é estimulada por uma série de hormônios, como catecolaminas, peptídeo atrial natriurético e hormônio do crescimento [107,108]. No jejum, por exemplo, catecolaminas ativam a lipólise via PKA que então fosforila a HSL e a perilipina, uma proteína da membrana das gotículas de gordura, que em conjunto aceleram e permitem a hidrólise enzimática de TAG. Em contrapartida, a insulina é o principal inibidor da lipólise. A insulina tem ações antilipolíticas ao ativar a fosfodiesterase 3B, que por sua vez, reduz a atividade de PKA por reduzir o conteúdo intracelular de 3',5'-adenosina-monofosfato-cíclico (AMPc) [104,108].

Metabolismo da glicose em adipócitos

Após a alimentação há o aumento da glicemia que conseqüentemente estimula a secreção de insulina pelo pâncreas. A insulina aumenta de 2 a 10 vezes a captação de glicose em adipócitos pela ativação da translocação para a membrana do GLUT-4 via PI3K-mTORC2-Akt. No estado basal, aproximadamente 99% do GLUT-4 está armazenado em vesículas, e após o estímulo pela insulina, o GLUT-4 é translocado à membrana plasmática, estimulando a captação de glicose [109]. A insulina também estimula a transcrição de RNAm de GLUTs [110]. Após o fim do estímulo pela insulina, os GLUTs são rapidamente internalizados, reduzindo assim a captação de glicose [111]. Os destinos metabólicos da glicose no adipócito estimulado pela insulina são a conversão a glicerol 3P, a via glicolítica com a geração de piruvato e lactato, a síntese de ácidos graxos e total oxidação a CO₂, ou até mesmo a conversão a glicogênio [99]. Aproximadamente 20% da glicose pós-prandial é captada pelos tecidos adiposos, desse total, apenas 5% da glicose captada por adipócitos é armazenada como glicogênio, enquanto que 50% é armazenada como TAG [112]. Portanto, o tecido adiposo tem uma importante participação na manutenção da glicemia que pode ser evidenciada em estudos envolvendo a deleção de GLUT-4 [111] ou Rictor/mTORC2 [113,114] especificamente em adipócitos. Nesses estudos, foi encontrado prejuízo na homeostase da glicose, hiperinsulinemia e resistência à insulina no fígado, sugerindo uma importante comunicação entre tecido adiposo, fígado e pâncreas.

Termogênese independente de tremor muscular

Mamíferos euterianos (mamíferos placentários) produzem calor quando expostos a temperaturas abaixo da termoneutralidade pelos processos de tremor muscular (*shivering*, pequenas contrações musculares descoordenadas, rápidas e repetidas) e termogênese independente de tremor muscular nos adipócitos marrons e beges. A ativação destes processos está associada ao aumento do gasto energético e da demanda energética (alimentação e/ou oxidação de substratos estocados) [115,116].

Mecanicamente, a termogênese independente de tremor muscular é estimulada principalmente pelo sistema nervoso simpático via inervação direta do TAM e TAB [117]. A norepinefrina liberada por neurônios simpáticos ativa o receptor β₃-adrenérgico (β₃-AR) acoplado à proteína Gs estimulatória, conduzindo ao aumento

de AMPc e ativação da PKA. A PKA fosforila uma série de proteínas como a HSL e a perilipina, promovendo a lipólise. Os ácidos graxos produzidos pela lipólise ativam a UCP-1 na mitocôndria que dissipa o gradiente de prótons liberando energia na forma de calor. Além da HSL, a PKA também fosforila a p38-MAPK (p38 *mitogen-activated protein kinase*) e proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc (CREB) aumentando a transcrição gênica de UCP-1 [97,116,118]. Concomitantemente com a ativação da produção de calor pelo TAM, a ativação adrenérgica também promove um aumento na captação e oxidação de glicose e ácidos graxos pelos adipócitos marrons e beges (Figura 5).

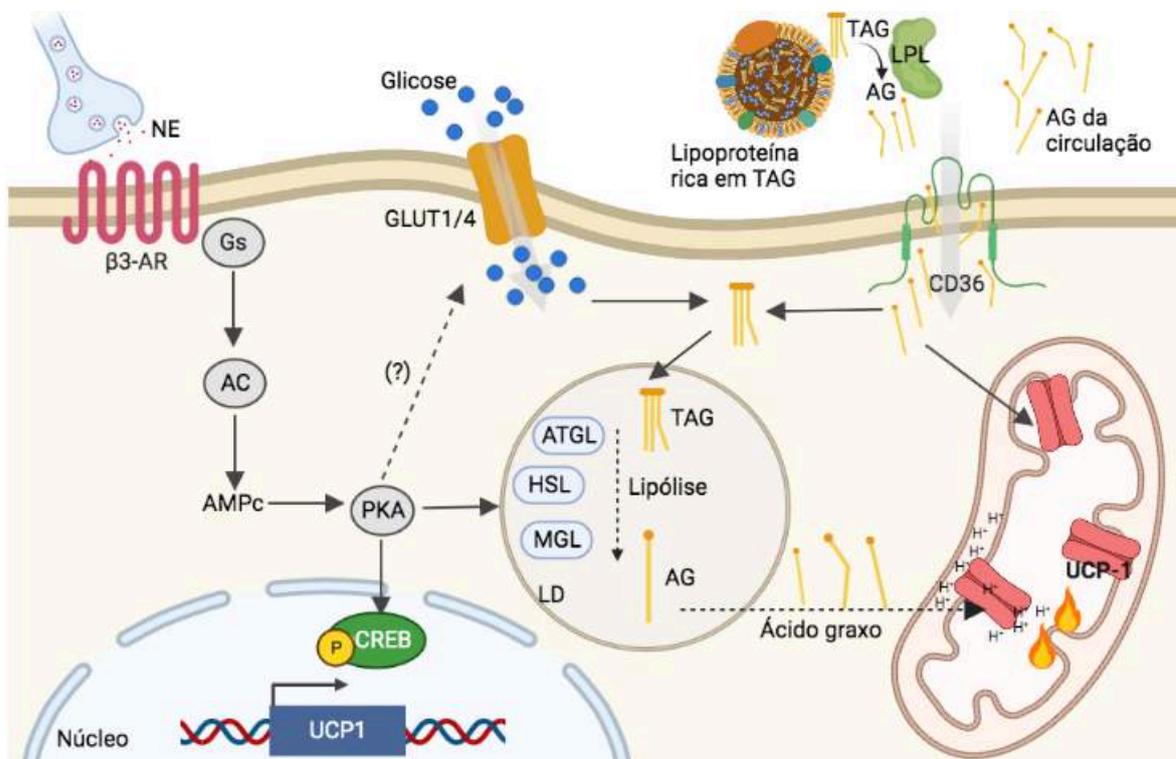


Figura 5. Via canônica de ativação da termogênese independente de tremor muscular em adipócitos marrons e beges. Imagem autoral criada na plataforma Biorender.

A oxidação de glicose e ácidos graxos gera as coenzimas reduzidas flavina adenina dinucleotídeo (FADH₂) e nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) que carregam elétrons que são utilizados pelos complexos mitocondriais para bombear prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas, criando assim, um gradiente de prótons. Este gradiente de prótons mitocondrial, na maioria das células, é usado como força motriz para a geração de ATP pela proteína ATP sintase [119]. Nos adipócitos marrons e beges, a UCP-1 ativada promove, por mecanismos ainda

em debate, o transporte de prótons do espaço intermembranas para a matriz mitocondrial. A energia potencial do gradiente de prótons nesse caso é dissipada na forma de calor pelo transporte de prótons pela UCP-1, sem a geração de ATP. Dizemos, portanto, que a ativação da UCP-1 promove o desacoplamento do gradiente de prótons da geração de ATP [116,120,121] (Figura 6). Estudos recentes, indicam que na ausência de lipólise intracelular nos adipócitos marrons e beges, a lipólise nos adipócitos brancos pode, por mecanismo compensatório gerar os ácidos graxos livres que serão captados pelos adipócitos marrons ou beges e então ativar a termogênese mediada pela UCP-1 [122,123]. Curiosamente, camundongos com deleção de UCP-1 conseguem sobreviver ao frio [119], sugerindo a existência de mecanismos alternativos não canônicos de geração de calor, como o ciclo fútil de creatina [124], e o ciclo de cálcio dependente de ATP mediado pela Ca²⁺-ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA)[125,126].

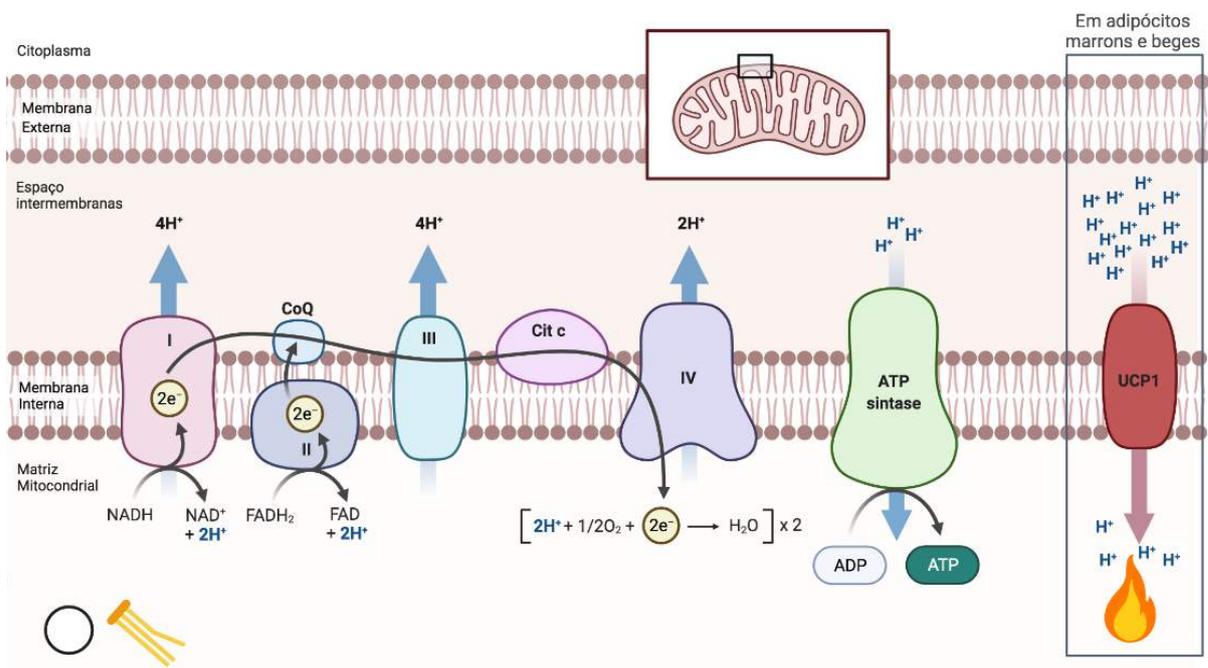


Figura 6. Representação de dissipação do gradiente de prótons (H⁺) pela UCP-1 em adipócitos marrons e beges com geração de calor. Imagem autoral criada na plataforma Biorender.

Metabolismo do TAM ativado

O TAM quando ativo pode aumentar a taxa metabólica basal em aproximadamente 60% em ratos [127] e até 5% em humanos, o que pode promover em um ano a perda de mais de 4 kg de gordura [80]. Esse aumento substancial da taxa metabólica basal pela termogênese do TAM é sustentado pelo maior aporte de ácidos graxos para o tecido via aumento do *clearance* de lipídeos circulantes transportados por lipoproteínas catalisado pela enzima LPL, bem como, pelo aumento do transporte de ácidos graxos via CD36 e FATP1 (Figura 5) [116]. Em paralelo ao maior aporte de ácidos graxos circulantes, ocorre também no TAM estimulado o aumento da lipogênese *de novo*. Além dos ácidos graxos, a captação de glicose também está substancialmente aumentada no TAM ativado [116]. Durante o frio, há aumento do conteúdo dos transportadores de GLUT-1 e GLUT-4 na membrana celular. Um estudo prévio sugere que mTORC2 promove a captação de glicose induzida por estímulos adrenérgicos por induzir a translocação de GLUT-1 à membrana plasmática de adipócitos marrons (Figura 5) [49]. Todos os possíveis destinos metabólicos da glicose que incluem a conversão a lactato, oxidação a CO₂, síntese de glicerol 3-fosfato e ácidos graxos e a formação de agentes redutores (NADPH) pela via das pentoses estão aumentados no TAM de animais expostos ao frio [47,116]. O aumento de todas essas vias metabólicas sustenta a geração do gradiente de prótons mitocondrial necessário na geração de calor pela UCP-1 (Figura 5-6).

Em 2009, foi identificado pela técnica de tomografia computadorizada de emissão de pósitrons (PET) com fluoro-deoxiglicose associado à tomografia computadorizada que humanos adultos saudáveis tem TAM ativo [128], e que a massa do TAM em adultos é inversamente relacionada com doenças metabólicas [129]. Esses achados quebraram o paradigma de que apenas humanos neonatos tem TAM [119]. Visto a capacidade do TAM ativado de utilizar ácidos graxos e glicose, diversos estudos [128–133] têm sugerido uma possível utilização da termogênese adaptativa como forma de atenuar o ganho de massa corporal, mas também reduzir a hipertrigliceridemia e hiperglicemia, sendo essas duas últimas, características de dislipidemias e do diabetes, respectivamente. Estes estudos renovaram o interesse no estudo do TAM, e sua possível implicação no tratamento de doenças metabólicas.

Plasticidade e disfunção do tecido adiposo

Os tecidos adiposos são extremamente plásticos alterando sua massa de acordo com o balanço energético do organismo [82,93]. Períodos de balanço energético negativo como jejum e a restrição calórica reduzem, enquanto períodos de balanço energético positivo aumentam a adiposidade. Estas alterações de adiposidade ocorrem como resultado de mudanças no diâmetro (hipotrofia/hipertrofia) e número de adipócitos (hipoplasia/hiperplasia) do tecido adiposo [82]. Aumento excessivo da adiposidade corporal pode levar ao desenvolvimento da obesidade.

A obesidade é uma doença metabólica decorrente do acúmulo exacerbado de gordura nos tecidos adiposos. A obesidade é uma doença em crescente expansão independente da população, idade, sexo ou classe social [134]. No Brasil, aproximadamente 60% da população adulta apresenta sobrepeso (índice de massa corpórea [IMC] ≥ 25 kg/m²) e 20% obesidade (IMC ≥ 30 kg/m²). A obesidade, principalmente a visceral, está associada com o desenvolvimento de diversas doenças altamente prevalentes como a resistência à insulina e diabetes tipo 2, esteatose hepática, doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer.

Apesar da divergência sobre a contribuição da deriva genética [135] ou da seleção de genes econômicos [136] como possíveis fatores genéticos determinantes da predisposição à obesidade, há consenso de que fatores ambientais recentes da história humana, como as mudanças no padrão de vida pós-revolução industrial foram importantes na aceleração da expansão da obesidade. Basicamente, os fatores comportamentais da sociedade moderna que promovem a obesidade são a redução do gasto energético decorrentes da migração da vida no campo para a cidade associada com trabalhos que demandam pouca atividade, bem como o aumento da inatividade física e a maior ingestão de alimentos energeticamente densos e altamente palatáveis [60,134].

O gasto energético e o consumo energético são componentes do balanço energético. O balanço energético segue as leis da termodinâmica, em que a energia não pode ser criada nem destruída, mas pode mudar de uma forma à outra. O balanço energético é categorizado em 1. Positivo: em que a ingestão energética é maior que o gasto energético, e, portanto, a energia ingerida em excesso é armazenada no

organismo, com conseqüentemente aumentando a massa corporal; 2. Negativo: em que o gasto energético é maior que a ingestão energética e, portanto, ocorre redução da massa corporal; e 3. Balanço energético estacionário: em que o gasto e ingestão energéticos são iguais, e, portanto, a massa corporal mantém-se inalterada ao longo do tempo [137,138]. Assim, a obesidade, claramente, como mencionado anteriormente, é o resultado de períodos crônicos de balanço energético positivo, que conduz ao acúmulo de energia na forma de triacilglicerol majoritariamente no tecido adiposo. Em paralelo ao aumento da massa corporal, indivíduos portadores de obesidade, curiosamente, também tem em média maior gasto energético do que pessoas magras, sugerindo que a ingestão energética é o principal componente do balanço energético no desenvolvimento da obesidade [137].

Além da obesidade há outras patologias do tecido adiposo não diretamente associadas ao balanço energético, como é o caso da lipodistrofia, em que há a perda e/ou distribuição anormal dos tecidos adiposos, e que é majoritariamente de etiologia genética ou farmacológica [139]. Na lipodistrofia, a ineficiência de armazenamento de energia nos tecidos adiposos conduz, paradoxalmente, a distúrbios metabólicos como resistência insulínica, diabetes e inflamação assim como os encontrados na obesidade [140].

Participação de mTORC2 na biologia do tecido adiposo

Diversos estudos avaliaram o envolvimento de mTORC2 no controle do metabolismo e atividade secretória do TAM e TAB, principalmente por meio de deleção de Rictor em adipócitos via sistema Cre-loxP. Os dois primeiros estudos realizaram a deleção de Rictor em adipócitos utilizando aP2/FABP4-Cre em dois diferentes *backgrounds* genéticos. Esses estudos encontraram que camundongos com deleção de Rictor apresentavam esteatose hepática e aumento da massa dos tecidos magros (fígado, músculos, rins e pâncreas), efeitos que foram creditados ao aumento circulante de IGF-1 [114,141]. Diferenças importantes, entretanto, foram reportadas pelos grupos em relação ao impacto da deleção de Rictor via aP2/FABP4-Cre na homeostase da glicose. Enquanto o grupo do Professor Michael Hall encontrou que deleção de Rictor aumenta a sensibilidade à insulina e a tolerância à glicose sem alterar a captação de glicose basal e estimulada por insulina em adipócitos [113], o

grupo do Professor Thurl Harris encontrou que a deleção de Rictor promove intolerância à glicose, redução da captação de glicose basal e estimulada por insulina, e redução do efeito inibitório da insulina sobre a lipólise no TAB [142]. Importante ressaltar que quando estes estudos foram realizados acreditava-se que o promotor aP2/FABP4 promovia a expressão de Cre recombinase especificamente em adipócitos, o que foi refutado posteriormente por diversos estudos que mostraram que esse promotor é ativo em vários tipos celulares como neurônios, células endoteliais, miócitos, entre outros [143–145].

Utilizando o promotor da adiponectina para expressar a Cre recombinase, que é específico de adipócitos, o grupo do Professor Guertin demonstrou que camundongos com deleção de Rictor nessas células alimentados com dieta padrão (*chow*) são hiperinsulinêmicos e resistentes à insulina, mas não apresentam alterações de adiposidade apesar de reduzida lipogênese *de novo* no TAB [146]. Também demonstraram que adipócitos brancos primários com deleção de Rictor tem menor captação de glicose basal e estimulada por insulina, o que *in vivo* é associada a menor conteúdo de RNAm de GLUT-4 no TAB, além de maior lipólise basal, mas sem alteração na lipólise estimulada por isoproterenol [146]. Nesse mesmo estudo, os camundongos foram desafiados com dieta rica em gordura. A deleção de Rictor em adipócitos reduziu os ganhos de massa corporal e adiposa, mas exacerbou a resistência à insulina induzida pela dieta [146]. Em outro estudo do mesmo grupo, camundongos com deleção de Rictor em adipócitos foram infectados com *M. tuberculosis*, o agente causador da tuberculose. Nesse estudo, foi encontrado que a deleção de Rictor em adipócitos reduz a inflamação e conteúdo de macrófagos, monócitos, células dendríticas e células T no TAB, além de reduzir a expressão de RNAm fator de necrose tumoral α (TNF- α). Em oposição a estes achados, o grupo do Professor Michael Hall demonstrou que camundongos com deleção de Rictor em adipócitos também via adiponectina-Cre apresentam elevada inflamação do tecido adiposo epididimal caracterizada pelo acúmulo de macrófagos pró-inflamatórios M1 e aumento de TNF- α após ingestão de dieta rica em gordura [65]. Estudo do nosso grupo usando os mesmos camundongos alimentados com dieta hiperlipídica, entretanto, não confirmou estes achados [147].

Alguns estudos também investigaram a participação de Rictor no tecido adiposo marrom e termogênese. Camundongos com deleção de Rictor em células que expressam Myf5⁺ (miócitos e adipócitos marrons, principalmente) tem redução da

massa do TAM e aumento da expressão de UCP-1 e da capacidade oxidativa, sugerindo que a inibição de mTORC2 estimula a termogênese do TAM após exposição ao frio [148]. Posteriormente, foi demonstrado que a deleção de Rictor/mTORC2 em células que expressam UCP-1 (UCP-1-Cre) aumenta a expressão de UCP-1, a termogênese e o catabolismo lipídico por mecanismos independentes da Akt, envolvendo o eixo SIRT6-FoxO1 [53]. Em oposição a estes dados, camundongos com deleção de Rictor via aP2-Cre, apresentaram hipotermia severa e reduzida captação de glicose no TAM após exposição aguda ao frio, efeitos que foram atribuídos à reduzida atividade da Akt e hexoquinase 2 [40].

Como pode ser evidenciado pelos estudos detalhados acima existem diversas controvérsias sobre o verdadeiro papel biológico de mTORC2 no controle do metabolismo, captação de glicose e função dos adipócitos brancos, marrons e beges. Desta forma, na presente tese de doutorado, utilizando o modelo de deleção de Rictor via adiponectina-Cre, nós investigamos o envolvimento de mTORC2 em adipócitos como possível mediador do aumento na capacidade termogênica, captação de glicose no tecido adiposo e melhora na homeostase da glicose induzidos pela aclimação ao frio por 14 dias (Capítulo II), tratamento com o agonista de PPAR γ pioglitazona (Capítulo III), e ingestão de dieta hiperlipídica rica em ácidos graxos ômega 3 (Capítulo IV).

Capítulo II

A deficiência específica de mTORC2 em adipócitos reduz a capacidade termogênica do tecido adiposo marrom e branco inguinal sem afetar a captação de glicose e o gasto energético de camundongos aclimatados ao frio

Esse capítulo está em processo de revisão por pares:

Adipocyte-specific mTORC2 deficiency impairs BAT and iWAT thermogenic capacity without affecting glucose uptake and energy expenditure in cold-acclimated mice.
Érique Castro, Thayna Vieira, Tiago Oliveira, Milene Ortiz-Silva, Maynara Andrade, Caroline Tomazelli, Albert Peixoto, Cleyton Sobrinho, Mayara Moreno, Gustavo Gilio, Rafael Junges Moreira, Raphael Guimarães, Luiz Perandini, Patricia Chimin, Patricia Reckziegel, Eduardo Moretti, Alexandre Steiner, Mathieu Laplante e William Festuccia. *American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism*. 2021.
Em revisão.

Adipocyte-specific mTORC2 deficiency impairs BAT and iWAT thermogenic capacity without affecting glucose uptake and whole-body energy expenditure in cold-acclimated mice

Érique Castro¹, Thayna S. Vieira¹, Tiago E. Oliveira¹, Milene Ortiz-Silva¹, Maynara L. Andrade¹, Caroline A. Tomazelli¹, Albert S. Peixoto¹, Cleyton R. Sobrinho¹, Mayara F. Moreno¹, Gustavo R. Gilio¹, Rafael J. Moreira¹, Raphael C. Guimarães¹, Luiz A. Perandini¹, Patricia Chimin², Patricia Reckziegel³, Eduardo H. Moretti⁴, Alexandre A. Steiner⁴, Mathieu Laplante^{5,6}, William T. Festuccia^{1*}.

¹Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil, 05508000.

²Department of Physical Education, Physical Education and Sports Center, Londrina State University, Parana, Brazil, 86057-970.

³Department of Pharmacology, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Sao Paulo, Brazil, 04044-020.

⁴Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Sao Paulo, Brazil, 05508000.

⁵Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Queb–c - Université Laval, 2725 Chemin Sainte-Foy, Quebec, QC, Canada, G1V 4G5.

⁶Centre de recherche sur le cancer de l'Université Laval, Université Laval, 9 rue McMahon, Québec, QC, Canada, G1R 3S3

ABBREVIATIONS: ACC, acetyl CoA carboxylase; ACLY, ATP citrate lyase; A-RicKO, Rictor^{Lox/Lox} *adiponectin-cre*^{+/-}; A-RicWT, Rictor^{Lox/Lox} *adiponectin-cre*^{-/-}; AUC, area under the curve; BAT, brown adipose tissue; CCND1, cyclin 1D; DRP-1, dynamin-related protein-1; *ChREBP*, carbohydrate-responsive element-binding protein; CL, β -3 adrenergic agonist CL-316,243; D2, iodothyronine deiodinase 2; DTNB, 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid); ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; EMG, electromyography; eWAT, epididymal white adipose tissue; FAS, fatty acid synthase; FGF-21, fibroblast growth factor 21; FoxO1, forkhead box protein O1; GLUT-1, glucose transporter 1; GLUT-4, glucose transporter 4; GRB10, growth factor receptor-bound protein 10; ITT, insulin tolerance test; iWAT, inguinal white adipose tissue; KITT, blood glucose disappearance rate; KRB, Krebs-Ringer bicarbonate buffer; L-OPA-1, long isoform of dynamin-like 120 kDA protein; LPL, lipoprotein lipase; mTORC1, mechanistic target of rapamycin complex 1; mTORC2, mechanistic target of rapamycin complex 2; NEFA, nonesterified fatty acids; NDUFB8, NADH dehydrogenase ubiquinone 1 beta subcomplex subunit 8; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; PPAR γ 2, peroxisome proliferator receptor gamma 2; PRDM16, PR-domain containing 16; PTT, pyruvate tolerance test; RER, respiratory exchange rate; Rictor, rapamycin insensitive companion of mTOR; S6K-1, S6 kinase 1; SDHB, succinate dehydrogenase ubiquinone iron-sulfur subunit; SIRT-6, NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-6; *SREBP*, *Sterol regulatory element-binding proteins*; UCP-1, uncoupling protein 1; UQCRC2, ubiquinol-cytochrome C reductase core protein.

INTRODUCTION

Mammals exposed to temperatures below thermoneutrality maintain their body temperature constant (homeothermy) by activating heat-generating shivering and nonshivering thermogenesis, as well as by reducing heat dissipation to the environment through peripheral vasoconstriction and postural changes. Brown adipose tissue (BAT), the major site for nonshivering thermogenesis in mammals, generates heat through the uncoupling and dissipation of proton gradient at the inner mitochondrial membrane mediated by the uncoupling protein 1 (UCP-1). In addition to BAT, UCP-1 expressing adipocytes denominated as beige or brite (brown in white) are found embedded in white adipose tissue (WAT) of mammals especially in subcutaneous fat depots. These cells have a different origin than brown adipocytes, show important thermogenic activity *in vitro*, but their contribution to homeothermy and whole-body energy expenditure *in vivo* is still a matter of debate [1,149–152].

UCP-1-mediated thermogenesis is mainly activated by norepinephrine released from tissue sympathetic innervation through a cascade of events involving activation of β -adrenergic receptors, protein kinase A and lipolysis [116]. Lipolysis-derived fatty acids directly activate UCP-1 and act as the main metabolic substrate oxidized for heat production in brown and beige adipocytes [116]. Along with thermogenesis, sympathetic activation increases BAT glucose uptake mainly through glucose transporter 1 (GLUT-1), fuelling carbons to processes required for proper thermogenesis such as glycolysis, glycerol 3-phosphate and fatty acid synthesis, and the pentose phosphate pathway [116].

In addition to heat production, sympathetic innervation also regulates BAT and beige adipocyte thermogenic capacity. Indeed, chronic periods of sympathetic activation, as seen in mice acclimated to cold, for instance, increase brown and beige adipocytes number, mitochondrial mass and contents of UCP-1 and other important thermogenic proteins. The intracellular signaling events triggering this process known as recruitment are not completely defined yet. Previous studies have shown that the growth factor and nutrient sensor mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1) is an important mediator of sympathetically-induced brown and beige adipocyte recruitment [153–155]. mTORC1 is a multiprotein complex containing the serine/threonine kinase mTOR as the catalytic center that promotes anabolic processes such as protein, lipid and nucleotide syntheses and inhibits autophagy.

Indeed, mTORC1 not only is activated in brown and beige adipocytes of mice treated with β -3 adrenergic receptor ligand and exposed to cold either acutely (24 h) or chronically (14 days), but also mediates the brown and beige adipocyte recruitment (increase in cell number, mitochondrial mass, UCP-1 content and thermogenic machinery) induced in these conditions [153–155].

In contrast to mTORC1, few studies have evaluated whether mTORC2 is involved in brown and beige adipocytes recruitment and thermogenesis. mTORC2 is mainly activated by growth factors via phosphoinositide 3-kinase (PI3K) and exerts its anabolic actions through the phosphorylation of Akt at Ser473, among other substrates. mTORC2 is activated in brown and beige adipocytes upon norepinephrine treatment and acute, but not chronic cold exposure [40,153]. Interestingly, mice with deletion of mTORC2 essential component rapamycin insensitive companion of mTOR (Rictor) induced by a Cre recombinase under the control of α P2/FABP4 promoter displayed impaired thermoregulation, BAT glucose uptake and glycolysis upon acute cold exposure [40]. Such impaired thermoregulation upon acute cold, though, was not seen in mice bearing Rictor deletion in brown and beige adipocytes induced by a Cre recombinase under the control of UCP-1 promoter [53,144], indicating that it may be due to the broad, non-adipocyte specific α P2/FABP4 promoter activity [53,144,145]. Indeed, the α P2/FABP4 promoter was shown to drive Cre activity in ganglia of the peripheral nervous system, in adrenal medulla and in neurons throughout the central nervous system, among other tissues and cell types [144,145].

To further expand knowledge on mTORC2 involvement in brown and beige adipocyte signaling, metabolism and thermogenesis, mice with Rictor deletion and therefore mTORC2 deficiency exclusively in adipocytes (adiponectin-Cre) were acclimated to cold (10°C, 14 days) and evaluated for BAT and inguinal white adipose tissue (iWAT) recruitment, glucose uptake and thermogenesis and whole-body energy expenditure. Our main findings indicate that mTORC2 is required for the recruitment and full expansion of BAT and iWAT UCP-1 content and thermogenic capacity induced by cold acclimation.

MATERIAL AND METHODS

Mice

Animal experimental procedures were approved by the Animal Care Committee of the Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (#098/2010 and 115/2016). All mice were on a C57BL/6J background. Mice with rapamycin insensitive companion of mTOR (Rictor) deletion in adipocytes (A-RicKO) and control littermates (A-RicWT) were produced as previously described using Rictor^{Lox/Lox} (rictor^{tm1.1Klg/SjmJ}) and *adiponectin-cre* mice (B6;FVB-Tg(Adipoq-cre)1Evdv/J) [147]. Mice genotypes were determined by PCR analysis of tail genomic DNA. Male 8-weeks old A-RicKO and A-RicWT mice were kept at thermoneutrality ($30 \pm 1^\circ\text{C}$) for 14 days and either euthanized or acclimated to cold ($10 \pm 1^\circ\text{C}$) for 14 days in an environmental chamber (NQ1 model, Environmental Growth Chamber, Chagrin Falls, OH) on a 12:12 h light-dark cycle with food and water *ad libitum*. After this period, mice were anesthetized with isoflurane and euthanized (13:00 h) by exsanguination after 5 h of food deprivation. Body weight and food intake were measured weekly. Mice lean mass was evaluated by nuclear magnetic resonance in a Bruker minispec LF.

Whole-body indirect calorimetry and thermometry

Indirect calorimetry was performed after either 24 h or 9-11 days of acclimation at 30°C and 10°C . Mice were adapted the day before indirect calorimetry in metabolic cages housed inside an environmental chamber (NQ1 model, Environmental Growth Chamber, Chagrin Falls, OH) and evaluated for oxygen consumption (VO_2), carbon dioxide production (CO_2), and respiratory exchange ratio (RER, VCO_2/VO_2 ratio) during 24 h by flow-through respirometry (Sable Systems, Las Vegas, NV) as described [156]. Rectal temperature was measured in awake mice using a thermocouple (Sable Systems, Las Vegas, NV).

Thermogenic capacity

After 14 days of cold acclimation at 10°C , mice were anesthetized with isoflurane and placed on heat pad warmed at 37°C for the insertion of a temperature transmitter (model TA-F10; Data Sciences International, MN, USA) in the peritoneal cavity. Abdominal wall was sutured and the skin closed with surgical glue (Dermabond Topical Skin Adhesive; Johnson & Johnson, Sao Paulo, Brazil). After surgery, mice

were treated with antibiotic (enrofloxacin 5 mg/ kg, s.c.) and analgesic (Ketoprofen 5 mg/ kg, s.c.), allowed to recover for 24 h at 30°C, and subsequently transferred to 10°C for 7 days. For the evaluation of thermogenic capacity, mice were transferred to 30°C at 09:00 h and food restricted. After 3 h (12:00 h), mice were intraperitoneally injected with the beta-3 adrenergic agonist CL-316,243 (1 mg/ kg) and evaluated for body temperature. Data were acquired in the Dataquest ART software and core temperature was recorded every 10s.

Electromyogram (EMG)

After 14 days of cold acclimation at 10°C, mice were briefly anesthetized with isoflurane for insertion of coated fine stainless steel wires electrodes transcutaneously to acquire EMG signal from the scapular muscle as previously described [40]. After recovery from anesthesia, mice returned to environmental chamber at 10°C, and the EMG was recorded for 20 min. The signal was processed (30- to 300-Hz band-pass filter) and digitalized by Power lab system (ADInstrument) using the Labchart software. Data were exported and analyzed offline by Spike2 version 7 software where the integrated activity was obtained after rectification and smoothing ($\tau = 0.01$ s) of the original signal. The analysis of the EMG data was performed in continuous segments of 30 s in the absence of locomotor activity.

Insulin tolerance test (ITT)

Mice deprived of food for 5 h were intraperitoneally injected with insulin (0.5 U/ kg of body weight). Tail blood glycemia was determined before and 5, 10, 15, 20 and 30 min after insulin injection using an automated glucometer (OneTouch Select Plus Johnson & Johnson). Blood glucose disappearance rate (kITT, % glucose/ min) was calculated as described [157].

Pyruvate tolerance test (PTT)

Mice deprived of food for 5 h were intraperitoneally injected with sodium pyruvate (2 g/ kg body weight). Tail blood glycemia was determined before and 15, 30, 45, 60 and 90 min after pyruvate injection using an automated glucometer (OneTouch Select Plus Johnson & Johnson). Area under (AUC) was calculated as glucose mg/dL x 90 min.

Serum parameters

Serum insulin, adiponectin and fibroblast growth factor 21 (FGF-21) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits following manufacturer's instructions (Millipore, MA, USA). Serum glycerol (Sigma), nonesterified fatty acids (NEFA, WAKO) and creatine kinase (Labtest, Brazil) were measured using colorimetric kits.

Lipolysis

Lipolysis was evaluated in BAT and inguinal white adipose tissue (iWAT) explants as previously described [158]. Briefly, BAT and iWAT explants were excised and washed at 37°C for 10 min in Krebs-Ringer bicarbonate buffer (KRB in mM): 118 NaCl, 4.8 KCl, 1.25 CaCl₂, 1.2 KH₂PO₄, 1.2 MgSO₄, 25 NaHCO₃, and 5.5 glucose supplemented with 2% fatty acid-free bovine serum albumin, pH 7.4. After this period, explants were transferred to a new tube with fresh KRB buffer for 1 h at 37°C under continuous shaking. Lipolysis was evaluated at either basal conditions or upon the presence of 5 µM norepinephrine. Medium glycerol was measured with free glycerol colorimetric kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Lipolysis is presented as rates of glycerol release per mg of protein per hour.

Histological analysis

BAT and iWAT were fixed in 4% formaldehyde and embedded in paraffin, cross-sectioned (5 µm), deparaffinized and stained with hematoxylin-eosin. BAT was evaluated by number of nuclei per field and iWAT was evaluated by adipocyte diameter using ImageJ (NIH, USA) and percentage of multilocular adipocytes by counting the number of multilocular adipocytes per field.

Electronic microscopy

BAT pieces were fixed with 2% glutaraldehyde for 2 h, transferred to 1% osmium tetroxide for 2 h and to 0.5% uranyl acetate overnight. After dehydration and resin embedding, ultra-thin sections (90 nm) were stained and analyzed in JEOL 1010 transmission electron microscope.

Citrate synthase activity

iWAT was homogenized in 50 mM phosphate buffer and centrifuged at 13,000 rpm for 10 min. The supernatant was incubated with 0.1 M Tris–HCl, 500 μ M oxaloacetate, 200 μ M 5,5'-dithiobis(2- nitrobenzoic acid) (DTNB), 100 μ M acetyl-CoA and 0.1% Triton-X for 5 min at 30°C. DTNB reduction was followed at 412 nm.

In vivo glucose uptake

BAT and iWAT glucose uptake were measured as previously described (10). Briefly, A-RicWT and A-RicKO mice were food deprived for 5 h and intraperitoneally injected with 3 μ Ci [U-³H]2-deoxy-D-glucose (PerkinElmer, MA, USA) in phosphate-buffered saline. After 1 h, mice were anesthetized with isoflurane and killed for BAT and iWAT harvesting. BAT and iWAT were processed for measurement of labeled 2-deoxy-D-glucose uptake as described [159].

Western blotting

iWAT and BAT were homogenized and analyzed for protein content as previously described [21]. Primary antibodies detailed in Table 2 were diluted 1:1000 in Tris Buffered Saline with Tween 20 and 5% milk. Membranes were incubated with peroxidase-conjugated secondary antibody (1:5000) and developed with ECL enhanced chemiluminescence substrate (GE Healthcare). Total BAT and iWAT UCP-1 content were evaluated in cold-acclimated mice by running samples from both tissues in the same gel and correcting the densitometry values to total tissue protein concentration. Because of its higher UCP-1 content, BAT samples were loaded in a lower protein concentration than iWAT to avoid saturation of the densitometry signal.

Table 2. Primary antibodies used in Western Blotting

Primary antibody	Catalog number	Manufacturer
α -Tubulin	2125	Cell Signaling
Akt	4685	Cell Signaling
DRP-1	AB184247	Abcam
GLUT-1	07-1401	Millipore
GLUT-4	07-1404	Millipore
OPA-1	ab119685	Abcam
OXPPOS cocktail	ab110413	Abcam
PARKIN	4211	Cell Signaling
pSer473 Akt	9271	Cell Signaling
pSer240/244 S6	5364	Cell Signaling

Rictor	2114	Cell Signaling
S6	2217	Cell Signaling
UCP-1	14670	Cell Signaling

RNA extraction and quantitative PCR analysis

RNA extraction was performed as described previously (31). Analysis of real-time PCR data was performed using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Data are expressed as the ratio between the expression of the target gene and the housekeeping gene 36B4, the expression of which was not significantly affected by treatments. Primers used and annealing temperatures were previously described [21,160].

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm SEM. Student's t test or Two-way ANOVA followed by Tukey post-hoc test were performed to analyze the independent and interactive effects of Rictor deletion with two levels (A-RicWT, A-RicKO) and cold acclimation with two levels (thermoneutrality, cold) using GraphPad Prism version 8.0.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California USA). The significance level was set at $P \leq 0.05$.

RESULTS

As illustrated in Figure 7, Rictor deletion in adipocytes (A-RicKO) resulted in a marked reduction in mTORC2 catalyzed Akt phosphorylation at Ser473 in both BAT and iWAT (Fig. 7A-B and D-E). Interestingly, cold acclimation also reduced Akt phosphorylation in A-RicWT BAT and iWAT to levels that were still higher than those found in A-RicKO mice. In addition, cold acclimation similarly increased the content of phosphorylated (S240/244) S6 in BAT (Fig. 7A and C) of both A-RicWT and A-RicKO mice, indicating that mTORC2 is not required for cold-induced mTORC1 activation in this tissue. Because cold acclimation increased iWAT total S6 content in A-RicWT, but not A-RicKO mice, iWAT phosphorylated S6 content is presented as a ratio to total S6. Indeed, cold acclimation increased phosphorylated to total S6 ratio in A-RicKO, but not A-RicWT mice (Fig. 7D and F), suggesting that cold increases iWAT mTORC1 activity only in the absence of Rictor/mTORC2. Noteworthy, with exception of iWAT

phosphorylated S6, expressing phosphorylated protein content as a ratio to total protein does not alter the interpretation of findings and conclusions. No changes in body weight and food intake were seen between A-RicWT and A-RicKO mice at either thermoneutral conditions or upon cold acclimation (Fig. 7G and H). Despite the unaltered body weight, cold acclimation did not affect BAT, reduced iWAT and increased liver and lean masses in A-RicWT mice (Fig. 7I-L). A-RicKO mice, on the other hand, displayed reduced iWAT, but no changes in BAT, liver and lean masses at thermoneutral conditions. Upon cold acclimation, A-RicKO mice featured reduced BAT, unaltered iWAT, increased liver and unchanged lean masses (Fig. 7I-L). Histological analysis of BAT indicated that cold acclimation increased the number of nuclei per field in A-RicWT mice, which is indicative of reduced brown adipocyte lipid deposition and diameter (Fig. 7M-N). Along with morphological changes, cold acclimation significantly increased BAT relative (per mg of tissue) and total (per tissue) protein contents, as well as mRNA levels of the proliferation markers Ki67 and cyclin D1 (CCND1) in A-RicWT mice (Fig. 7O-R). Interestingly, at thermoneutral conditions, adipocyte Rictor deletion increased BAT number of nuclei per field, without affecting relative and total protein contents and Ki67 and CCND1 mRNA levels (Fig. 7M-R). Upon cold acclimation, however, adipocyte Rictor deletion further increased BAT number of nuclei per field and relative protein content, but markedly attenuated the increases in total protein content and Ki67 and CCND1 mRNA levels (Fig. 7M-R). Similarly to BAT, cold acclimation and Rictor deletion independently reduced iWAT adipocyte diameter, without, however, additive effects between them (Fig. 7S and U). Despite the similar reduction in mass, cold acclimated A-RicKO mice displayed a reduced iWAT number of multilocular adipocytes in comparison to A-RicWT (Fig. 7V), as can be seen in tissue H/E staining (Fig. 7S) and electronic microscopy (Fig. 7T). Along with morphological changes, cold acclimation significantly increased iWAT relative and total protein contents in A-RicWT mice, such effects that were attenuated by adipocyte Rictor deletion (Fig. 7W and X). Adipocyte Rictor deletion did not affect iWAT relative and total protein contents at thermoneutral conditions. Furthermore, iWAT Ki67 and CCND1 mRNA levels were not modulated by cold acclimation and/or Rictor deletion (Fig. 7Y and Z). Altogether these findings indicate that the reduced BAT mass found in cold acclimated A-RicKO mice results from a reduction in brown adipocyte lipid storage and number, while the reduction in iWAT mass is mainly due to a reduction in adipocyte diameter.

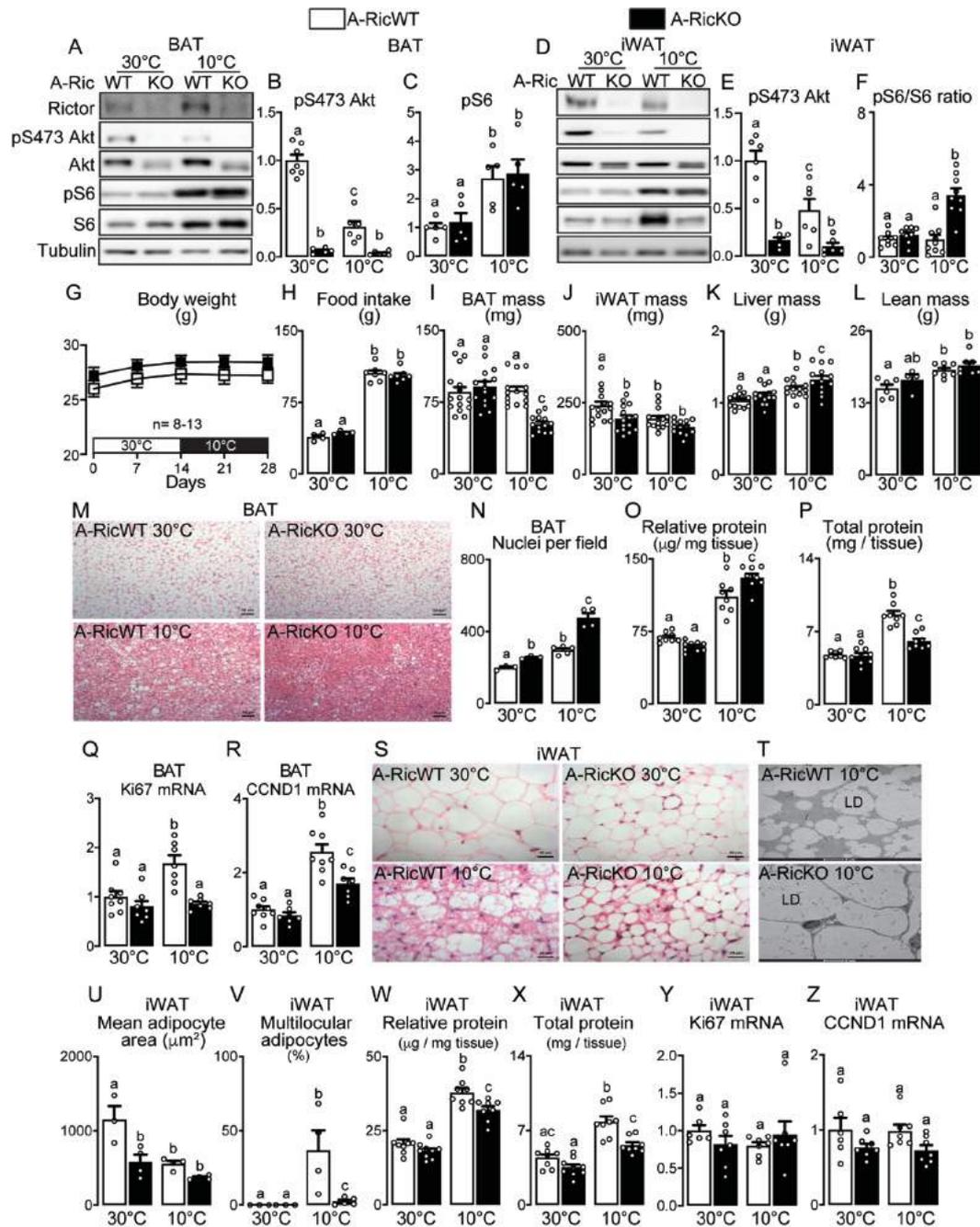


Figure 7. Adipocyte mTORC2 deficiency reduces BAT mass and total protein content in cold acclimated mice. Male A-RicKO and A-RicWT mice were either kept at thermoneutrality ($30 \pm 1^\circ\text{C}$) or acclimated to cold ($10 \pm 1^\circ\text{C}$) for 14 days and evaluated for brown adipose tissue (BAT, A-C) and inguinal white adipose tissue (iWAT, D-F) signaling, body weight (G), food intake (H), BAT (I), iWAT (J), liver (K) and lean (L) masses and BAT H/E staining (M), nuclei per field (N), relative (O) and total (P) protein contents and Ki67 (Q) and CCND1 (R) mRNA levels and iWAT H/E staining (S), electron microscopy (T), mean adipocyte area (U), multilocular adipocytes (V), relative (W) and total (X) protein contents and Ki67 (Y) and CCND1 (Z) mRNA levels. Values are expressed as mean \pm SEM. Numbers inside or above bars represent mice number per group. Means not sharing a common superscript are significantly different from each other, $p \leq 0.05$.

Next, we searched for metabolic processes that may underlie those changes in BAT and iWAT morphology. As illustrated in Figure 8A and B, cold acclimation significantly increased serum levels of glycerol and NEFA in A-RicWT, but not A-RicKO mice. Conversely, cold acclimation similarly increased basal and norepinephrine-stimulated lipolysis in BAT of both A-RicWT and A-RicKO mice (Fig. 8C). Importantly, confirming previous studies [103,161–163], cold acclimation increased BAT mRNA levels of glycerol kinase (GyK, Fig. 8D), an enzyme that phosphorylates glycerol to glycerol-3P recycling it for triacylglycerol synthesis. This increase in BAT GyK mRNA levels, which was of higher magnitude in A-RicKO than A-RicWT (Fig. 8D), may lead to an underestimation of lipolysis rates in cold-acclimated mice. Interestingly, an identical pattern of modulation, i.e., an increase of higher magnitude in cold acclimated A-RicKO than A-RicWT, was found for type 2 iodothyronine deiodinase (D2) (Fig. 8E) that catalyzes the local deiodination of T4 to T3. This similar response pattern may be due the fact that both D2 and GyK are mainly regulated in BAT by the sympathetic nervous system (6,11, 20). In addition to lipolysis, we also evaluated the expression of genes involved in BAT fatty acid uptake and *de novo* synthesis. As illustrated in Figure 8F-H, cold acclimation significantly increased BAT mRNA levels of the chylomicron and VLDL-triacylglycerol lipase lipoprotein lipase (LPL), the membrane fatty acid transporter CD36, and the master regulator of adipogenesis and lipid storage in adipocytes peroxisome proliferator activated receptor γ (PPAR γ) in both A-RicWT and A-RicKO mice. Specifically, for LPL and CD36, this cold-induced upregulation was of higher magnitude in A-RicKO than A-RicWT (Fig. 8F and G). Cold acclimation also upregulated BAT mRNA levels of enzymes involved in *de novo* fatty acid synthesis ATP citrate lyase (ACLY), acetyl CoA carboxylase (ACC) and fatty acid synthase in A-RicWT mice (Fig. 8I-K). Adipocyte Rictor deletion attenuated the increase in ACLY, abolished the upregulation of ACC, but did not affect the increase in FAS induced by cold acclimation. The same variables were also evaluated in iWAT. As illustrated in Fig. 8L, cold acclimation did not affect basal, but significantly increased norepinephrine-stimulated lipolysis in iWAT, such an effect that was of higher magnitude in A-RicKO than A-RicWT mice. In contrast to lipolysis, cold acclimation similarly increased iWAT GyK and D2 mRNA levels in both A-RicWT and A-RicKO mice (Fig. 8M and N). A different pattern of modulation, though, was seen for genes related to fatty acid uptake and *de novo* synthesis. Indeed, cold acclimation significantly increased iWAT mRNA levels of LPL, CD36, PPAR γ 2, ACLY, ACC and

FAS in A-RicWT mice, such effects that were either markedly attenuated or abolished in A-RicKO mice (Fig. 8O-T). Similarly to genes related to fatty acid storage and synthesis, serum levels of adiponectin were significantly increased by cold acclimation in A-RicWT, but not A-RicKO mice (Fig. 8U). Altogether, these findings indicate that adipocyte Rictor deletion impairs cold-induced expression of genes involved in *de novo* fatty acid synthesis in BAT, while it exacerbates adrenergic-stimulated lipolysis and impairs cold-induced expression of genes related to fatty acid uptake and *de novo* synthesis in iWAT.

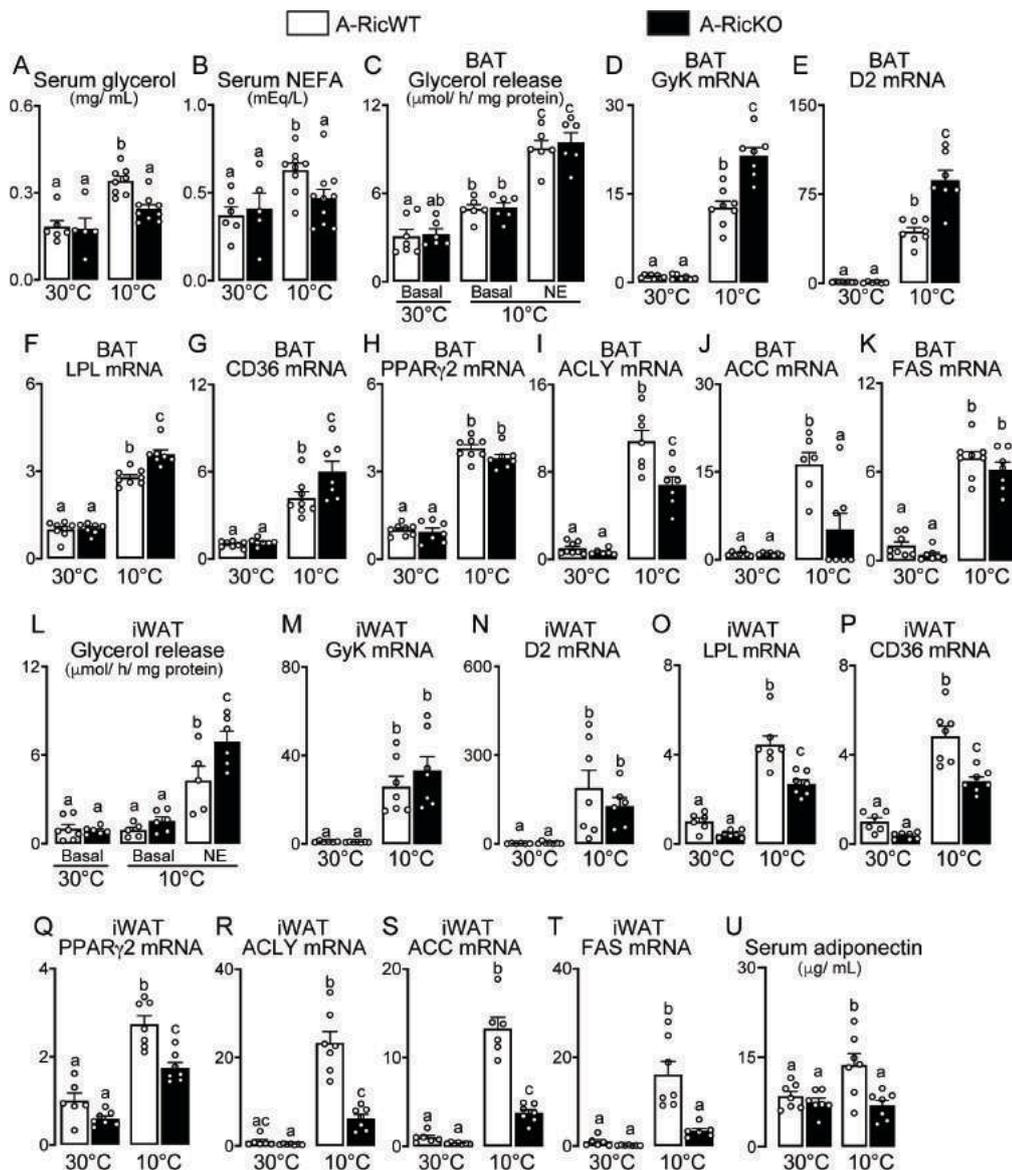


Figure 8. Adipocyte mTORC2 deficiency attenuates cold-induced increased in mRNA levels of proteins involved in *de novo* fatty acid synthesis in BAT and iWAT and exacerbates adrenergically-stimulated lipolysis in iWAT. Male A-RicKO and A-RicWT mice were either kept at thermoneutrality ($30 \pm 1^\circ\text{C}$) or acclimated to cold ($10 \pm 1^\circ\text{C}$) for 14 days and evaluated serum glycerol (A) and NEFA (B) levels, brown adipose tissue (BAT) lipolysis (C) and mRNA levels GyK (D), D2 (E), LPL (F), CD36 (G),

PPAR γ 2 (H), ACLY (I), ACC (J) and FAS (K) and inguinal white adipose tissue (iWAT) lipolysis (L), and mRNA levels GyK (M), D2 (N), LPL (O), CD36 (P), PPAR γ 2 (Q), ACLY (R), ACC (S) and FAS (T) and serum adiponectin levels (U). Values are expressed as mean \pm SEM. Numbers inside or above bars represent mice number per group. Means not sharing a common superscript are significantly different from each other, $p \leq 0.05$.

Next, we investigated whether adipocyte Rictor deletion affects glucose homeostasis. As depicted in Figure 9, cold acclimation similarly increased in both A-RicWT and A-RicKO BAT *in vivo* glucose uptake expressed either per tissue (Fig. 9A), to reflect whole-organ contribution to glucose homeostasis, or per mg of protein, (Fig. 9B) to exclude the influence of changes in tissue mass. Importantly, this cold-induced increase in BAT glucose uptake rates was associated with a marked upregulation in the protein content of glucose transporter (GLUT)-1 and GLUT-4 in both A-RicWT and A-RicKO mice (Fig. 9C-E). In iWAT, however, although cold acclimation also significantly increased glucose uptake expressed either per tissue or per mg of protein (Fig. 9F and G, respectively), this, in contrast to BAT, was not associated with changes in GLUT-1 and GLUT-4 protein content in both A-RicWT and A-RicKO mice (Fig. 9H-J). In spite of the similar rates of glucose uptake per tissue, fasting serum insulin levels were reduced by cold acclimation in A-RicWT, but not A-RicKO mice (Fig. 9K). Also, there were no differences in fasting insulinemia between A-RicWT and A-RicKO mice at thermoneutral conditions. Along with the reduction in fasting insulin, cold acclimation significantly increased insulin tolerance in A-RicWT, but not A-RicKO mice (Figure 9L and M). Adipocyte Rictor deletion did not significantly affect insulin tolerance in mice at thermoneutral conditions. We also indirectly evaluated the contribution of hepatic glucose production via gluconeogenesis to glucose homeostasis by performing a pyruvate tolerance test. As depicted in Figure 9N and O, A-RicKO mice at both thermoneutral and cold conditions displayed increased glycemia in response to pyruvate administration suggesting increased rates of hepatic glucose production through gluconeogenesis. These findings indicate that mTORC2 is not a required mediator of the cold-induced increase in BAT and iWAT glucose uptake. Furthermore, the marked increase BAT and iWAT glucose uptake and clearance by cold acclimation did not counteract the insulin intolerance induced by adipocyte mTORC2 deficiency.

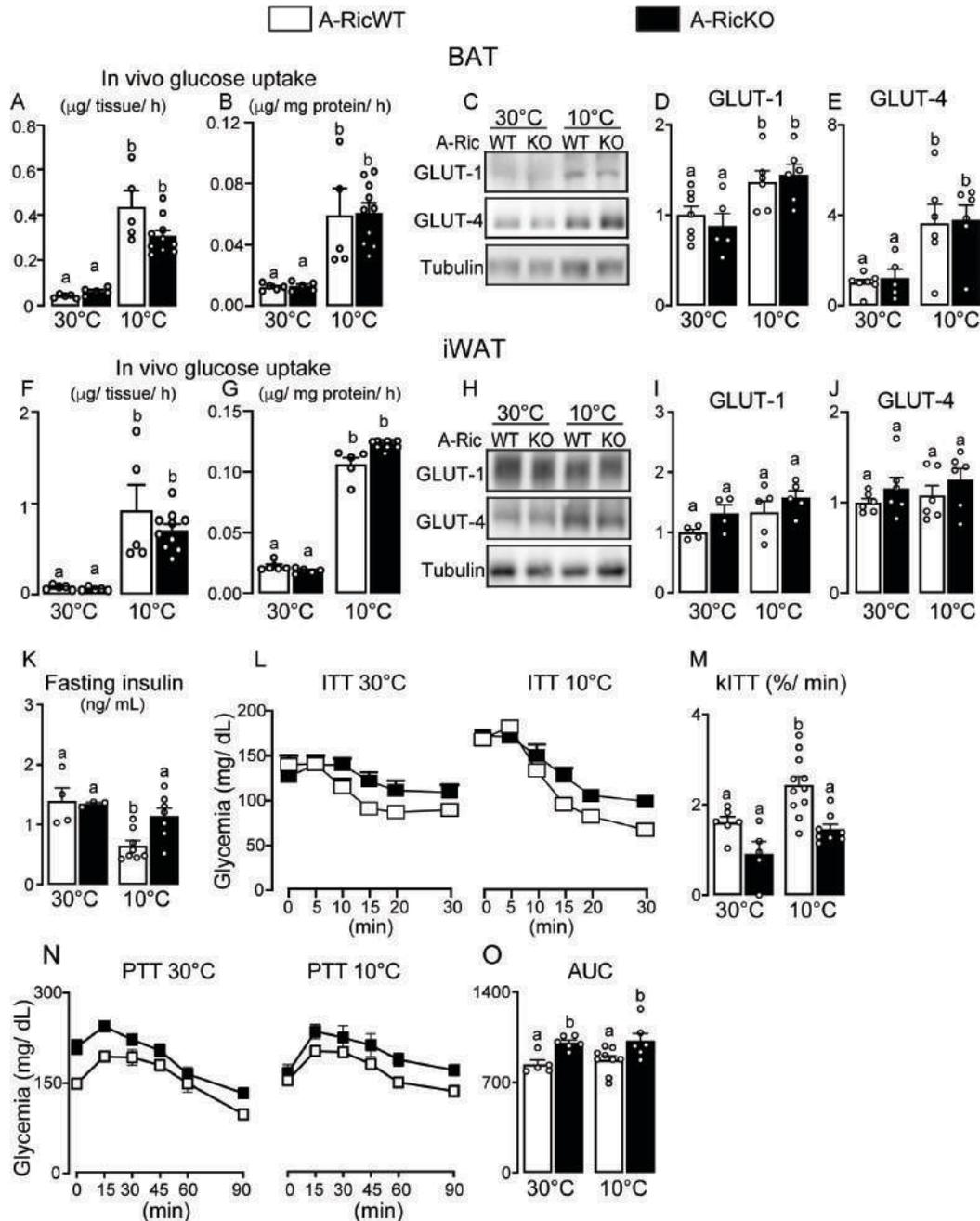


Figure 9. Adipocyte mTORC2 deficiency does not affect cold-induced increase in BAT and iWAT glucose uptake, but impairs insulin tolerance. Male A-RicKO and A-RicWT mice were either kept at thermoneutrality ($30 \pm 1^\circ\text{C}$) or acclimated to cold ($10 \pm 1^\circ\text{C}$) for 14 days and evaluated for brown adipose tissue (BAT) in vivo glucose uptake expressed per total tissue (A) or per mg of protein (B) and glucose transporter 1 (GLUT-1, C and D) and GLUT-4 (C and E) contents and inguinal white adipose tissue (iWAT) in vivo glucose uptake expressed per total tissue (F) or per mg of protein (G), and GLUT-1 (I) and GLUT-4 (J) contents, fasting insulin levels (K), insulin tolerance (ITT, L), kITT (M), pyruvate tolerance (PTT, N) and PTT area under the curve (AUC, O). Values are expressed as mean \pm SEM. Numbers inside or above bars represent mice number per group. Means not sharing a common superscript are significantly different from each other, $p \leq 0.05$.

We next evaluated whether adipocyte Rictor deletion affects BAT content of mitochondrial proteins related to thermogenesis, respiration, fusion and fission. Cold acclimation equally increased UCP-1 (Fig. 10A and B) and reduced mitochondrial complexes III (UQCRC2, Fig. 10E) and V (ATP5A, Fig. 10F), and long isoform of dynamin-like 120 kDa protein (L-OPA-1, Fig. 10H) protein contents in BAT of both A-RicWT and A-RicKO mice. Cold acclimation also reduced BAT protein content of mitophagy related E3 ubiquitin ligase PARKIN in A-RicWT, an effect that was abrogated in A-RicKO mice (Fig. 10I). No changes were seen in BAT protein content of respiratory complexes I (NDUFB8) and II (SDHB) and dynamin-related protein-1 (DRP-1) involved in mitochondrial fission (Fig. 10C, D and G, respectively), as well as in mitochondria morphology evaluated by electronic microscopy (Fig. 10J).

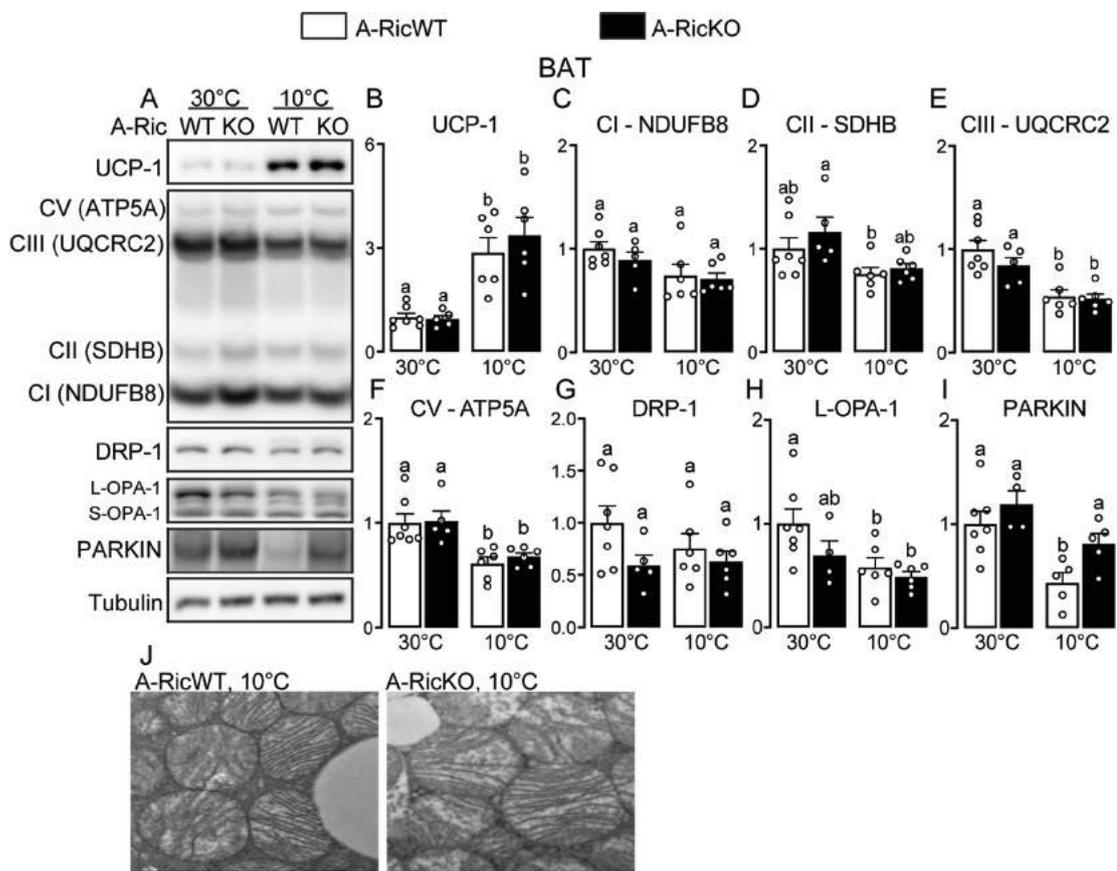


Figure 10. Adipocyte mTORC2 deficiency does not affect cold induced increase in BAT UCP-1 content. Male A-RicKO and A-RicWT mice were either kept at thermoneutrality ($30 \pm 1^\circ\text{C}$) or acclimated to cold ($10 \pm 1^\circ\text{C}$) for 14 days and evaluated for brown adipose tissue (BAT) protein content of uncoupling protein 1 (UCP-1, A and B), and content of respiratory complexes proteins NDUFB8 (A and C), SDHB (A and D), UQCRC2 (A and E) and ATP5A (A and F), and mitochondrial fission DRP-1 (A and G) and fusion L-OPA-1 (A and H) and mitophagy PARKIN (A and I) and mitochondria morphology (J). Values are expressed as mean \pm SEM. Numbers inside or above bars represent mice number per group. Means not sharing a common superscript are significantly different from each other, $p \leq 0.05$.

A similar analysis of mitochondria-related proteins was performed in iWAT (Figure 11). Cold acclimation significantly increased iWAT protein contents of UCP-1, mitochondrial complexes I, II, III and V and DRP-1 in association with mRNA levels of PR-domain containing 16 (PRDM16) in A-RicWT, effects that were partially attenuated by adipocyte Rictor deletion (Fig. 11A-H). Furthermore, cold acclimation reduced iWAT content of L-OPA-1 and PARKIN in A-RicWT, effects that were attenuated by adipocyte Rictor deletion (Fig. 11I and J). Contents of both L-OPA-1 and PARKIN were increased by adipocyte Rictor deletion in mice kept at thermoneutrality. Finally, cold acclimation significantly increased the surrogate marker of mitochondrial mass namely citrate synthase activity in A-RicWT iWAT, such an effect that was partially attenuated by adipocyte Rictor deletion (Fig. 11K).

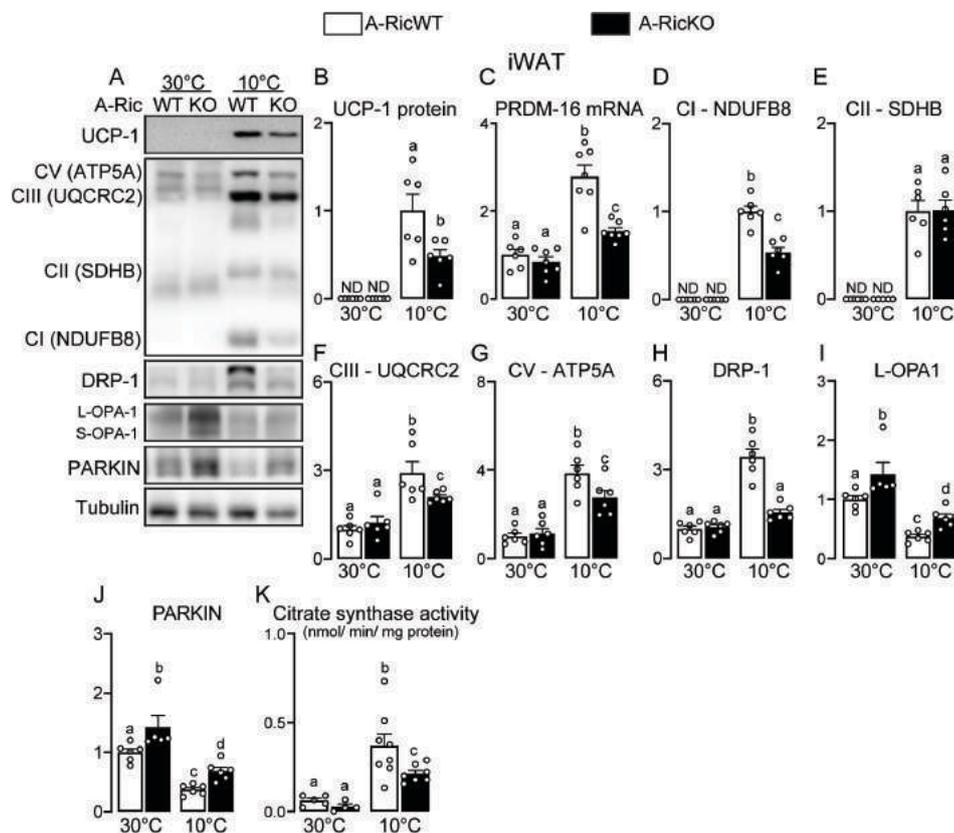


Figure 11. Adipocyte mTORC2 deficiency attenuates cold-induced iWAT browning and increase in mitochondria mass. Male A-RicKO and A-RicWT mice were either kept at thermoneutrality ($30 \pm 1^\circ\text{C}$) or acclimated to cold ($10 \pm 1^\circ\text{C}$) for 14 days and evaluated for inguinal white adipose tissue (iWAT) content of uncoupling protein 1 (UCP-1, A and B), mRNA level of PRDM16 (C) and content of respiratory complexes proteins NDUFB8 (A and D), SDHB (A and E), UQCRC2 (A and F) and ATP5A (A and G), and mitochondrial fission DRP-1 (A and H) and fusion L-OPA-1 (A and I) and mitophagy PARKIN (A and J), mitochondrial mass (citrate synthase, K). Values are expressed as mean \pm SEM. Numbers inside or above bars represent mice number per group. Means not sharing a common superscript are significantly different from each other, $p \leq 0.05$.

In an attempt to specifically test whether adipocyte Rictor deletion affects UCP-1 mediated nonshivering thermogenesis, we evaluated the thermogenic capacity of cold-acclimated A-RicWT and A-RicKO by measuring body temperature in response to a single injection of the beta-3 adrenergic receptor agonist CL-316,243 (CL) at 30°C. As depicted in Figure 12A, CL administration markedly increased A-RicWT, but not A-RicKO body temperature at thermoneutral conditions. Along with impaired response to CL, cold acclimated A-RicKO mice also featured reduced BAT and iWAT total UCP-1 content and therefore thermogenic capacity when compared to A-RicWT mice (Fig. 12B). Next we investigated the impact of the reduced BAT and iWAT thermogenic capacities displayed by cold-acclimated A-RicKO on mice energy expenditure. As illustrated in Figure 12C-E, there were no significant differences in the rates of oxygen consumption or respiratory exchange rate (RER) or rectal temperature between A-RicWT and A-RicKO kept at thermoneutrality or acclimated to cold for 14 days. Subsequently, we tested the possibility that, in contrast to cold acclimation, adipocyte Rictor deletion may impact mice energy expenditure upon acute periods of cold exposure. As illustrated in Figure 12F and G, A-RicWT and A-RicKO food deprived and exposed to cold (10°C) for 5 h displayed similar rates of oxygen consumption and rectal temperature. Finally, we tested whether skeletal muscle shivering was compensating for the reduced UCP-1-mediated nonshivering thermogenesis in cold acclimated A-RicKO mice. As depicted in Figure 12H-K, cold acclimated A-RicKO mice displayed increased serum levels of creatine kinase, enhanced scapular muscle electromyographic (EMG) activity and increased serum levels of fibroblast growth factor 21 (FGF-21), all indicatives of a compensatory activation of muscle shivering.

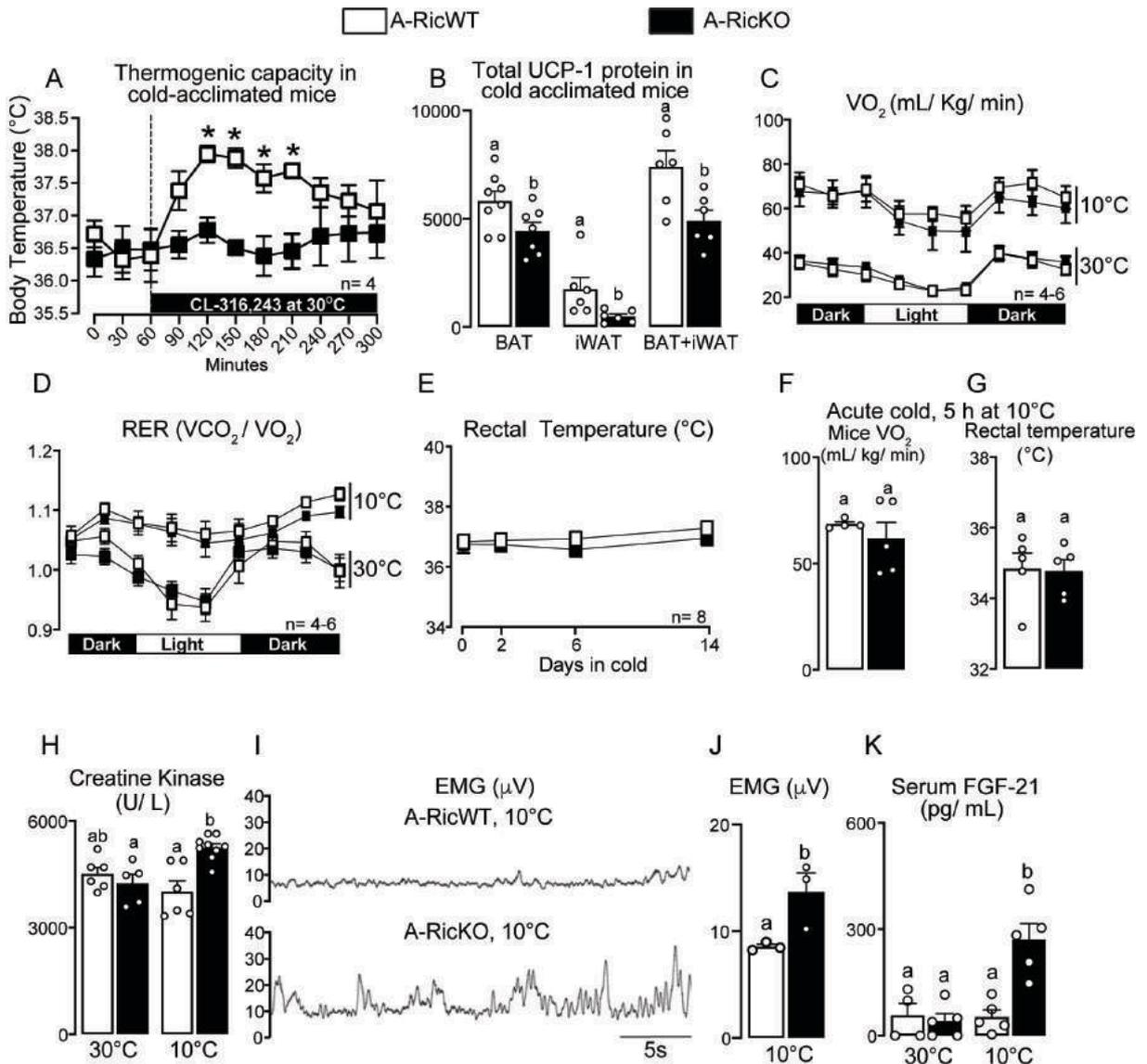


Figure 12. Adipocyte mTORC2 deficiency impairs cold-induced BAT and iWAT total UCP-1 content and thermogenic capacity and promotes scapular muscle shivering. Male A-RicKO and A-RicWT mice were acclimated to cold ($10 \pm 1^\circ\text{C}$) and evaluated for body temperature in response to an intraperitoneal injection of CL-316,243 (1 mg/kg) at 30°C (A), total brown adipose tissue and inguinal white adipose tissue UCP-1 content (B), and scapular muscle electromyography (EMG, I and J). Male A-RicKO and A-RicWT mice kept at thermoneutrality ($30 \pm 1^\circ\text{C}$) or acclimated to cold ($10 \pm 1^\circ\text{C}$) were evaluated for whole-body oxygen consumption (C), respiratory exchange rates (RER, D), rectal temperature (E), serum creatine kinase activity (H) and serum FGF-21 levels (K). Panels D and E are rates of oxygen consumption and rectal temperature from male A-RicKO and A-RicWT mice food deprived and exposed to cold ($10 \pm 1^\circ\text{C}$) for 5 h. Values are expressed as mean \pm SEM. Means not sharing a common superscript are significantly different from each other, $p \leq 0.05$. * $p \leq 0.05$ versus cold-acclimated A-RicKO mice.

DISCUSSION

We investigated herein whether Rictor deletion and therefore mTORC2 deficiency in adipocytes affects BAT and iWAT morphology, metabolism and thermogenesis in cold-acclimated mice. Our main findings indicate that although mTORC2 is inhibited by cold acclimation in BAT and iWAT, its residual activity is still required for the cold-induced increases in BAT adipocyte number, total UCP-1 content, thermogenic capacity and mRNA levels of proliferation markers Ki67 and CCND1 and *de novo* lipogenesis enzymes ACLY and ACC. In iWAT, mTORC2 residual activity is partially required for the cold-induced increases in multilocular adipocytes, mitochondrial mass, UCP-1 content and mRNA levels of enzymes involved in fatty acid uptake and synthesis. BAT mTORC1 activity and BAT and iWAT glucose uptake, on the other hand, were increased by cold acclimation independently of mTORC2. Interestingly, the reduced BAT and iWAT thermogenic capacity induced by adipocyte mTORC2 deficiency had no major impact on mice whole-body energy expenditure upon cold acclimation due to a compensatory activation of muscle shivering.

Previous studies have shown that acute cold exposure activates both mTORC1 and mTORC2, while chronic cold exposure activates mTORC1 [153] and either does not affect [153] or reduces [53] mTORC2 activity in BAT and iWAT. Supporting this divergent effect of chronic cold upon mTOR complexes, 14 days of cold acclimation reduced BAT and iWAT mTORC2 activity as evaluated by Akt phosphorylation at Ser473, and increased mTORC1 activity as evaluated by S6 phosphorylation. The mechanisms underlying this cold-induced impairment in mTORC2 activity are unknown, but they may involve the cold-induced reduction in serum insulin [150,153,164], a major activator of PI3K-mTORC2-Akt signaling in adipocytes [39,165] and/or a negative feedback catalyzed by mTORC1 targets S6 kinase 1 (S6K-1) and growth factor receptor-bound protein 10 (GRB10) on IRS function and therefore PI3K-mTORC2 signaling [46,166]. Notably, these results also indicate that sustained adrenergic signaling in cold-acclimated mice does not activate BAT and iWAT mTORC2 activity as acute adrenergic activation does [40,48], and that mTORC2 does not seem to act as an upstream regulator of mTORC1 in BAT upon cold acclimation. Indeed, cold acclimation was equally effective in increasing mTORC1 activity (S6 phosphorylation) in BAT of both A-RicWT and A-RicKO and iWAT of A-RicKO, despite the reduced or absent mTORC2 activity, respectively. These findings suggest that cold acclimation promotes mTORC1 activity in brown and beige

adipocytes independently of mTORC2. In this sense, a previous study has shown that β -adrenergic receptor activation increases mTORC1 activity via Raptor and mTOR phosphorylation by protein kinase A [154].

Along with signaling, adipocyte mTORC2 deficiency markedly decreased BAT mass in cold-acclimated mice, an effect that may be attributed to decreases in brown adipocyte number, evidenced by the reduced BAT total protein content, and lipid storage, evidenced by the higher number of nuclei per field and relative protein content per mg of tissue. Cold acclimation enhances BAT thermogenic capacity mainly by increasing UCP-1 content per cell and brown adipocyte number as the result of the enhanced proliferation of BAT stem cells and brown adipogenesis and impaired apoptosis of brown adipocytes [167]. Our findings that adipocyte mTORC2 deficiency abolished the cold-induced increase in BAT mRNA levels of proliferation markers Ki67 and CCND1 strongly suggest that mTORC2 activity is required for cold-induced proliferation of BAT stem cells. Whether mTORC2 also affects brown adipocyte apoptosis in cold-acclimated mice will be investigated in future studies. Regarding brown adipocyte lipid storage, the absence of changes in basal and norepinephrine-stimulated lipolysis and the impaired induction of ACLY and ACC mRNA levels in BAT of cold acclimated A-RicKO mice suggest a likely reduction in *de novo* fatty acid synthesis as a possible underlying mechanism. Evaluation of *de novo* lipogenesis *in vivo* will be required to test this hypothesis. Noteworthy, the genuine contribution of lipolysis to the reduction BAT mass may be underestimated in A-RicKO mice due to the higher GyK expression and glycerol recycling.

In iWAT of cold-acclimated mice, adipocyte mTORC2 deficiency reduced not only adipocyte diameter, as the result of reduced lipid storage, but also the number of multilocular beige adipocytes, which indicates impaired browning. Mechanistically, this reduced lipid storage seems to be due to a combination of enhanced adrenergically-stimulated lipolysis and impaired fatty acid uptake and *de novo* synthesis, as suggested by impaired mRNA content of proteins involved in these processes. These phenotypes are somehow expected considering that mTORC2 was shown to: 1- inhibit lipolysis through the canonical activation of Akt [168] and non-canonical reduction in forkhead box protein O1 (FoxO1) deacetylation catalyzed by NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-6 (SIRT-6) [53]; and 2- to positively regulate the expression of proteins involved in fatty acid uptake (LPL and CD36) and *de novo* synthesis (ACLY, ACC and FAS) via activation of the transcription factors PPAR γ [169] and SREBP and

ChREBP [170], respectively. Probably as a consequence of PPAR γ inhibition, adipocyte mTORC2 deficiency abolished the cold-induced increase in serum levels of adiponectin, an adipokine whose secretion is regulated by this nuclear receptor [171,172]. Considering that adiponectin was recently shown to promote LPL activity and lipid storage in WAT [173], this reduction in serum adiponectin may contribute to the impaired LPL mRNA levels and reduced lipid storage in iWAT of cold-acclimated A-RicKO mice. Interestingly, despite the higher rates of adrenergically-stimulated lipolysis in iWAT, cold-acclimated A-RicKO mice displayed reduced serum glycerol and NEFA levels, indicating an enhanced utilization of these metabolites. Processes that are enhanced and may respond for the higher NEFA utilization in cold acclimated A-RicKO mice are BAT nonshivering and muscle shivering thermogenesis [174], while glycerol may be preferentially consumed as a precursor for hepatic gluconeogenesis [175,176]. Such enhanced BAT NEFA usage is supported by the increased mRNA levels of fatty acid uptake-related proteins LPL and CD36, which are perhaps elicited as a compensation for the reduction in ACLY and ACC mRNA levels and, consequently, *de novo* fatty acid synthesis.

Another interesting finding of our study was the lack of adipocyte mTORC2 involvement in the cold-induced increases in BAT and iWAT glucose uptake and BAT GLUT-1 and GLUT-4 contents, strongly indicating that mTORC2 is not required for the cold-induced increase in BAT and iWAT glucose uptake. Supporting this notion are the recent findings that pharmacological inhibition of PI3K, an upstream activator of mTORC2, does not affect β -adrenergic receptor ligand-stimulated glucose uptake and GLUT-1 synthesis and translocation in brown adipocytes *in vitro*. Furthermore, β -adrenergic receptor-mediated glucose clearance *in vivo* does not require insulin or PI3K-Akt signaling [48]. Contradictorily to these findings, however, a previous study found that mTORC2-Akt are activated via β -adrenergic receptors upon acute cold exposure (2-8 h) and promotes glucose uptake in BAT through a mechanism that involves hexokinase activity [40]. They also showed that mice with mTORC2 deficiency produced using the non-adipocyte specific aP2-Cre were hypothermic when acutely exposed to cold due to impaired BAT glucose uptake and metabolism [40]. As further discussed below, we did not find any signs of hypothermy in A-RicKO mice acutely or chronically exposed to cold. In our opinion, the major reason underlying these discrepancies is the use of different promoters to drive Cre recombinase expression

and therefore Rictor deletion, namely the adipocyte specific adiponectin Cre used here versus the broad non-adipocyte specific aP2-Cre used before [40].

In contrast to brown adipocytes, cold-induced increase in iWAT glucose uptake was associated with unaltered GLUT-1 and a trend for an increase in GLUT-4 protein content in A-RicWT and A-RicKO mice. The mechanisms by which cold acclimation increases glucose uptake in beige adipocytes are still unknown. Although we did not find major changes in GLUT-1 in iWAT, one should not exclude its participation in cold-induced increase in iWAT glucose uptake considering that this transporter may be regulated at the level of translocation and activity. Interestingly, in spite of the similar increase in BAT and iWAT glucose uptake upon cold acclimation, A-RicKO mice showed higher serum fasting insulin levels and impaired insulin tolerance when compared to A-RicWT mice, indicating the activation of a counter-regulatory process that counteracts BAT and iWAT glucose clearance. Indeed, as found in a pyruvate tolerance test, A-RicKO mice kept at either thermoneutrality or acclimated to cold displayed increased hepatic glucose production via gluconeogenesis. These findings corroborate and extend those of a previous study in which adipocyte mTORC2 deficiency was associated with increased hepatic insulin resistance and gluconeogenesis in mice kept at 23°C [146]. The mechanisms by which adipocyte Rictor deletion enhances hepatic gluconeogenesis, though, are still unknown.

Despite the impaired cold-induced recruitment of brown fat cells, adipocyte mTORC2 deficiency did not affect the increase in BAT relative UCP-1 content per adipocyte (per mg of protein) induced by cold acclimation. In iWAT, on the other hand, along with reduced number of multilocular adipocytes, adipocyte mTORC2 deficiency attenuated the cold-induced increases in UCP-1, PRDM16 mRNA levels, content of respiratory complexes I, II, III and V and mitochondrial mass (citrate synthase activity). The mechanisms by which adipocyte mTORC2 deficiency attenuated iWAT browning are unknown, but they may involve an inhibition of PPAR γ , a nuclear receptor that regulates adipocyte UCP-1 expression and whose pharmacological activation promotes browning and mitochondriogenesis in WAT [177,178]. Notably, A-RicKO mice impaired cold-induced iWAT browning and mitochondriogenesis was associated with complete abrogation of the upregulation of the mitochondrial fission marker DRP-1, which was previously shown to be required for the iWAT browning and mitochondriogenesis induced by pharmacological PPAR γ activation [179].

By performing a functional evaluation of BAT and iWAT UCP-1-mediated thermogenic capacities through the administration of CL, we confirmed the impairment in this process induced by adipocyte mTORC2 deficiency in cold-acclimated mice. Indeed, CL administration increased body temperature in cold-acclimated A-RicWT, but not A-RicKO at thermoneutral conditions, supporting the impaired thermogenic capacity of the latter. Furthermore, considering its much higher UCP-1 content and thermogenic capacity, the impairment in BAT recruitment is likely more relevant to whole-body energy expenditure than the impairment in iWAT browning induced by adipocyte mTORC2 deficiency. Interestingly, despite the impaired BAT and iWAT total UCP-1 content and thermogenic capacities, adipocyte mTORC2 deficiency had no impact whatsoever in whole-body energy expenditure, rectal temperature and metabolic substrate preference in mice acclimated or acutely exposed to cold, suggesting the recruitment of alternative UCP-1-independent thermogenic processes. According to this notion, A-RicKO mice displayed increased serum creatine kinase activity, scapular muscle electromyographic activity, and serum levels of FGF-21 upon cold acclimation, all supporting a compensatory activation of skeletal muscle shivering.

This study has several limitations. Due to the impossibility of maintaining mice at thermoneutrality and cold simultaneously, to perform experiments with littermates in all four groups, mice were first acclimated at thermoneutral conditions during 14 days and were either euthanized or subsequently acclimated to cold for additional 14 days. Therefore, mice at thermoneutrality were euthanized 14 days younger than the cold-acclimated. Other important limitations are that absence of *in vivo* evaluation of *de novo* fatty acid synthesis to test whether the observed alterations in gene expression profile are translated in changes in their respective metabolic processes, as well as the evaluation of total, instead of membrane-associated GLUT content, which would be more informative regarding a possible modulation of transporter translocation.

In conclusion, mTORC2 is inhibited in BAT and iWAT by cold acclimation, but its residual activity is required, through different mechanisms, to the cold-induced recruitment of total UCP-1 content and thermogenic capacity in these tissues. Future studies will be required to discriminate the mechanisms underlying these divergent actions of mTORC2 in brown and beige adipocytes.

Capítulo III

mTORC2 em adipócitos é um importante mediador da expansão de massa do tecido adiposo marrom, mas não da melhora na sensibilidade à insulina induzida pela ativação farmacológica de PPAR γ com pioglitazona

Introdução

Os receptores ativadores da proliferação peroxissomal (PPARs) são uma família de fatores de transcrição nuclear da qual fazem parte PPAR α , PPAR δ e PPAR γ , e que controlam a expressão de genes do metabolismo celular e diferenciação de adipócitos [180]. PPAR γ existe em duas isoformas devido ao *splicing* alternativo do RNAm: PPAR γ 1 e PPAR γ 2 [181,182]. PPAR γ 1 está presente em diversos tipos celulares, enquanto que PPAR γ 2 é expresso principalmente em adipócitos [182–185]. Estruturalmente, os PPARs têm domínios conservados de ligação ao DNA (DBD, *DNA-binding domain*) e de ligação de ligantes (LDB, *ligand-binding domain*) (Figura 13). A atividade transcricional dos PPARs é dependente de ligantes e da ligação do DBD à região de elementos responsivos ao PPAR (PPRE) na região promotora dos genes alvos, iniciando assim, a transcrição gênica [186].

Assim como mTOR, PPAR γ também é um sensor de nutrientes, mais especificamente, um sensor de lipídeos. Várias moléculas podem atuar como ligantes naturais de PPAR γ , como ácidos graxos insaturados e poli-insaturados e seus metabólitos, bem como prostaglandinas (15- Δ PGJ2) e ácidos graxos oxidados (9-HODE) [187]. Além dos ligantes naturais, PPAR γ é ativado pelas tiazolidinedionas (TZDs), que são uma classe de ligantes sintéticos que compreende a rosiglitazona (RSG) e a pioglitazona (Pio), entre outras, usados no tratamento de pacientes com resistência à insulina e diabetes tipo 2 [188].

Em 1999, a RSG e Pio foram aprovadas pelo FDA como tratamento de segunda linha para pacientes com resistência à insulina, diabetes tipo 2 ou pré-diabetes em associação ou não à metformina (um potente inibidor da gliconeogênese). Posteriormente, a comercialização de RSG foi descontinuada, por causa dos efeitos colaterais como a retenção de água, edema e insuficiência cardíaca, efeitos estes que não são apresentados pela Pio [188].

Em relação ao mecanismo de ação, após a ativação por seus ligantes e heterodimerização obrigatória com os receptores do ácido retinoico (RXR), os PPAR γ ligam-se a PPRE no DNA pelo seu domínio DBD, e modulam a expressão de genes envolvidos, em relação ao tecido adiposo, com o metabolismo de glicose (Glut4, PI3K, IRS-1), de lipídeos (aP2, LPL, CD36, PEPCCK, GyK) e da adipogênese (C/EBP α , STAT) [189].

PPAR γ é um importante controlador da adipogênese, bem como da função e sobrevivência de adipócitos. Deficiência total ou mutações que inativam PPAR γ impedem a formação de novos adipócitos e promovem a morte de adipócitos maduros, induzindo um quadro de lipodistrofia severa, com ausência completa de TAM e TAB [85,190]. Em contrapartida, a ativação farmacológica de PPAR γ promove redistribuição de gordura do TAB visceral para o TAB subcutâneo, o que confere um quadro metabólico saudável com melhora na sensibilidade à insulina [191]. Essa redistribuição dos TABs acontece pelo favorecimento do estoque de lipídeos principalmente no TA subcutâneo, devido ao aumento neste tecido da atividade da LPL, captação de ácidos graxos, geração de glicerol 3-fosfato via glicerol quinase e gliceroneogênese, que em conjunto promovem maior síntese de TAG [191,192].

Além da redistribuição de tecido adiposo, as TZDs melhoram a sensibilidade à insulina em modelos animais e humanos com diabetes tipo 2 ao modular a produção e secreção de adipocinas [193]. PPAR γ é um potente estimulador da secreção da adiponectina, uma importante adipocina que aumenta a sensibilidade à insulina [159,161,194,195]. PPAR γ também é expresso em macrófagos, e quando ativado, PPAR γ promove a ativação alternativa de macrófagos, induzindo um fenótipo M2 anti-inflamatório, efeito este que contribui na melhora da sensibilidade à insulina [195].

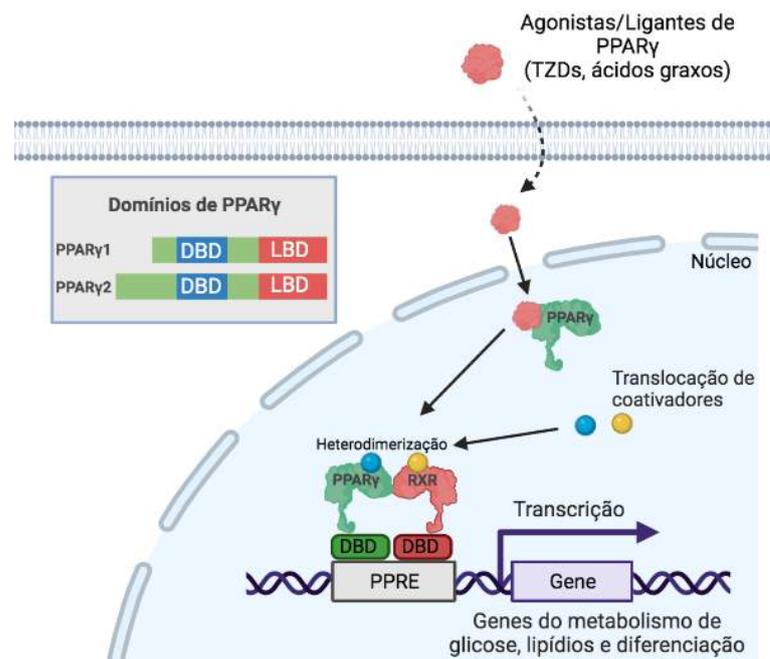


Figura 13. Mecanismo de ação dos PPAR γ . Ácidos graxos captados da circulação ou da produção endógena e agonistas sintéticos ligam-se pelo domínio LBD em PPAR γ . PPAR γ então liga-se em um processo de heterodimerização obrigatória com RXR, permitindo, assim, o início da transcrição gênica.

A ativação de PPAR γ também melhora a sensibilidade à insulina por reduzir os ácidos graxos livres circulantes e a lipotoxicidade [186,196]. Em excesso, ácidos graxos livres promovem resistência à insulina por diversos mecanismos que incluem a maior formação de diacilglicerol e ativação da proteína PKC θ [197]; aumento da sinalização na via Toll-like receptor -4 e -2 e NF κ B; aumento da produção de ceramidas; aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, entre outros [198]. As TZDs reduzem a concentração sérica de ácidos graxos livres por mecanismos que envolvem aumento da captação e uso dos ácidos graxos para a síntese de TAG via aumento da atividade de LPL e CD36; e o aumento do efeito inibitório da insulina na lipólise do TAB [158,191,193]. Interessantemente, a RSG aumenta a expressão das lipases ATGL, HSL e MGL e assim a lipólise basal e estimulada pela noradrenalina no TAB [158]. Entretanto, como a RSG reduz a atividade simpática para o TAB e aumenta o efeito inibitório da insulina na lipólise, ocorre uma redução da liberação de ácidos graxos para a circulação pelo TAB *in vivo* [161].

O agonismo de PPAR γ também recruta o TAM, aumenta o conteúdo de UCP-1, aumenta a capacidade termogênica e induz *browning* do TAB [159,199,200]. Diferentemente da ativação simpática, o aumento da massa do TAM pelas TZDs acontece principalmente pelo aumento da deposição de lipídeos nesse tecido, e secundariamente pela proliferação e diferenciação [180]. Mas, importante ressaltar que o recrutamento do TAM (massa e UCP-1) induzido pela ativação farmacológica de PPAR γ ocorre simultaneamente com redução da atividade simpática para o TAM e TAB e da produção local do hormônio tireoidiano T3 pela enzima deiodinase 2 [201]. Desta forma, diferentemente do simpático, a ativação de PPAR γ aumenta a capacidade termogênica do TAM e TAB sem o aumento concomitante da termogênese adaptativa [201].

Comunicação entre PPAR γ e a via de sinalização da insulina

A ativação farmacológica de PPAR γ com as TZDs afeta vários passos da via de sinalização intracelular da insulina no tecido adiposo, inclusive a atividade de mTORC2 e mTORC1 [197]. Em modelos murinos de DM2, as TZDs impedem a fosforilação inibitória do IRS-1 em serina induzida pela PKC θ , mas também estimulam a fosforilação estimulatória do IRS-1 em tirosina [197,202], e ainda estimulam a fosforilação de Akt em Ser473 e T308 no TAB visceral epididimal [202]. Em humanos

resistentes à insulina não-diabéticos, a Pio melhora a sensibilidade à insulina e aumenta o conteúdo de Akt fosforilada em Ser473 no TAB subcutâneo [203]. Em contrapartida, em ratos saudáveis (não diabéticos e não resistentes à insulina), a RSG não afeta o conteúdo de Akt fosforilada em Ser473 no TAB, apesar de reduzir os níveis séricos de insulina [31]. Em um estudo foi avaliado a ativação de PPAR γ pela expressão de um transgene de PPAR γ especificamente em adipócitos bem como a ativação farmacológica com RSG, e ambos, independentemente ou associados, aumentam a fosforilação de Akt em Ser473 no TAB, e melhoram a sensibilidade à insulina, além de reduzirem a insulinemia [204]. Esses dados em conjunto sugerem que a ativação de PPAR γ aumenta a sensibilidade à insulina e a sinalização da via IRS1-PI3K-mTORC2-Akt nos TABs.

Diversos estudos têm encontrado que a via de sinalização da insulina também controla a atividade transcricional de PPAR γ . Camundongos com deleção do receptor de insulina em adipócitos utilizando aP2-Cre apresentam reduzida adiposidade, prejuízos na captação de glicose e inibição da lipólise estimuladas por insulina no TAB, e surpreendentemente são protegidos do desenvolvimento de intolerância à glicose e resistência à insulina [205], efeitos estes, que contribuem para o aumento da longevidade desses camundongos [206]. Em contrapartida, camundongos com a deleção do receptor de insulina em adipócitos utilizando a adiponectina-Cre apresentam uma severa redução das massas dos TAB, a qual conduz à lipodistrofia [207]. Ainda, esses camundongos tem redução da expressão de RNAm de C/EBPa, PPAR γ e GLUT-4 no TAB epididimal, bem como redução de adiponectina e leptina circulantes [207]. Esses camundongos são resistentes à insulina, a qual é revertida pelo tratamento com leptina [207]. Além disso camundongos com a deleção da subunidade p110alfa de PI3K em adipócitos (aP2-Cre) também desenvolvem intolerância à glicose e têm reduzida expressão de PPAR γ no TAM [208].

A ativação constitutiva da sinalização da via da insulina em adipócitos de camundongos devido a deleção de PTEN (adiponectina-Cre), promove um aumento substancial da sensibilidade à insulina e melhora da tolerância à glicose, bem como aumento da inibição da lipólise estimulada por agonistas de receptores β -3 adrenérgicos, além de aumentar a adiposidade [209]. Em um outro estudo, a deleção de PTEN em adipócitos utilizando um promotor homólogo ao gene da adiponectina (Acadc-Cre, *adipocyte C1q and collagen domain-containing*) também aumentou a

sensibilidade à insulina e tolerância à glicose, além de aumentar o conteúdo de RNAm de PPAR γ e GLUT-4 no TAB e TAM [210]. Ainda, a deleção de mTOR em adipócitos (adiponectina-Cre) também reduz a adiposidade, aumenta a massa hepática, e induz resistência insulínica e intolerância à glicose [211]. Esses camundongos também têm reduzido conteúdo de PPAR γ , C/EBP α e FABP4 no TAM [211]. E curiosamente, a deleção de mTOR impede o aumento da expressão de Fabp4, adiponectina e UCP-1 induzida pelo tratamento com RSG em adipócitos marrons [211].

Como mencionado anteriormente, a deleção de Rictor/mTORC2 em adipócitos reduz a adiposidade e conduz à esteatose hepática e resistência insulínica, bem como redução do conteúdo de RNAm de PPAR γ e seus alvos nos tecidos adiposos [146,148,169]. Em especial, um trabalho recente, demonstrou que a ativação de Rictor/mTORC2 em cultura primária de adipócitos é essencial para a atividade transcricional total de PPAR γ [169]. Nesse mesmo estudo, a deleção de Rictor especificamente em células precursoras de adipócitos do tecido adiposo subcutâneo (Prx1-Cre) reduziu a massa do TAB inguinal, bem como o conteúdo de RNAm dos alvos de PPAR γ : Chrebp, GLUT-4, CD36, LPL, FABP4, HSL e adiponectina [169]. Curiosamente, embora esse estudo tenha deletado Rictor/mTORC2 em adipócitos, há também uma importante redução de S6K1 fosforilada, que é um alvo de mTORC1 [169], e, portanto, não é possível concluir que os efeitos na redução de genes alvos de PPAR γ são decorrentes da atividade de mTORC2 ou mTORC1. Por fim, esse estudo também demonstrou que camundongos com deleção de Rictor em adipócitos (adiponectina-Cre) tem redução da massa do iTAB inguinal e da expressão de CD36, LPL e Dgat2 após a realimentação ou após 12 semanas de alimentação com dieta hiperlipídica [169].

Embora encontramos que mTORC2 não controla a captação de glicose no tecido adiposo em situações de ativação adrenérgica (Capítulo II), há uma vasta literatura demonstrando que a captação de glicose induzida pela insulina é mediada pela ativação da via da PI3K-mTORC2-Akt e consequente translocação do transportador de glicose GLUT-4 em adipócitos [38,212–215]. Um trabalho demonstrou que a ativação de PPAR γ por RSG aumenta a captação de glicose induzida pela insulina no TAB subcutâneo [192]. Entretanto, a participação de mTORC2 na captação de glicose no tecido adiposo induzida pela ativação

farmacológica de PPAR γ é desconhecida, bem como os mecanismos pelos quais mTORC2 reduz a expressão e a atividade transcricional de PPAR γ .

Em conjunto os trabalhos supracitados sugerem que a ativação da sinalização de insulina-PI3K-mTORC2 estimula a atividade transcricional de PPAR γ . E de fato, essa ideia é suportada por experimentos em que a estimulação de adipócitos com insulina conduz a um rápido aumento da expressão de PPAR γ [216]. Entretanto, essa comunicação da via da insulina-IR-PI3K-mTORC2-Akt com PPAR γ foi pouco explorada.

Considerando o intenso *cross-talk* entre PPAR γ e mTORC2 caracterizado por ativação mútua, no presente trabalho nós investigamos o envolvimento de mTORC2 como um possível mediador das ações da TZD Pio no balanço energético, adiposidade e homeostase da glicose. Para isto, camundongos com deleção de Rictor em adipócitos e controles alimentados com dieta hiperlipídica foram tratados ou não com a TZD Pio por 8 semanas.

Hipótese

Rictor/mTORC2 em adipócitos é um importante mediador da melhora da homeostase da glicose induzida pela ativação farmacológica de PPAR γ com Pio.

Objetivo

Investigar o envolvimento de Rictor/mTORC2 em adipócitos como mediador das alterações de metabólicas do TAM e TAB e da melhora da homeostase da glicose induzidos pela ativação farmacológica de PPAR γ com Pio.

Material e Métodos

Camundongos

Todos os procedimentos envolvendo animais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética de Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas (CEUA-ICB #115/2016). Camundongos com deleção de Rictor em adipócitos (ARicKO) e

controles (ARicWT) foram produzidos utilizando o sistema Cre-loxP. Nesse sistema, a enzima Cre recombinase promove a recombinação do DNA deletando regiões específicas do genoma que estejam flanqueadas por sequências loxP (ATAACTTCGTATAGCATAACATTATACGAAGTTAT). Aqui, utilizamos camundongos que tem o *transgene* BAC Adiponectin-Cre inserido no genoma. O promotor adiponectina-Cre promove a deleção apenas em células que expressam a adiponectina, que nesse caso, são os adipócitos brancos, marrons e beges [21,85,147,217].

Em suma, camundongos contendo o exon 11 do gene do Rictor flanqueado por sequências LoxP nas duas fitas do DNA (*Rictor^{ff}*; *Rictor^{tm1.1Klg/SjmJ}*) foram cruzados com camundongos adiponectina-cre^{+/-} (B6;FVB-Tg(Adipoq-cre)1EvdR/J) para obter a geração F1 de *Rictor^{ff/wt}*; adiponectina-cre^{+/-}. A geração F1 foi cruzada com *Rictor^{ff}* produzindo a geração F2: *Rictor^{ff}*; adiponectina-cre^{+/-}. F2 foi cruzada com *Rictor^{ff}* a fim de produzir camundongos *Rictor^{ff}*;adiponectina-cre^{-/-} (aqui denominados de ARicWT) e *Rictor^{ff}*;adiponectina-cre^{+/-} (denominados de ARicKO) (Figura 14).

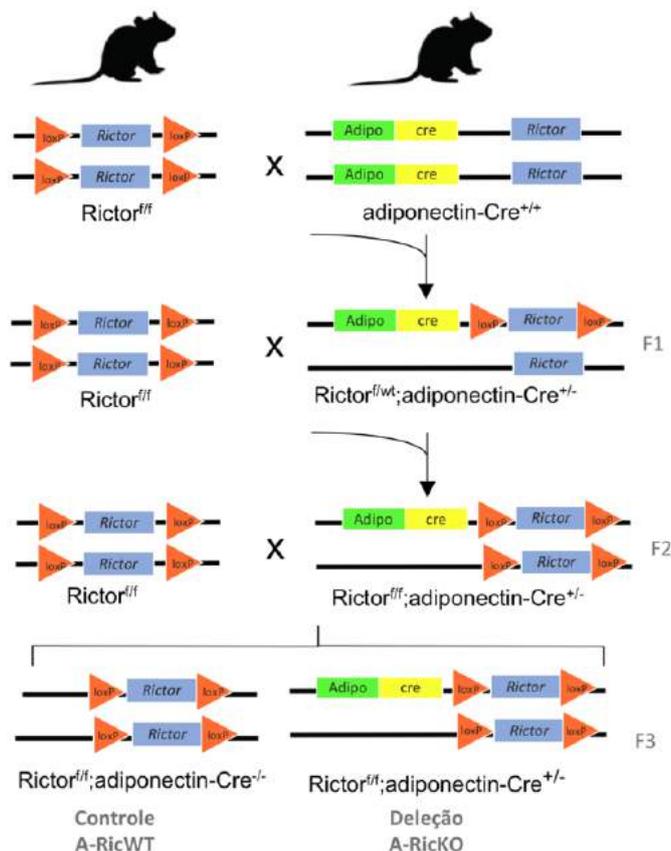


Figura 14. Esquema dos cruzamentos para obtenção de camundongos controles e com deleção de Rictor em adipócitos.

Genotipagem

Para a verificação e validação dos cruzamentos e dos camundongos experimentais, foi realizada a genotipagem de *Rictor^{f/f}* e de adiponectina-cre. Os animais foram anestesiados com isoflurano e 0,2 cm da cauda foi seccionada para a extração do DNA. A extração foi realizada por digestão em NaOH 50 mM por 12 min a 95°C, seguido de neutralização com Tris-HCl 1M (pH 6,8) e centrifugação por 15 min a 13000 rpm. O sobrenadante foi utilizado para a reação de PCR (reação em cadeia da polimerase) com o kit Platinum Taq DNA Polymerase (Life Technologies, EUA). Foram utilizados primers para *Rictor^{f/f}* e adiponectina-cre (Tabela 3).

Tabela 3. Primers utilizados na genotipagem de camundongos controle e experimentais.

<i>adiponectina-cre</i>	Sequência 5'- 3'
Controle interno sense	CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT
Controle interno antisense	GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC
Mutante sense	CGAACGCACTGATTTTCGACC
Mutante antisense	AACCAGGCGTTTTTCGTTCTGC
<i>Rictor^{f/f}</i>	
Sense	ACTGAATATGTTTCATGGTTGTG
Antisense	GAAGTTATTCAGATGGCCCAGC

As amostras foram corridas em gel de agarose 2% para a separação dos produtos de PCR. Camundongos homozigotos para *Rictor* floxeado apresentam uma única banda de 554 pb (Figura 15A). Camundongos positivos para a enzima Cre recombinase apresentam duas bandas, uma de 202 e outra de 324 pb, e os animais negativos apenas uma banda de 324 pb (Figura 15B).

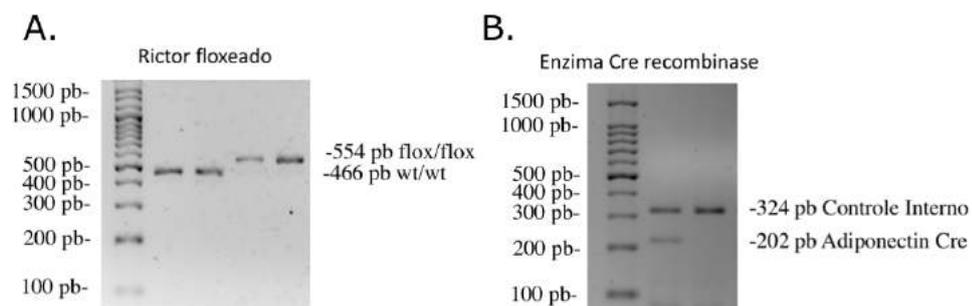


Figura 15. Gel representativo de agarose 2% da separação por eletroforese de produtos da genotipagem de (A) *Rictor* floxeado e (B) adiponectina-Cre.

Desenho experimental

Camundongos machos ARicWT e ARicKO de 8 semanas de idade foram alimentados por 8 semanas com uma dieta hiperlipídica (HFD, 60% das calorias provenientes da banha de porco) suplementada ou não com 30 mg/ kg/ dia de pioglitazona (Stanglit®, Libbs, São Paulo, Brasil) (Figura 16) e mantidos a $23 \pm 2^\circ\text{C}$ em ciclo claro/escuro de 12 h/12 h (ciclo claro com início às 07:00h) com acesso *ad libitum* à água e dieta (Tabela 4). Após jejum *overnight* (12 h), os camundongos foram injetados ou não i.p. com 0,75 U/ kg de insulina e após 15 min foram anestesiados com isoflurano (Isoforine®, Cristália, São Paulo, Brasil), seguido de eutanásia por exsanguinação e coleta de soro, tecidos adiposos marrom (TAM) e brancos inguinal (iTAB), epididimal (eTAB) e retroperitoneal (rTAB), fígado, pâncreas e músculo gastrocnêmio.

Tabela 4. Composição da HFD (60% das calorias provenientes da banha de porco)

Ingrediente	g/kg
Caseína	258,4
L-cistina	3,9
Maltodextrina	161,5
Sacarose	88,9
Celulose	74,1
Óleo de soja	32,3
Banha de porco	316,6
Óleo de peixe	0
Mix mineral AIN93M	47,9
Mix vitamínico	13,7
Bitartarato de colina	2,6

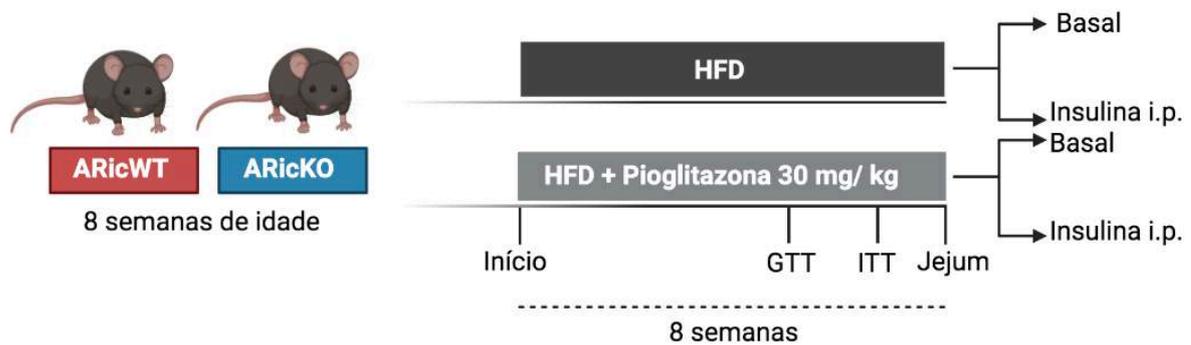


Figura 16. Esquema representativo do desenho experimental do Capítulo III.

Composição corporal

A porcentagem de massa magra e gorda foi avaliada por ressonância magnética no equipamento Bruker Minispec LF50.

Homeostase da glicose

Teste de tolerância à glicose intraperitoneal (ipGTT): o ipGTT foi avaliado como a área sob a curva (AUC) da glicemia após a administração de glicose (2 g/ kg de massa corporal) em função do tempo (min). Para isso, após 6 semanas de tratamento, camundongos foram privados de alimento por 6h e a glicemia foi mensurada antes e 15, 30, 45, 60 e 90 min após a administração intraperitoneal de glicose. A glicemia caudal foi mensurada com glicosímetro One Touch Select Plus Flex (Johnson & Johnson, Brasil).

Teste de tolerância à insulina intraperitoneal (ipITT): o ipITT foi avaliado como a taxa de decaimento da glicemia (kITT, %/ min) após a administração de insulina (0,75 U/ kg de massa corporal). Após 6,5 semanas de tratamento, camundongos foram privados de alimento por 4h e a glicemia foi mensurada antes e 5, 10, 15, 20 e 30 min após a administração intraperitoneal de insulina. A glicemia caudal foi mensurada com glicosímetro One Touch Select Plus Flex (Johnson & Johnson, Brasil).

Insulina sérica: a insulina sérica foi avaliada por ensaio de ELISA (Millipore, MA, EUA). Glicose plasmática foi avaliada com kit colorimétrico (Labtest, Minas Gerais, Brasil).

O índice de resistência à insulina (HOMA-IR) foi avaliado pela equação:

$$\text{HOMA-IR: } (\text{glicemia de jejum (mmol/L)} \times \text{insulina de jejum } (\mu\text{U/mL})) / 22,5 \text{ [196].}$$

Ensaio de lipólise em fragmentos de tecido

Fragmentos de TAM foram pré-incubados por 10 min em tubos de ensaio com tampão *Krebs-Ringer-Bicarbonato* (pH 7,4) contendo 5,5 mM glicose e 2% BSA livre de ácido graxo. Posteriormente, foram transferidos para um novo tubo contendo o mesmo tampão e incubados a 37°C por 1 hora [21]. A solução do ensaio foi então coletada e quantificada para glicerol livre (Free Glycerol Kit, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Os valores foram expressos como liberação de glicerol ($\mu\text{mol/ h/ mg}$ de proteína).

Captção de glicose

Fragmentos de TAM e iTAB foram incubados por 2 h a 37 °C sob agitação em tampão *Krebs-Ringer-Bicarbonato* (pH 7,4) com 2% BSA livre de ácidos graxos contendo 5,5 mM glicose e 0,2 $\mu\text{Ci/ mL}$ [$U\text{-}^3\text{H}$]2-deoxi-D-glicose (PerkinElmer, MA, EUA). Após a incubação, os tecidos foram lavados com PBS, digeridos com 1 M NaOH a 60 °C e destinados à contagem de radioatividade [21].

Análise histológica

Os tecidos adiposos inguinal e marrom foram fixados em paraformaldeído 4% por 24h e posteriormente transferidos a etanol 70% até inclusão em parafina. Os blocos foram seccionados (5 μm) e montados em lâminas histológicas. Após a retirada da parafina, os cortes foram corados com hematoxilina/eosina (H&E) ou com ácido periódico mais reativo de Schiff (PAS). Imagens digitais foram obtidas em microscópio óptico (Zeiss, Brasil).

Western Blot

O TAM ou fígado foram homogeneizados em tampão contendo em mM: 50 HEPES, 40 NaCl, 50 NaF, 2 EDTA, 10 pirofosfato de sódio, 10 glicerofosfato de sódio, 2 ortovanadato de sódio, 1% Triton-X 100 e inibidor de protease livre de EDTA (Roche Life Science, Pleasanton, CA, EUA) [21]. As amostras foram centrifugadas a 11000 rpm por 10 min a 4°C e a concentração de proteínas quantificada pelo método de Bradford (Bio-Rad, Califórnia, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. 20 μg de proteína foram separados em gel de acrilamida 10%. Após transferência para

membrana de PVDF, esta foi bloqueada por 1 h em solução salina tamponada com Tris e 0,1 % Tween (TBS-T) com 5% leite desnatado e incubada *overnight* com o anticorpo primário de interesse (diluição 1:1000) em TBS-T 5% leite. Os seguintes anticorpos primários foram utilizados: AKT (#9685s), FAS (#3190S), S6 (#2217S), pAKT Ser473 (#4060S), pS6 Ser240/244 (#5364S), SCD1 (#2438S) e UCP-1 (#14670) (Cell Signaling, Beverly, MA, EUA), α -Tubulina (#SC5286) e ERK/12 (#SC292838) (Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA). Após lavagem, a membrana foi incubada com anticorpo secundário conjugado à peroxidase (diluição 1:5000) em TBS-T 5% leite por 1 h. A membrana foi novamente lavada e então revelada com Substrato Clarity ECL Western Blotting (Bio-Rad, Califórnia, EUA). A densitometria das bandas foi obtida pelo software ImageJ (NIH, EUA). Os valores de densitometria de cada amostra foram normalizados pelos valores de intensidade do constitutivo (Erk1/2 para o TAM e Akt para o fígado). Os valores foram expressos como unidade relativa (UR), e para isso foi calculada a média do grupo controle, e em seguida todas as amostras foram divididas por esta média.

Isolamento de mitocôndrias do fígado

Após a eutanásia, o fígado foi coletado e cortado em pequenos pedaços com auxílio de uma tesoura e lavados 3 vezes em tampão de isolamento contendo sacarose 250 mM, HEPES 10 mM, EGTA 1 mM, pH 7,2 (K⁺) a 4°C e homogeneizados com auxílio de um homogeneizador manual do tipo potter. A suspensão obtida (~50 mL) foi centrifugada por 10 min a 800g a 4°C e o sobrenadante resultante foi centrifugado por 10 min a 12000g a 4°C. O sedimento resultante foi ressuspenso gentilmente com um pincel em 1 mL de tampão de isolamento e em seguida, foi adicionado 50 mL do mesmo tampão e centrifugado novamente por 10 min a 10000g 4°C [218]. O sedimento resultante foi ressuspenso em 200 μ L de tampão contendo 75 mM de d-manitol, 25 mM de sacarose, 5 mM de KH₂PO₃, 20 mM de Tris-HCl, 100 mM de KCl e 0,1% de BSA, 1 mM de EGTA e 0,5 mM de EDTA, pH 7,4 (K⁺) [219]. As proteínas mitocondriais extraídas foram quantificadas por Bradford [220].

Consumo de oxigênio de mitocôndrias isoladas do fígado

O consumo de oxigênio foi monitorado com 125 μ g/mL de suspensão de mitocôndrias isoladas em tampão contendo 120 mM sacarose, 65 mM KCl, 10

mM HEPES, 2 mM MgCl₂, 1 mM KH₂PO₄, 1 mM EGTA e 0,1% BSA, pH 7,4 (K⁺) em um respirômetro de alta resolução Oroboros O2K (Innsbruck, Áustria). Inicialmente foi adicionado rotenona 1 µM (inibidor do complexo I) e succinato 5 mM (substrato do complexo II) e em seguida, o estado mitocondrial 3 (respiração dependente de ADP) foi avaliado pela adição de ADP 1 mM e o estado mitocondrial 4 (vazamento de prótons) foi induzida pela adição de oligomicina 1 µg/mL. As velocidades de consumo máximo de oxigênio foram obtidas pela adição sequencial de 1-2 µM de carbonil cianeto 3-clorofenilhidrazona (CCCP). A razão do controle respiratório (RCR) foi calculada pela razão entre o estado 3 e 4. [221].

Análise Estatística

Os dados gerados estão armazenados em planilhas do Excel (Microsoft, EUA). Foi realizado teste-T não pareado para avaliar possíveis diferenças entre dois grupos com distribuição normal. Quando da presença de dois fatores (genótipo versus dieta/tratamento), foi utilizado ANOVA *two-way* para verificar possíveis diferenças entre os grupos, seguido de teste post-hoc de Tukey para identificar as diferenças pontuais. A significância foi fixada em valor de $p < 0,05$. Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM). As análises estatísticas e gráficos foram realizados no software Graph Prism 9.0[®] (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, EUA).

Resultados

Pioglitazona aumenta atividade de mTORC2

Avaliamos a atividade de mTORC2 no TAM pela medida do conteúdo proteico de Akt fosforilada em Ser473. Como esperado, a deleção de Rictor (ARicKO) reduz o conteúdo de Akt fosforilada em Ser473 (p-Akt) no TAM quando comparado com ARicWT (Fig. 17). O tratamento com Pio, por sua vez, aumenta em aproximadamente 4,5x o conteúdo de p-Akt em ARicWT, aumento este, que é totalmente abolido pela deleção de Rictor em adipócitos (Fig. 17). A insulina, assim como a Pio, aumenta a fosforilação da Akt (4,1x) em ARicWT, mas não em ARicKO. A administração de insulina em associação com Pio tem efeito sinérgico na fosforilação de Akt, com o aumento substancial de mais de 25x em ARicWT (Fig. 17). Esses resultados sugerem que o agonismo de PPAR γ com Pio ativa mTORC2 no TAM, efeito este que é potencializado pela insulina.

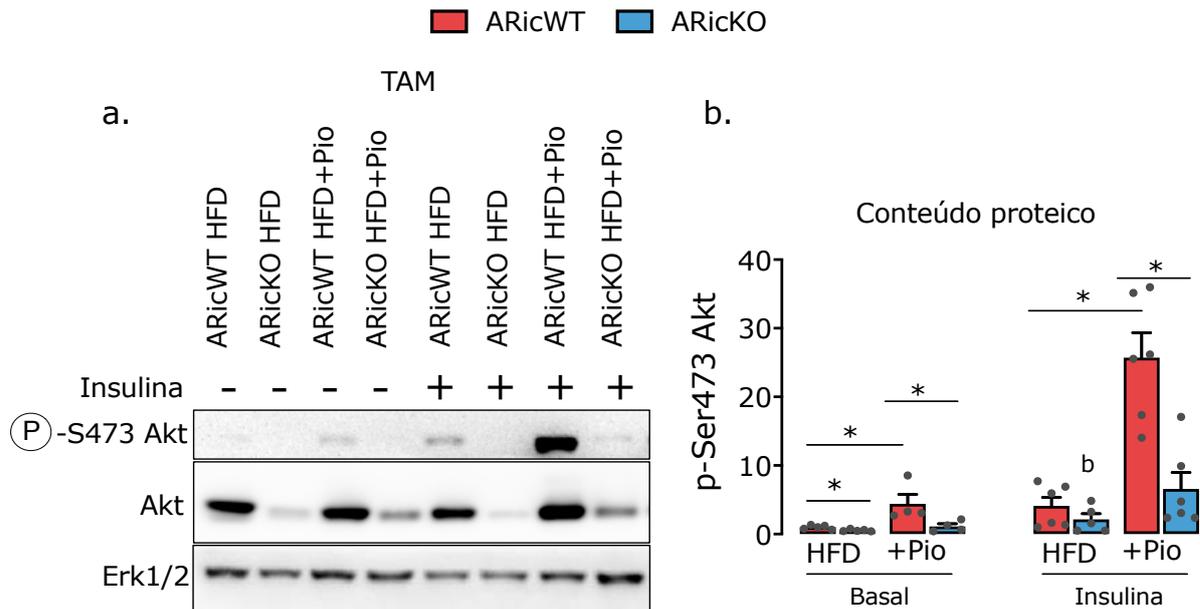


Figura 17. Conteúdo proteico de Akt total e fosforilada em Ser473 estimulada ou não com insulina no TAM de camundongos controles (ARicWT) e com deleção de Rictor em adipócitos (ARicKO) alimentados por oito semanas com dieta hiperlipídica (HFD) suplementada ou não com pioglitazona (Pio, 30 mg/ kg/ dia). n =4-6 camundongos por grupo. Dados representados como média±EPM; letras diferentes acima das barras representam diferença estatística, $p < 0,05$.

Deficiência de mTORC2 em adipócitos reduz o ganho de massa corporal e adiposidade e bloqueia parcialmente o aumento de massa do TAM induzido pela Pio

Camundongos ARicKO apresentam menor ganho de massa corporal quando comparados a ARicWT após a alimentação por oito semanas com HFD (Fig. 18ac). A Pio não altera o ganho de massa corporal em ambos ARicWT e ARicKO (Fig. 18bc). O consumo alimentar não é influenciado pelo tratamento ou genótipo (Fig. 18d). Análise da composição corporal por ressonância magnética revelou que os camundongos ARicKO tem menor massa gorda e maior massa magra independentemente do tratamento com Pio (Fig. 18f). A deleção de Rictor em adipócitos reduz a massa do TAM na HFD e bloqueia parcialmente o seu aumento induzido pela Pio (Fig. 18g). As massas dos TAB epididimal (eTAB), inguinal (iTAB) e retroperitoneal (rTAB) são menores em ARicKO na HFD (Fig. 18h). A Pio não altera significativamente as massas de eTAB e iTAB, mas reduz a massa do rTAB em camundongos ARicWT (Fig. 18h). A massa do músculo gastrocnêmio não é alterada pelo genótipo ou tratamento (Fig. 18j). Em contrapartida, a massa do fígado é maior em ARicKO na HFD, e este aumento é exacerbado pela Pio (Fig. 18k).

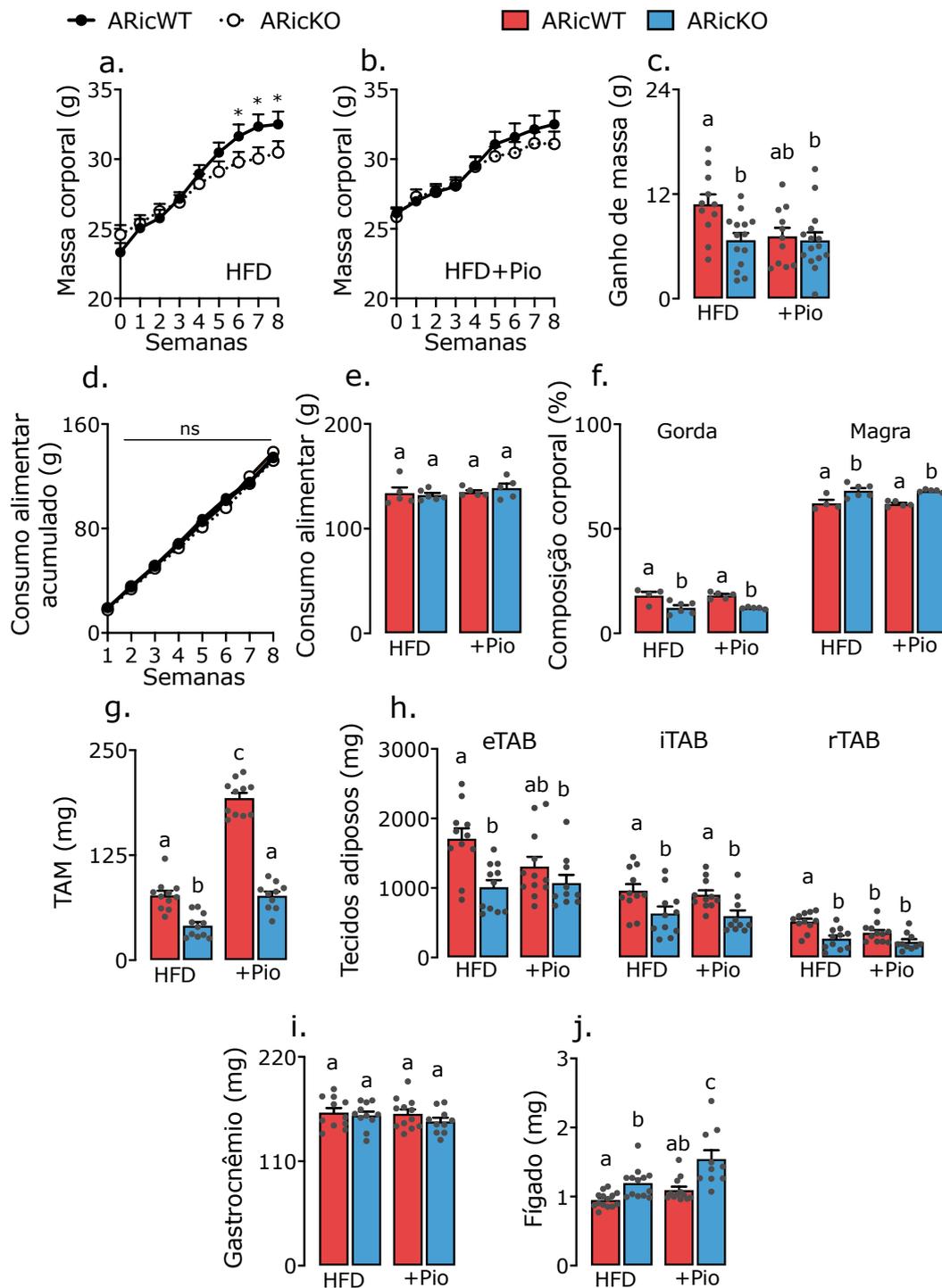


Figura 18. (ab) Curva de ganho de massa, (c) ganho de massa corporal, consumo alimentar (d) acumulado e (e) total, (f) porcentagem de massa gorda e magra, massas do TAM (g) e dos (h) eTAB, iTAB e rTAB, (i) razão do TAB inguinal em relação a soma dos eTAB e rTAB, massas do (j) músculo gastrocnêmio e do (k) fígado de camundongos controles (ARicWT) e com deleção de Rictor em adipócitos (ARicKO) alimentados por oito semanas com dieta hiperlipídica (HFD) suplementada ou não com pioglitazona (Pio, 30 mg/ kg/ dia). n =4-12 camundongos por grupo. Dados representados como média±EPM; letras diferentes acima das barras representam diferença estatística, $p < 0,05$.

Pio abole a resistência à insulina e hiperinsulinemia induzida pela deficiência de Rictor em adipócitos

Avaliamos a participação de Rictor em adipócitos nas alterações da homeostase da glicose induzidas pela HFD combinada ou não ao tratamento com Pio. A deleção de Rictor em adipócitos não interfere com a tolerância à glicose em camundongos alimentados com HFD (Fig. 19ac). Apesar da ausência de efeitos em camundongos ARicWT, o tratamento com a Pio melhorou a tolerância à glicose em camundongos ARicKO, como observado pela menor área sob a curva após a sobrecarga com glicose (Fig. 19bc). Em contraste ao GTT, camundongos ARicKO alimentados com HFD apresentaram importante resistência à insulina (Fig. 19df). O tratamento com Pio não só melhorou a tolerância à insulina em camundongos ARicWT (Fig. 19ef), como também reverteu totalmente a resistência à insulina em camundongos ARicKO, como evidenciado pela similar velocidade de decaimento de glicose após injeção de insulina em ambos ARicWT e ARicKO após tratamento com a Pio (Fig. 19def). Avaliamos se esses efeitos na homeostase da glicose são dependentes da adiponectina secretada pelos tecidos adiposos. A Pio aumentou a adiponectina sérica igualmente em camundongos ARicWT e ARicKO (Fig. 19g). Não houve diferenças significativas na glicemia de jejum entre camundongos ARicWT e ARicKO e ARicWT tratados com Pio (Fig. 19h). A Pio, entretanto, reduziu a glicemia de jejum em camundongos ARicKO (Fig. 19h). Os camundongos ARicKO apresentaram também elevada concentração sérica de insulina em jejum, maior índice de resistência à insulina (HOMA-IR), maior massa pancreática e maior área das ilhotas de Langherans (Fig. 19i-o). Tratamento com Pio abole completamente o aumento nessas variáveis em camundongos ARicKO (Fig. 19i-o).

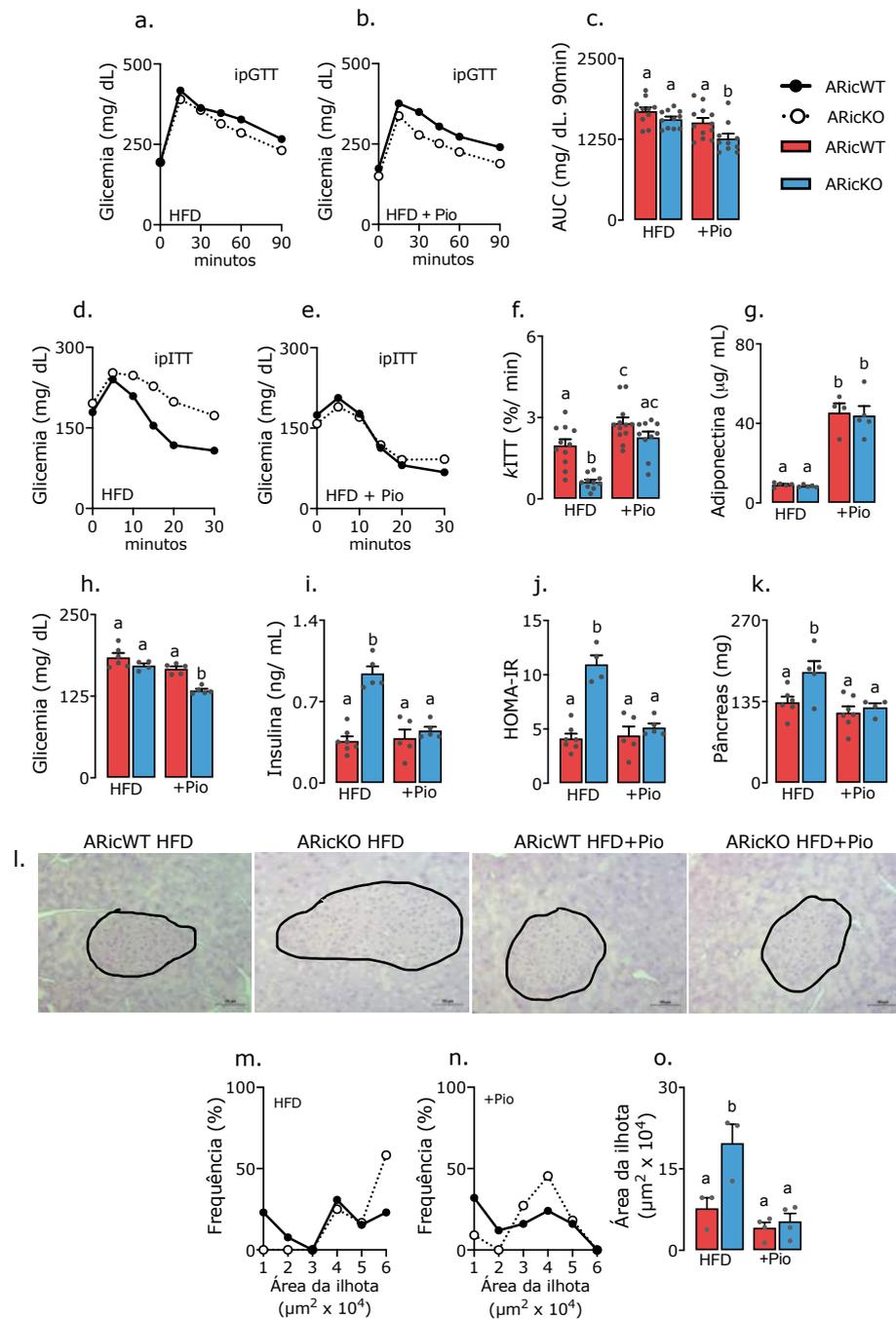


Figura 19. (a, b) Curva glicêmica e (c) área sob a curva de teste de tolerância à glicose (GTT), (d,e) curva glicêmica e (f) taxa de decaimento da glicemia de teste de tolerância à insulina (ITT), (g) concentração sérica de adiponectina, (h) glicemia de jejum, (i) insulinemia de jejum, (j) índice de resistência à insulina HOMA-IR, (k) massa do pâncreas, (l) fotomicrografia representativa de seções do pâncreas corado com H&E, (m, n) curva de distribuição das áreas das ilhotas pancreáticas e (o) área média das ilhotas pancreáticas de camundongos controles (ARicWT) e com deleção de Rictor em adipócitos (ARicKO) alimentados por oito semanas com dieta hiperlipídica (HFD) suplementada ou não com pioglitazona (Pio, 30 mg/kg/dia). n = 3-12 camundongos por grupo. Dados representados como média ± EPM; letras diferentes acima das barras representam diferença estatística, p < 0,05.

Deficiência de Rictor/mTORC2 atenua o aumento no conteúdo de UCP-1 no TAM induzido pela Pio

Ao avaliar a morfologia do TAM, encontramos que as gotículas de gordura são menores em camundongos ARicKO em comparação aos ARicWT (Fig. 20a). O tratamento com Pio aumenta substancialmente o acúmulo de lipídeos no TAM dos camundongos ARicWT, reduzindo o caráter multilocular deste tecido (Fig. 20a). Embora a Pio também aumente o acúmulo de lipídeos nos adipócitos do TAM de camundongos ARicKO, este efeito foi de menor magnitude quando comparado aos camundongos ARicWT (Fig. 20a). Em associação a essas alterações, encontramos que o conteúdo de proteína por miligrama de tecido está elevado em camundongos ARicKO (Fig. 20b). A Pio reduz o conteúdo proteico por mg de tecido em ambos ARicWT e ARicKO, embora este conteúdo ainda é maior nos ARicKO (Fig. 20b). Não encontramos diferenças significativas no conteúdo total de proteína do TAM entre ARicWT e ARicKO (Fig. 20c). Por fim, a Pio aumenta o conteúdo total de proteínas em ARicWT, mas não em ARicKO (Fig. 20c). Também realizamos ensaios de captação de glicose *in vitro* com fragmentos de tecido adiposo, e encontramos, que em uma situação basal (sem insulina no meio) não há diferença na captação de glicose entre ARicWT e ARicKO (Fig. 20d). Já o tratamento com Pio aumenta a captação de glicose por miligrama de proteína em ARicWT, mas não em ARicKO (Fig. 20d). Ao normalizarmos a captação de glicose pela massa total do TAM, encontramos que ARicKO tem menor captação de glicose, e que a Pio aumenta a captação em ARicWT, mas não em ARicKO (Fig. 20e). Também avaliamos a lipólise *in vitro* pelo ensaio de liberação de glicerol por fragmentos do TAM e TAB inguinal. Encontramos que a lipólise está elevada no TAM de ARicKO tratados com Pio (Fig. 20f). A deleção de Rictor em adipócitos aumenta a lipólise no iTAB independentemente do tratamento com Pio (Fig. 20 g). Não há diferenças entre ARicWT e ARicKO no conteúdo de UCP-1 no TAM, mas o tratamento com Pio aumenta o conteúdo dessa proteína em ARicWT e em menor intensidade em ARicKO (Fig. 20hjk). O conteúdo das enzimas FAS e SCD1 está reduzido em ARicKO (Fig. 20hjk). A Pio reduz o conteúdo dessas proteínas em ARicWT, redução esta, que é exacerbada pela deleção de Rictor (Fig. 20hjk).

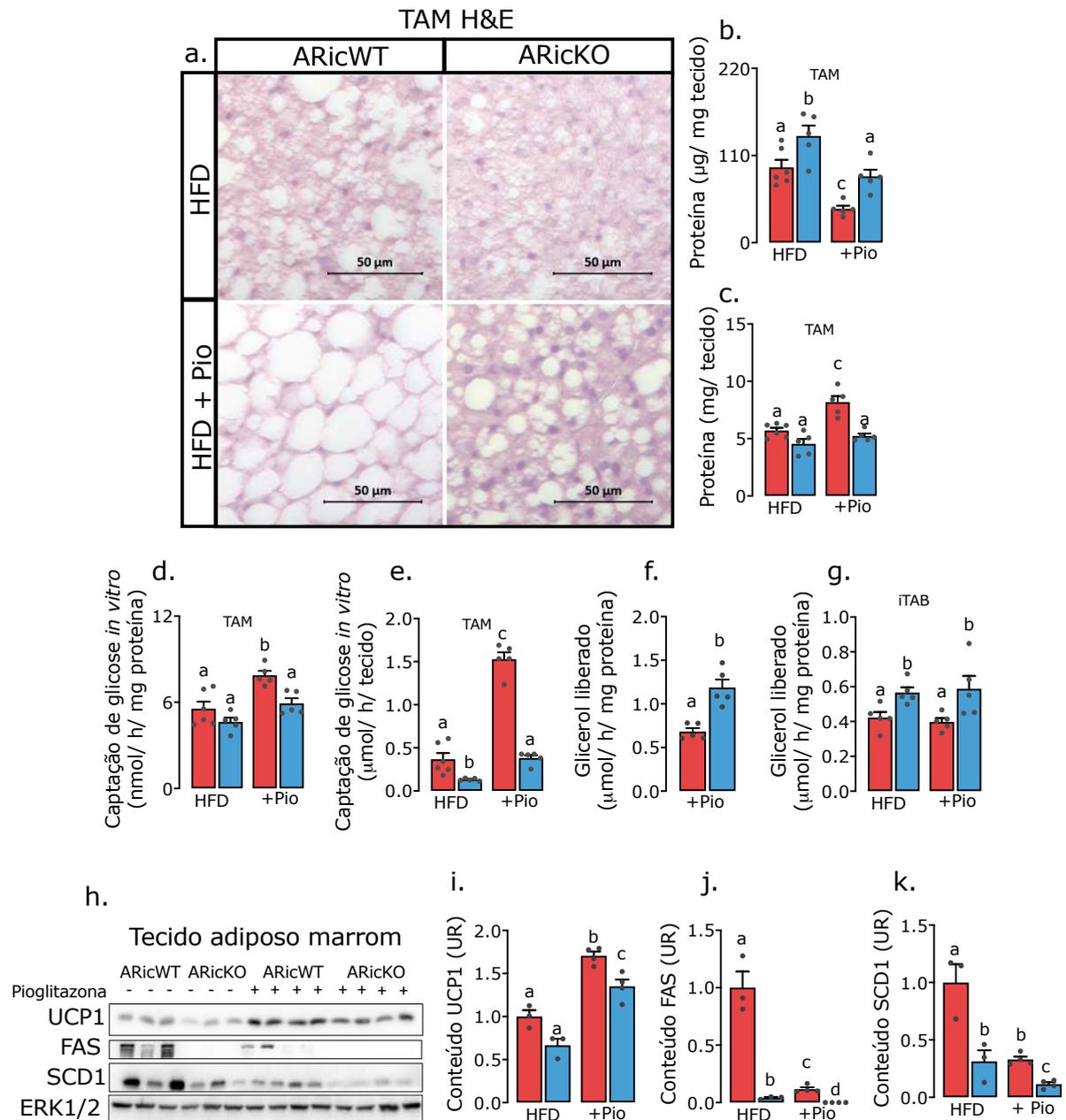


Figura 20. (a) Fotomicrografia representativa de secções do TAM corado com H&E, conteúdo de proteínas totais normalizado por (b) miligrama e por (c) massa total do TAM, ensaio de captação de glicose *in vitro* normalizado por (d) miligrama de proteínas e por (e) massa total do TAM, ensaio de liberação de glicerol por miligrama de proteína no TAM (f) e no iTAB (g), (h-k) conteúdo proteico de UCP-1, FAS e SCD1 no TAM de camundongos controles (ARicWT) e com deleção de Rictor em adipócitos (ARicKO) alimentados por oito semanas com dieta hiperlipídica (HFD) suplementada ou não com pioglitazona (Pio, 30 mg/kg/dia). $n=3-6$ camundongos por análise. Dados representados como média \pm EPM; letras diferentes acima das barras representam diferença estatística, $p < 0,05$.

Pio exacerba a esteatose hepática em camundongos ARicKO

O TAG sérico está reduzido nos camundongos ARicKO independentemente do tratamento, sem qualquer efeito da Pio (Fig. 21a). Os ácidos graxos livres séricos também estão reduzidos em camundongos ARicKO alimentados com HFD (Fig. 21b). O tratamento com a Pio reduz os ácidos graxos livres nos ARicWT, e em maior magnitude nos ARicKO (Fig. 21b). Encontramos que a lipólise está aumentada no TAM e iTAB de ARicKO tratados com Pio (Fig. 20fg), mas isso não reflete em aumento de ácidos graxos livre séricos (Fig. 21), o que sugere utilização destes por outros tecidos. Um possível destino dos ácidos graxos livres é o fígado, onde estes podem ser estocados ou oxidados para a produção de energia ou corpos cetônicos. Interessantemente, camundongos ARicKO alimentados com a HFD apresentaram esteatose hepática moderada, avaliada pela análise histológica da deposição de gordura no fígado (Fig. 21c). Apesar de não afetar a deposição de gordura no fígado de camundongos ARicWT, a Pio exacerbou a acúmulo de gordura e esteatose hepática em camundongos ARicKO (Fig. 21c). Não encontramos diferenças significativas no conteúdo de glicogênio no fígado de ARicWT e ARicKO avaliada pela coloração com PAS (Fig. 21c). Avaliamos também a função das mitocôndrias do fígado de camundongos ARicWT e ARicKO na presença do substrato succinato. Não encontramos alterações significativas na atividade da cadeia respiratória mitocondrial, como avaliado pelo Estado-3 mitocondrial induzido pelo ADP, pelo Estado-4 induzido pela inibição da ATP-sintase com oligomicina e pela respiração máxima do Estado-3u induzido pelo desacoplador CCCP entre os genótipos e tratamentos (Fig. 21d). Ainda, a razão do controle respiratório (RCR), que representa o acoplamento da cadeia respiratória, também não difere entre os grupos (Fig. 21e).

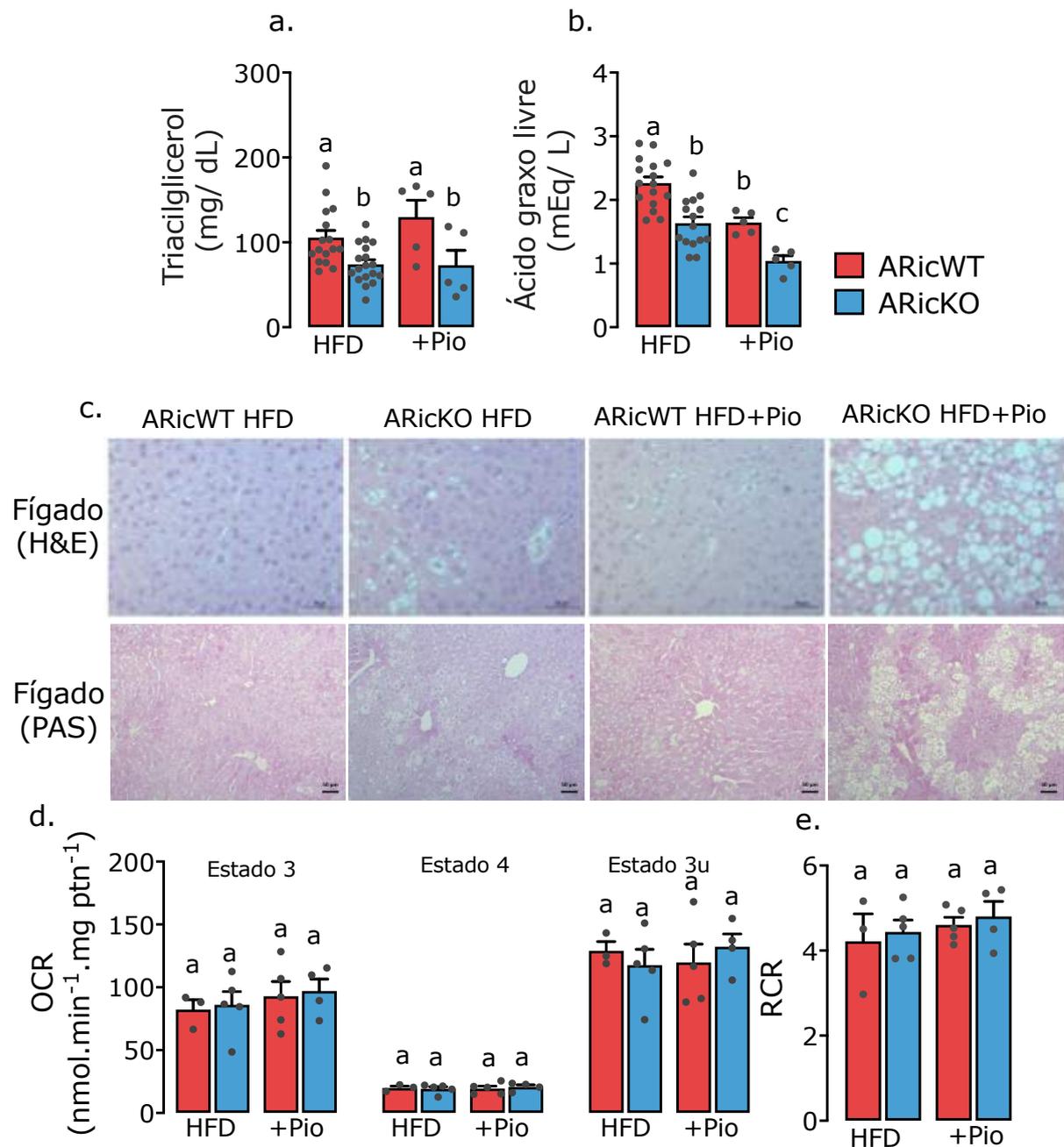


Figura 21. (a) Triacilglicerol e (b) ácido graxo livre circulantes, (c) fotomicrografia representativa de seções do TAM corado com H&E e PAS, (d) taxa de consumo de oxigênio e (e) razão do controle respiratório de mitocôndrias isoladas do fígado de camundongos controles (ARicWT) e com deleção de Rictor em adipócitos (ARicKO) alimentados por oito semanas com dieta hiperlipídica (HFD) suplementada ou não com pioglitazona (Pio, 30 mg/ kg/ dia). n =3-14 camundongos por grupo. Dados representados como média±EPM; letras diferentes acima das barras representam diferença estatística, $p < 0,05$.

Discussão

mTORC2 é ativada por fatores de crescimento e regula a proliferação, sobrevivência e o metabolismo celular [27]. Estudos anteriores demonstraram que a deleção de Rictor em adipócitos induz resistência à insulina e impede a expansão do tecido adiposo [65,146]. Neste estudo, nós produzimos camundongos com deleção de Rictor especificamente em adipócitos e desafiamos esses animais e seus controles com uma dieta hiperlipídica suplementada ou não com Pio. Em suma, a deficiência de Rictor/mTORC2 em adipócitos reduz o ganho de peso e adiposidade, promove resistência à insulina e hipersinulinemia. Por outro lado, o tratamento com Pio abole a resistência à insulina e a hipersinulinemia em camundongos com deficiência de Rictor em adipócitos, efeitos que foram associados a um aumento significativo da esteatose hepática. Ou seja, enquanto a Pio melhora a homeostase da glicose em camundongos controles promovendo redistribuição de gordura do tecido adiposo visceral para o TAM principalmente, em camundongos com deficiência de Rictor em adipócitos, a Pio melhora a homeostase da glicose promovendo maior deposição de lipídeos no fígado como resultado do bloqueio da expansão do TAM devido a deficiência de mTORC2.

A Pio e a insulina aumentam, independentemente, a fosforilação da Akt em Ser473 no TAM de camundongos alimentados com HFD. Surpreendentemente, encontramos que a Pio e a insulina têm efeito sinérgico no aumento da fosforilação da Akt no TAM, o que pode, portanto, amplificar os efeitos da via de sinalização da PI3k-mTORC2-Akt. Como esperado, a deficiência de Rictor/mTORC2 em adipócitos reduz ou abole totalmente o aumento do conteúdo de Akt fosforilada em Ser473 induzida por insulina, Pio ou sua combinação.

Por meio do uso de diferentes modelos genéticos de deleção de Rictor em adipócitos, estudos demonstraram que Rictor/mTORC2 é essencial na manutenção da massa do TAM e necessário para a expansão da massa dos TABs induzida por dietas hiperlipídicas [113,146,148]. Corroborando estes estudos, encontramos que a deleção de Rictor em adipócitos não só reduz a massa do TAM e dos TAB inguinal, epididimal e retroperitoneal, mas também atenua o aumento de massa do TAM induzido pela Pio. Mecanicamente, a Pio parece aumentar a massa do TAM promovendo os processos de hipertrofia, evidenciado pelo aumento no número de adipócitos uniloculares e redução no conteúdo relativo de proteína por miligrama de tecido, bem como, hiperplasia dos adipócitos, evidenciado pelo aumento no conteúdo

total de proteína do TAM. Interessantemente, deficiência de Rictor em adipócitos reduz todas essas ações da Pio, sugerindo que mTORC2 é um mediador importante tanto do acúmulo de lipídeos que determina a hipertrofia quanto do aumento do número de células do TAM induzidos pela ativação farmacológica da PPAR γ .

Estudos prévios demonstraram que a ativação farmacológica de PPAR γ promove hipertrofia dos adipócitos marrons devido ao aumento da capacidade do TAM de captar e estocar lipídeos circulantes via aumento da atividade da LPL, e enzimas envolvidas na geração de glicerol 3-fosfato e síntese de TAG [31,159,180]. Nossos achados sugerem então que mTORC2 pode ser um mediador importante dessas ações da Pio, hipótese esta que será investigada em estudos futuros. Nossos dados indicam também que o processo de lipogênese *de novo* parece não participar da deposição de lipídeos nos adipócitos marrons induzida pela Pio, como evidenciado pela importante redução no conteúdo da FAS e SCD-1 no TAM após tratamento com este ligante.

Além da deposição de lipídeos, o aumento de massa do TAM induzido pela Pio pode envolver também um possível aumento no número de adipócitos marrons, como pode ser evidenciado pelo aumento no conteúdo total de proteínas deste tecido. Interessantemente, a deficiência de Rictor em adipócitos aboliu este aumento no conteúdo de proteínas totais do TAM, sugerindo que mTORC2 é um importante mediador dessas ações da Pio. Aumento no número de células de determinado tecido resulta de maior proliferação celular e/ou menor apoptose, processos que foram mostrados em estudos prévios sofrerem regulação por mTORC2 [27,222,223]. Importante ressaltar que a deficiência de mTORC2 em adipócitos também reduziu o aumento do conteúdo de células do TAM em camundongos aclimatados ao frio (Capítulo II), sugerindo que a participação de mTORC2 neste processo independe do estímulo desencadeador: ativação adrenérgica no frio ou ativação farmacológica de PPAR γ com Pio. Em conjunto, esses resultados sugerem que mTORC2 é um importante mediador da expansão do TAM.

Um outro achado importante de nosso estudo foi que a Pio melhora a sensibilidade à insulina em camundongos com deficiência de Rictor em adipócitos como evidenciado pelo aumento da sensibilidade à insulina e bloqueio completo do aumento na insulina sérica de jejum. Os mecanismos pelos quais a deleção de Rictor em adipócitos promove resistência à insulina são ainda desconhecidos. Considerando

que mTORC2 é um importante ativador da Akt e captação de glicose mediada por GLUT-4 em adipócitos [141,146,224], podemos sugerir que a resistência à insulina apresentada por camundongos ARicKO resulta da inabilidade da insulina de estimular a captação de glicose em adipócitos. Assumindo que este mecanismo seja verdadeiro, a reduzida captação de glicose pelo TAB resultaria em hiperglicemia, que promoveria uma hiperinsulinemia compensatória e assim resistência à insulina. A ausência de alterações significativas na glicemia de jejum e na tolerância à glicose entre camundongos ARicWT e ARicKO, entretanto, sugerem o envolvimento de outros mecanismos. Uma outra possibilidade ainda não explorada é que a hiperinsulinemia, mas não a hiperglicemia é o evento primário no desenvolvimento da resistência à insulina em camundongos ARicKO. Assim, a deficiência de mTORC2 em adipócitos, por mecanismos desconhecidos que podem envolver a liberação de metabólitos ou a função endócrina do tecido adiposo, promoveria um aumento na secreção (aumento na massa das ilhotas pancreáticas) e/ou redução da degradação da insulina resultando em hiperinsulinemia e resistência à insulina. Estas hipóteses serão testadas em estudos futuros. Importante ressaltar que nossos resultados de hiperinsulinemia e aumento da massa das ilhotas estão em pleno acordo com os dados prévios de Cybulski [141] e Kumar [114] obtidos em camundongos com deleção de Rictor utilizando a enzima Cre sob controle do promotor do *aP2/Fabp4*. Interessantemente, a P_{io} melhorou a sensibilidade à insulina, reduziu a insulina sérica de jejum e a área das ilhotas pancreáticas em camundongos com deficiência de Rictor em adipócitos, apesar de promover maior deposição de lipídeos no fígado. Essa esteatose hepática provavelmente resulta da incapacidade da P_{io} de promover a deposição de lipídeos e expansão do TAM devido a deficiência de mTORC2 em adipócitos, bem como, da ativação de PPAR γ em hepatócitos, resultando no direcionamento e otimização do estoque de ácidos graxos no fígado. Estudos prévios demonstraram que a esteatose hepática está associada com um aumento na expressão de PPAR γ em hepatócitos [225,226], um fator de transcrição que promove a expressão de diversas enzimas envolvidas no transporte de ácidos graxos e síntese de triacilglicerol potencializando a deposição de lipídeos nestas células. O impacto dessa potencialização da esteatose induzida pela P_{io} na função hepática precisa ser melhor avaliada.

Uma das perguntas que surgiram a partir dos resultados obtidos neste trabalho

é: Como que Rictor/mTORC2 em adipócitos modula a atividade de PPAR γ no TAM? Um dos possíveis mecanismos pode envolver FoxO1, um fator de transcrição que modula a atividade transcricional de PPAR γ [227,228]. Mecanicamente, a ativação da Akt pela via da insulina/PI3K/mTORC2 leva à fosforilação de FoxO1, impedindo sua entrada no núcleo. Na ausência dessa fosforilação, FoxO1 é direcionada ao núcleo onde promove atraso no ciclo celular, resistência ao estresse e apoptose [27]. Estudos prévios mostraram que a ativação de FoxO1 inibe a adipogênese [229], a expressão de PPAR γ , bem como a ligação de PPAR γ no DNA por um mecanismo de interação proteína-proteína, impedindo assim, a heterodimerização de PPAR γ com RXR [229,230]. De fato, um estudo recente demonstrou que a inibição de FoxO1 aumenta a massa do TAM, que antes estava reduzida em camundongos com deleção de Rictor em células que expressam UCP-1 [231]. Estudos adicionais são necessários para investigar o envolvimento de FoxO1 como mediador da inibição de PPAR γ associada à deficiência de mTORC2.

Conclusão

mTORC2 em adipócitos é um importante mediador da expansão de massa do TAM, mas não da melhora na sensibilidade à insulina induzida pela ativação farmacológica de PPAR γ com Pio. Surpreendentemente, bloqueio da expansão do TAM induzido pela Pio resultou na maior deposição de lipídeos no fígado. Estudos adicionais serão necessários para investigar os mecanismos que determinam a comunicação entre tecido adiposo e fígado.

Capítulo IV

A deficiência de Rictor/mTORC2 em adipócitos prejudica a melhora na sensibilidade à insulina induzida por uma dieta hiperlipídica rica em ácidos graxos ω -3

Introdução

Uma das hipóteses sugeridas para explicar o aumento da prevalência do sobrepeso e/ou obesidade em humanos observado nas últimas décadas é o aumento da ingestão de ácidos graxos saturados e poli-insaturados (PUFA, *polyunsaturated fatty acids*) ômega-6 (ω -6) em detrimento de PUFA ômega-3 (ω -3) [232–234]. Durante a maior parte da evolução humana a ingestão de PUFA seguiu a razão de ω -6/ ω -3 de 1:1, mas nas últimas décadas houve uma inflexão positiva no consumo de ω -6, e atualmente a razão ω -6/ ω -3 ultrapassa 20:1 [233]. Ao contrário dos ácidos graxos saturados e ω -6, os ácidos graxos ω -3 reduzem a hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia, aumentam a sensibilidade à insulina, reduzem a inflamação, aumentam a capacidade respiratória e a oxidação mitocondrial de ácidos graxos no tecido adiposo, entre outros efeitos benéficos [235–238]. Estudos indicam que os ω -3 podem ou não melhorar a resistência insulínica em humanos a depender da dose, tempo e da presença de síndrome metabólica [239]. Os mecanismos de ação dos ω -3 nos tecidos adiposos, na homeostase da glicose e no ganho de massa corporal ainda não foram completamente elucidados.

Ácidos graxos poli-insaturados ω -3 são naturalmente encontrados em peixes marinhos que se alimentam de fitoplâncton que sintetizam os ω -3 [239]. Embora não sejam sintetizados por mamíferos, os ω -3 são obtidos pela alimentação ou pela suplementação, principalmente, na forma de óleo de peixe [239]. Os ω -3 são os ácidos linolênico (ALA, 18:3 n3), eicosapentaenoico (EPA, 20:5-n3), docosaexaenoico (DHA, 22:6 n-3) e o docosapentaenoico (DPA, 22:5 n-3). Entre estes ácidos graxos ω -3, os mais estudados são o EPA e DHA [240].

A obesidade visceral é caracterizada por um quadro de inflamação crônica de baixa intensidade que afeta principalmente o tecido adiposo, mas também o intestino, pâncreas, entre outros tecidos [67]. Diversos sinais participam no desenvolvimento da inflamação associada à obesidade, como por exemplo, a maior absorção intestinal de lipopolissacarídeo (LPS) oriundo de bactérias Gram negativas, estresse mecânico, hipóxia tecidual e morte de adipócitos devido a hipertrofia exagerada, bem como a ativação de vias de sinalização pró-inflamatórias, como as do receptor Toll-like 4 e 2 e do inflamassoma por ácidos graxos saturados [78,241]. Enquanto que uma dieta rica em ácidos graxos saturados promove resistência insulínica e inflamação, em contrapartida, um dieta enriquecida com ácidos graxos ω -3 exerce potentes efeitos

anti-inflamatórios [236,239,242,243]. Entre os mecanismos propostos de redução da inflamação pelos ácidos graxos ω -3 estão a ativação do receptor de lipídeos GPR120 [244] e/ou do fator de transcrição PPAR γ [245], bem como a produção de mediadores lipídicos anti-inflamatórios como as resolvinas, protectinas e maresinas, a inibição da síntese de eicosanoides, entre outros [239,246].

Como mencionado no capítulo anterior, PUFAs (EPA e DHA) são ligantes endógenos de PPARs, e muitas das funções dos ácidos graxos ω -3 nos tecidos adiposos é creditada à ação de PPAR γ . Nesse sentido, nosso grupo de pesquisa demonstrou que a inibição farmacológica de PPAR γ em camundongos transgênicos *Fat-1* (camundongos que expressam uma dessaturase que converte ω -6 em ω -3) impede a melhora na tolerância à glicose induzida pelos ácidos graxos ω -3 [245]. Como mencionado anteriormente, PPAR γ é expresso principalmente e participa ativamente no controle da função de adipócitos. Um dos mecanismos pelos quais ácidos graxos ω -3 melhoram a homeostase da glicose envolve a maior secreção de adiponectina pelos adipócitos por um mecanismo dependente de PPAR γ [246]. A adiponectina é um hormônio que aumenta a sensibilidade à insulina e reduz a inflamação tecidual, melhorando a homeostase da glicose [247–249].

Além da homeostase da glicose, a ingestão de dieta rica em ácidos graxos ω -3 reduz o ganho de peso e adiposidade e, portanto, protege camundongos do desenvolvimento da obesidade induzida pela ingestão de dieta hiperlipídica. Interessantemente, a ingestão de dieta rica em ácidos graxos ω -3 protege contra o ganho de peso sem alterar a ingestão e absorção calóricas, o que indica um aumento de gasto energético como mecanismo responsável [236,250]. Diversos estudos encontraram que enriquecimento da dieta com ácidos graxos ω -3 aumenta a expressão de UCP-1 e de marcadores termogênicos no TAB e TAM, sugerindo o envolvimento da termogênese independente do tremor muscular no aumento de gasto energético induzido por estes ácidos graxos [251–253]. Com o objetivo de testar esta hipótese, nosso laboratório alimentou camundongos controles e com deficiência de UCP-1 com dieta rica em ácidos graxos ω -3. Interessantemente, a deficiência de UCP-1 não impediu a redução no ganho de massa corporal, melhora a homeostase da glicose (GTT e ITT) e aumento do gasto energético de camundongos induzidos pela ingestão de dieta rica em ácidos graxos ω -3 [250]. Em conjunto, estes dados sugerem que os efeitos benéficos dos ácidos graxos ω -3 protegendo contra a

obesidade e melhorando a homeostase da glicose ou não envolvem UCP-1 ou na ausência desta proteína mecanismos compensatórios são recrutados.

mTOR e ω -3

Um estudo recente demonstrou que a via PI3K-mTORC2-Akt está aumentada e participa nas ações de EPA e DHA no tecido adiposo de camundongos alimentados com dieta rica em frutose [254]. Outro estudo demonstrou que a oxilipina 12-HEPE, um produto da oxidação de EPA pela 12-LOX é secretada por adipócitos marrons sob estímulo adrenérgico e estimula a captação de glicose no TAM e músculo esquelético *in vivo*, e em adipócitos brancos *in vitro*, mas não no iTAB *in vivo* [63]. Nesse mesmo estudo, foi encontrado *in vitro* que 12-HEPE aumenta a atividade de mTORC2 e promove a captação de glicose em adipócitos marrons por um mecanismo dependente de PI3K [63]. Um estudo do grupo do professor Jerrold Olefsky descobriu que o receptor acoplado à proteína G GPR120 é um receptor de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa que medeia os efeitos anti-inflamatórios dos PUFAs [244]. Ainda, demonstrou que a ativação de GPR120 por ω -3 estimula a fosforilação de Akt em Ser473 via PI3K, aumenta a captação de glicose e translocação de GLUT-4 em adipócitos, além de inibir a inflamação tecidual induzida por macrófagos [244]. Curiosamente, a ativação de PI3K mediada por GPR120 acontece via proteína Gq/11 e não por IRS-1, funcionalmente, isso é traduzido pela ausência de efeito aditivo de insulina com ω -3 na captação de glicose e fosforilação de Akt em Ser473 em adipócitos [244]. Em conjunto estes estudos sugerem que ácidos graxos ω -3 podem exercer seus efeitos benéficos na homeostase da glicose promovendo a ativação de mTORC2 e Akt.

Hipótese

A ingestão de dieta hiperlipídica enriquecida com ácidos graxos ω -3 reduz o ganho de peso corporal e adiposidade e melhora a homeostase da glicose por mecanismos dependentes de mTORC2 em adipócitos.

Objetivo

Investigar o envolvimento de mTORC2 de adipócitos como um possível mediador da proteção contra o ganho de peso e melhora na homeostase da glicose induzida pela ingestão de dieta rica em ácidos graxos ω -3.

Material e métodos

Desenho experimental

Camundongos ARicWT e ARicKO machos de 8 semanas de idade foram alimentados *ad libitum* com dieta hiperlipídica contendo 60% das calorias provenientes da banha de porco (HFD) ou dieta hiperlipídica com 60% das calorias provenientes do óleo de peixe (HF ω 3) por 8 semanas e mantidos a $23 \pm 2^\circ\text{C}$ em ciclo claro/escuro de 12 h/12 h (ciclo claro com início às 07h00) (Figura 22). Ambas dietas são compostas por 20% de carboidratos, 20% de proteínas e 60% de gorduras, em kcal. As composições da HFD e HF ω -3 estão descritas na Tabela 5. As amostras de tecidos adiposos, fígado, músculo gastrocnêmio e soro foram obtidas após 12 h de restrição alimentar *overnight*, anestesia com isoflurano e eutanásia por exsanguinação.

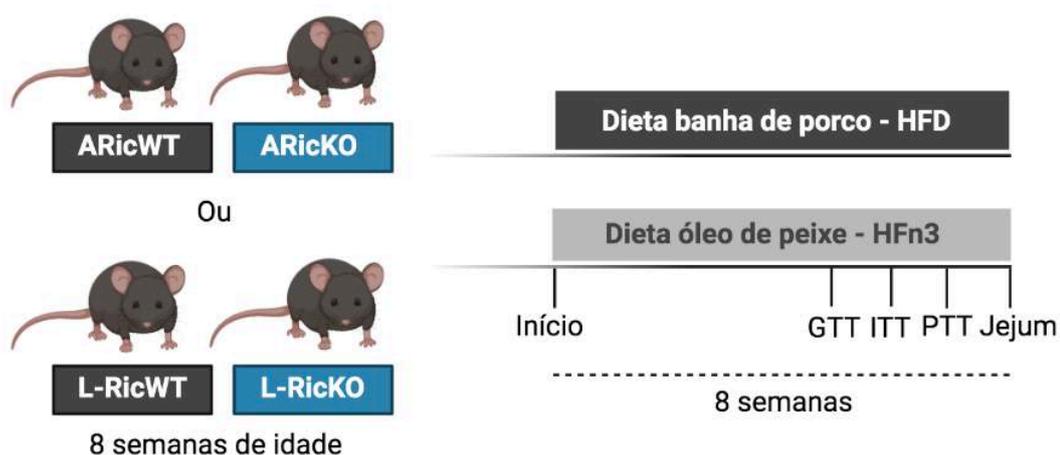


Figura 22. Desenho experimental do Capítulo IV.

Tabela 5. Composição da HFD e HF_n3

	HFD	HF_n3
Ingrediente	g/kg	g/kg
Caseína	258,4	258,4
L-cistina	3,9	3,9
Maltodextrina	161,5	161,5
Sacarose	88,9	88,9
Celulose	74,1	74,1
Óleo de soja	32,3	32,3
Banha de porco	316,6	0
Óleo de peixe	0	316,6
Mix mineral AIN93M	47,9	47,9
Mix vitamínico	13,7	13,7
Bitartarato de colina	2,6	2,6
Total (g)	1000	1000
kcal	5231	5231
Carboidratos (% de kcal)	20	20
Lipídeos (% de kcal)	60	60
Proteínas (% de kcal)	20	20

Cromatografia gasosa

Aproximadamente 10 mg das diferentes rações foram analisadas para o perfil de ácidos graxos por reação de transesterificação para CG/FAME como previamente descrito [255]. Brevemente, lipídeos das dietas foram extraídos com clorofórmio:metanol (2:1). Posteriormente a fração clorofórmio foi misturada com metanol (1,76 mL), ácido margárico 1 mg/mL (50 µL), cloreto de acetila (100 µL) e aquecido a 100°C por 60 min. Após o resfriamento, foi adicionado hexano (1,5 mL) e os tubos foram agitados vigorosamente e centrifugados a 1500 g por 2 min a 4°C. A fase orgânica superior foi coletada e evaporada sob nitrogênio líquido e o resíduo foi dissolvido em 40 µL de hexano. 1 µL das amostras foi injetado individualmente em um cromatógrafo a gás (Trace 1310 – Thermo Scientific) com detector de ionização em chama, usando uma coluna capilar (DB-FFAP, 15 m × 0.1 mm id × 0.1 µm, Agilent Technologies). Éster metílico de ácidos graxos (FAME) foi identificado pela comparação direta com FAME standard mix (Supelco 37 Component FAME Mix; Sigma-Aldrich), individualmente os picos foram integrados e normalizados pelo

padrão interno. A porcentagem de FAME individual foi calculada em relação à área total dos picos Tabela 6.

Tabela 6. Composição de ácidos graxos da HFD e HF ω 3 (mg/g)

Ácido graxo	HFD	HFω3
C14:0	4	23
C14:1	nd	nd
C16:0	73	60
C16:1	6	27
C17:1	nd	1
C18:0	37	12
C18:1	128	38
C18:2n-6	65	21
C18:3n-3	4	4
C20:0	1	1
C20:1n-9	3	4
C20:2n-6	2	1
C20:3n-6	nd	1
C20:4n-6	nd	3
C20:5n-3	nd	47
C22:0	nd	1
C22:1n-9	nd	2
C22:6n-3	nd	29
C24:1	nd	nd
Somatório saturados	120,6 (36%)	106,3 (36%)
Somatório monoinsaturados	143,4 (43%)	82,1 (28%)
Somatório poli-insaturados ω -6	66,7 (20%)	25,3 (9%)
Somatório poli-insaturados ω -3	3,8 (1%)	80,6 (27,3%)
Razão ω -6/ ω -3	17,5	0,31

Consumo de oxigênio tecidual

Tecido adiposo inguinal ou marrom, ~10 ou ~3 mg respectivamente, foram avaliados para consumo de oxigênio basal durante 10 min em respirômetro de alta resolução Oxygraph-2K (Oroboros, Áustria) em meio DMEM contendo 25 mM glicose e 4% BSA aquecido a 37°C [21]. A taxa de consumo de oxigênio foi calculada pela velocidade de decaimento da concentração de oxigênio em função do tempo (*slope*) e expressos por miligrama de tecido (nmol/ min/ mg) e por massa total.

Homeostase da glicose

Os testes de GTT e ITT e a insulinemia foram avaliados essencialmente como descrito no Capítulo III.

Teste de tolerância ao piruvato intraperitoneal (ipPTT): o ipPTT foi avaliado como a área sob a curva (AUC) da glicemia após a administração de piruvato (2 g/ kg de massa corporal) em função do tempo (min). Para isso, após 7 semanas de tratamento, camundongos foram privados de alimento por 16 h, a glicemia foi mensurada antes e 15, 30, 45, 60 e 90 min após a administração intraperitoneal de piruvato. A glicemia caudal foi mensurada com glicosímetro One Touch Select Plus Flex (Johnson & Johnson, Brasil).

Western blotting, histologia, medida de TAG e glicerol circulantes e análise estatística foram realizados essencialmente como descrito na seção “Material e métodos” do Capítulo III.

Resultados

Dieta HF_n3 aumenta a atividade de mTORC2 no iTAB, mas não no TAM

Iniciamos este estudo avaliando a atividade de mTORC2 nos TAM e TAB inguinal de camundongos controles (ARicWT) e com deleção de Rictor especificamente em adipócitos (ARicKO) alimentados por 8 semanas com uma dieta rica em lipídeos proveniente da banha de porco (HFD) ou do óleo de peixe (HF_n3). Ao fim da intervenção dietética encontramos, como esperado, que a deleção de Rictor em adipócitos reduz o conteúdo dessa proteína no TAM de ARicKO alimentados tanto com HFD quanto com HF_n3 (Fig. 23AB). Importante ressaltar que o conteúdo residual da proteína Rictor observado no TAM em ARicKO pode ser em decorrência de macrófagos e outras células que compõe este tecido, que não os adipócitos maduros. Como esperado devido a deleção de Rictor, o conteúdo de Akt fosforilada em Ser473 é reduzido no TAM de camundongos ARicKO independentemente da dieta (Fig. 23AB). A ingestão de dieta rica em óleo de peixe não alterou o conteúdo de Akt

fosforilada e assim a atividade de mTORC2 no TAM de camundongos ARicWT (Fig. 23AB). Similarmente ao TAM, camundongos ARicKO apresentaram conteúdo reduzido de Akt fosforilada em Ser473 no TAB inguinal independentemente da dieta. Em contraste ao TAM, entretanto, a ingestão de dieta HFn3 aumentou a atividade de mTORC2 avaliada pelo conteúdo de Akt fosforilada em Ser473 no TAB inguinal de ARicWT, aumento este, que é totalmente abolido pela deleção de Rictor em adipócitos (Fig. 23CD).

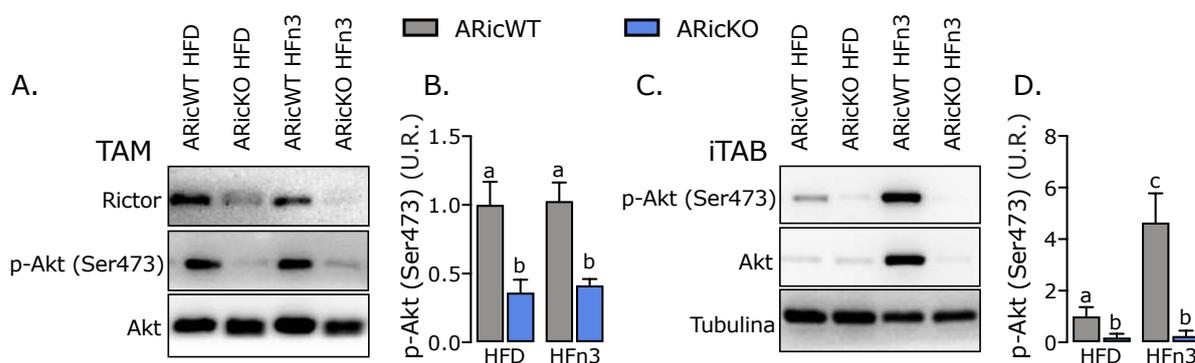


Figura 23. Conteúdo proteico de Rictor, Akt fosforilada em Ser473 e Akt Total no (A) TAM e (B) iTAB de camundongos controles (ARicWT) e com deleção de Rictor em adipócitos (ARicKO) alimentados por oito semanas com HFD ou HFn3. $n=5-6$ camundongos por grupo. Dados representados como média \pm EPM; letras diferentes acima das barras representam diferença estatística, $p < 0,05$.

Deleção de Rictor em adipócitos reverte parcialmente a redução de ganho de peso induzida pela ingestão de dieta HFn3

Como demonstrado anteriormente (Capítulo III), camundongos ARicKO são parcialmente resistentes ao ganho de massa corporal induzido por uma dieta hiperlipídica produzida com banha de porco (Fig. 24AB). Camundongos ARicWT praticamente não ganham massa corporal, enquanto camundongos ARicKO ganham aproximadamente 2,86 g de massa corporal após ingestão da dieta HFn3 por 8 semanas (Fig. 24AB). Essas diferenças no ganho de massa corporal são independentes de quaisquer diferenças no consumo alimentar (Fig. 24CD). Camundongos ARicKO tem menor massa de TAM, eTAB, iTAB e rTAB em comparação com ARicWT alimentados com HFD (Fig. 24EF). A dieta HFn3 reduz a massa do TAM nos camundongos ARicWT, e as massas do eTAB, iTAB, rTAB em ambos ARicWT e ARicKO (Fig. 24EF). A massa hepática é maior em ARicKO na HFD

(Fig. 24G). Curiosamente, a dieta HF_n3 aumenta a massa do fígado em camundongos ARicWT, mas não ARicKO (Fig. 24G). A massa do músculo gastrocnêmio não é alterada pelo genótipo ou dieta (Fig. 24H). Análise histológica revelou que os adipócitos marrons de ARicWT e ARicKO na HFD preservam o caráter multilocular, embora os adipócitos marrons de ARicKO tenham menor deposição de gordura (Fig. 24I). A dieta rica em óleo de peixe reduz drasticamente a deposição de lipídeos e tamanho das gotículas de gordura dos adipócitos marrons de camundongos ARicWT e ARicKO (Fig. 24I). Os adipócitos do TAB inguinal são menores em ARicKO alimentados com HFD em comparação com ARicWT (Fig. 24J). A dieta HF_n3 reduz o tamanho dos adipócitos em ARicWT e ARicKO (Fig. 24J). Encontramos adipócitos multiloculares (*beige-like*, parecidos com bege) no TAB inguinal de camundongos ARicWT, mas não em ARicKO (Fig. 24J). O padrão de distribuição desses adipócitos multiloculares no iTAB era setorizado, não uniforme em toda a lâmina e foi encontrado em 75% (3/4) dos cortes histológicos, enquanto que encontramos 0% (0/4) nos outros grupos experimentais (Fig. 24J). Por fim, avaliamos a taxa de consumo de oxigênio (OCR) em pequenos fragmentos de iTAB e TAM na presença de glicose. Na HFD, o OCR não difere entre ARicWT e ARicKO, enquanto que a dieta HF_n3 aumenta o OCR em ambos os genótipos (Fig. 24K). Diferentemente do TAM, o TAB inguinal de ARicKO tem reduzido OCR em relação a ARicWT na HFD (Fig. 24L). A dieta HF_n3 também aumenta o consumo de oxigênio no iTAB de camundongos ARicWT, mas não em ARicKO (Fig. 24L).

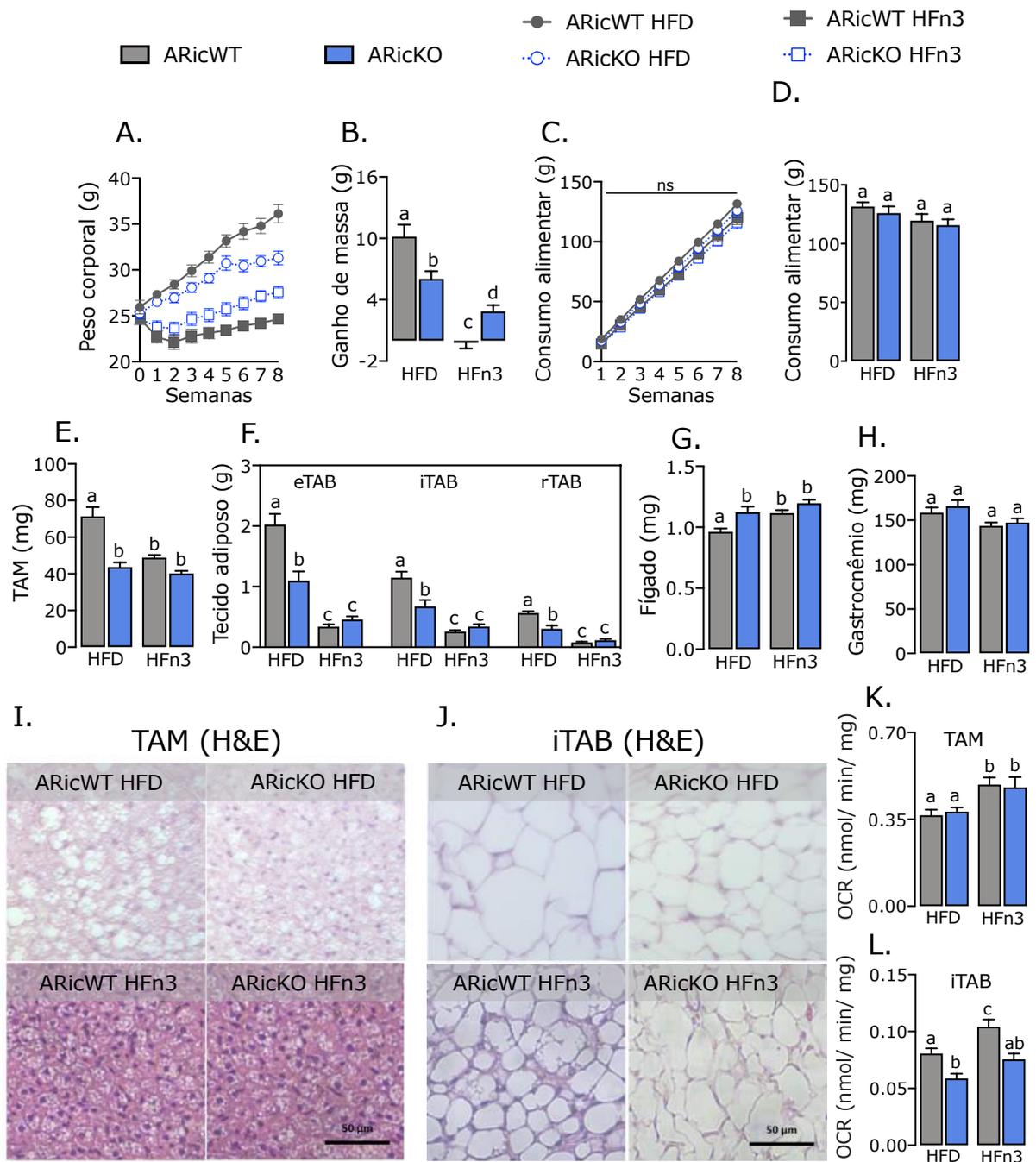


Figura 24. (A) Curva de ganho de massa corporal, (B) ganho de massa corporal, (C) curva de consumo alimentar, (D) consumo alimentar total, massas dos tecidos adiposos (E) marrom, (F) brancos epididimal, inguinal e retroperitoneal, massa do (G) fígado e (H) músculo gastrocnêmio, fotomicrografias de seções coradas com hematoxilina e eosina do (I) TAM e (J) iTAB, e consumo de oxigênio de fragmentos de tecido adiposo (K) branco inguinal e (L) marrom) de camundongos controles (ARicWT) e com deleção de Rictor em adipócitos (ARicKO) alimentados por oito semanas com HFD ou HFN3. $n=5-6$ camundongos por grupo. Dados representados como média \pm EPM; letras diferentes acima das barras representam diferença estatística, $p < 0,05$.

Dieta rica em óleo de peixe melhora a resistência à insulina por mecanismos parcialmente dependentes de mTORC2 em adipócitos

Como ilustrado na Figura 25, camundongos ARicWT e ARicKO alimentados com HFD apresentam similar tolerância à glicose (Fig. 25AC). Ainda, a dieta HFn3 aumenta a tolerância à glicose em ambos os genótipos, como avaliado pela menor área sob a curva do GTT (Fig. 25BC). No ITT, encontramos que camundongos ARicKO são resistentes à insulina na HFD (Fig. 25DF). A ingestão de dieta HFn3 aumenta a sensibilidade à insulina em camundongos ARicWT, efeito este, que foi de menor magnitude em ARicKO (Fig. 25EF). Ainda, a gliconeogênese, avaliada pela área sob a curva no teste de tolerância ao piruvato, não difere entre ARicWT e ARicKO alimentados com HFn3 (Fig. 25GH). A glicemia de jejum dos camundongos ARicKO é maior do que nos ARicWT tanto na HFD quanto na HFn3 (Fig. 25I). Após duas horas de acesso livre à comida, a glicemia de ARicKO não difere de ARicWT na HFD (Fig. 25I). Na HFn3, a glicemia de ARicKO após a realimentação é maior do que a aferida em ARicWT (Fig. 25I). A concentração sérica de insulina é maior em ARicKO na HFD em relação a ARicWT (Fig. 25J). A dieta HFn3 reduz a insulina circulante de ARicWT e ARicKO, embora a insulinemia de ARicKO ainda seja maior que a de ARicWT (Fig. 25J).

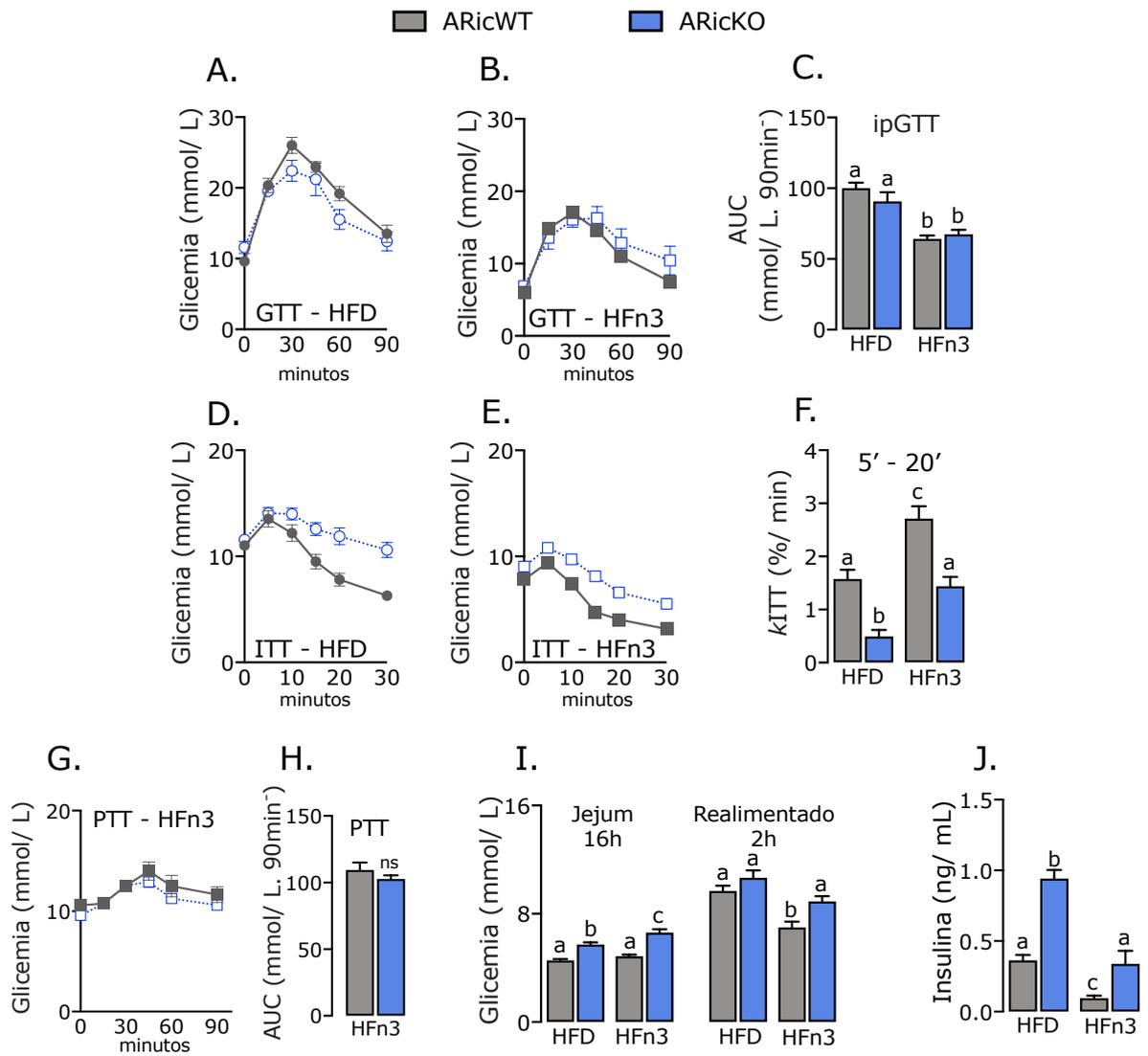


Figura 25. (A, B) Curva do teste de tolerância à glicose, (C) área sob a curva do GTT, (D,E) teste de tolerância à insulina, (F) taxa de decaimento da glicemia por min do ensaio de ITT, (G) teste de tolerância ao piruvato, (H) área sob a curva do PTT, (I) glicemia de jejum e realimentado e (J) insulinemia de camundongos controles (ARicWT) e com deleção de Rictor em adipócitos (ARicKO) alimentados por oito semanas com HFD ou HFn3. $n=5-6$ camundongos por grupo. Dados representados como média \pm EPM; letras diferentes acima das barras representam diferença estatística, $p < 0,05$.

Rictor/mTORC2 em adipócitos não é necessário para a redução de citocinas pró-inflamatórias induzidas pela dieta rica em óleo de peixe

Camundongos com deleção de Rictor em adipócitos alimentados com HFD têm menor conteúdo das citocinas $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 e IL-10 no TAB epididimal (Fig. 26A-D). A dieta HFn3 reduz o conteúdo dessas citocinas no eTAB de camundongos ARicWT, sem diferenças com ARicKO (Fig. 26A-D).

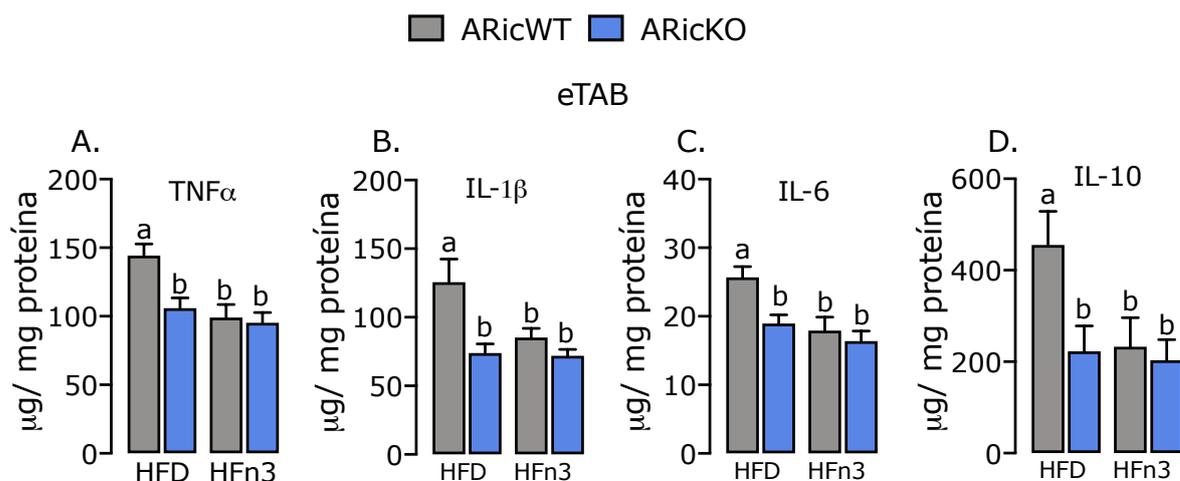


Figura 26. Conteúdo em micrograma de (A) $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, (C) IL-6 e (D) IL-10 por miligrama de proteína de homogenato de TAB epididimal de camundongos controles (ARicWT) e com deleção de Rictor em adipócitos (ARicKO) alimentados por oito semanas com HFD ou HFn3. $n=5-6$ camundongos por grupo. Dados representados como média \pm EPM; letras diferentes acima das barras representam diferença estatística, $p < 0,05$.

Dieta rica em óleo de peixe protege camundongos ARicKO da esteatose hepática por mecanismo dependente de mTORC2, mas não de mTORC1

Na HFD, camundongos com deleção de Rictor em adipócitos apresentam reduzida concentração sérica de TAG e ácidos graxos livres (Fig. 27AB). A ingestão de dieta HFn3 reduz TAG e ácidos graxos livres em camundongos ARicWT, mas não em camundongos ARicKO (Fig. 27AB). A dieta HFD promove o desenvolvimento de uma acentuada esteatose hepática em camundongos ARicKO, efeito este, que é revertido pela dieta HFn3 (Fig. 27C). Ainda, camundongos com deleção de Rictor em adipócitos alimentados com HFD apresentam aumento no conteúdo hepático das proteínas Rictor, Akt fosforilada em resíduo de serina 473, S6 fosforilada em serina

244/246 e da enzima FAS (Fig. 27D-G). A dieta HFn3 reduz o conteúdo dessas proteínas no fígado de camundongos ARicWT e ARicKO, com exceção da S6 fosforilada que se mantém elevada (Fig. 27D-G). Esses resultados sugerem que a ativação da sinalização mediada por mTORC2 e 1 conduz à esteatose hepática pela ativação da via da lipogênese *de novo* no fígado de camundongos ARicKO e que a dieta HFn3 reverte este quadro via inibição de mTORC2, e não mTORC1.

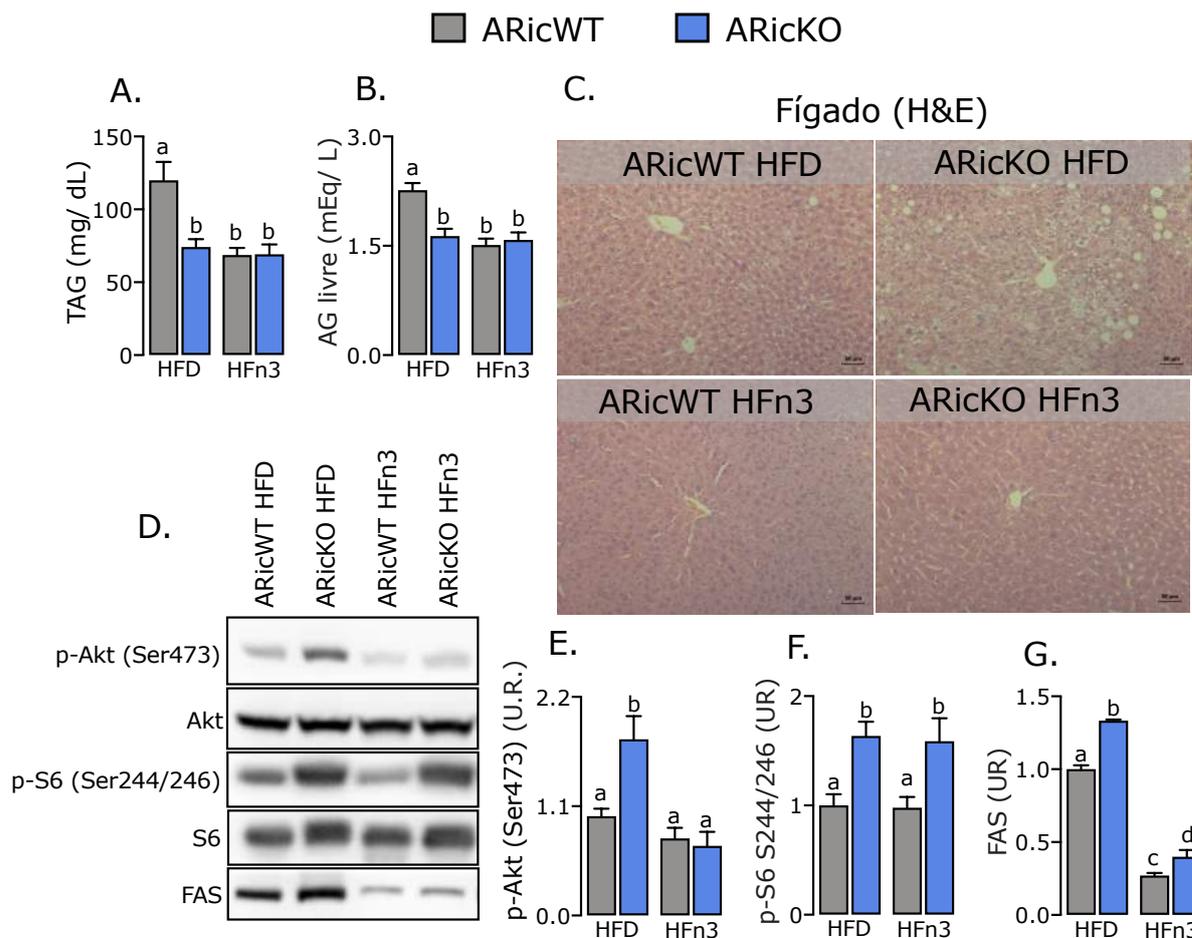


Figura 27. (A) TAG e (B) ácido graxo livre circulante, (C) fotomicrografia do fígado corado com hematoxilina e eosina (escala da barra = 50 μ m), (D) conteúdo proteico de proteínas da sinalização de mTOR e da lipogênese *de novo* no fígado de camundongos controles (ARicWT) e com deleção de Rictor em adipócitos (ARicKO) alimentados por oito semanas com HFD ou HFn3. $n = 5-6$ camundongos por grupo. Dados representados como média \pm EPM; letras diferentes acima das barras representam diferença estatística, $p < 0,05$.

Discussão

Exploramos a participação de mTORC2 em adipócitos nas ações benéficas associadas à ingestão de uma dieta enriquecida com ácidos graxos poli-insaturados ω -3. Demonstramos que no tecido adiposo subcutâneo, os ácidos graxos ω -3 estimulam a fosforilação da Akt em Ser473. mTORC2, como discutido anteriormente, juntamente com PDK1, fosforila a Akt, permitindo sua atividade máxima [30]. Alguns estudos corroboram nossos achados de que ácidos graxos podem ativar a via da PI3K-mTORC2-AKT [249,254], entretanto em alguns tipos celulares, como em linhagens de câncer de próstata, a fosforilação de Akt em T308 por PDK1 é inibida por EPA/DHA, mas a fosforilação em Ser473 não é alterada [256]. Nesse sentido, também encontramos que a fosforilação de Akt no TAM não é influenciada pela dieta HFn3 nos camundongos controles, embora a deleção de Rictor reduza a fosforilação em ambas as dietas. Esses resultados indicam que a ativação de mTORC2-Akt por ácidos graxos ω -3 é tecido e contexto-dependente. Outro ponto é como que ácidos graxos ω -3 podem ativar a via de sinalização da Akt no iTAB. Um estudo demonstrou que a ativação do receptor de ácidos graxos GPR120, independente da ativação do receptor da insulina, ativa a via da PI3K-mTORC2-Akt *in vitro* por um mecanismo dependente de proteínas Gq/11 [244].

Encontramos efeitos antagônicos das dietas HFD e HFn3 no ganho de massa corporal em ARicKO. Enquanto camundongos ARicKO são protegidos do ganho de massa corporal induzida por uma dieta HFD, na HFn3 os camundongos ARicKO tem maior ganho de massa corporal. O grupo do Professor Guertin encontrou que camundongos ARicKO alimentados com HFD tem reduzido ganho de massa corporal decorrente de menor consumo alimentar [146]. Entretanto, não encontramos alteração no consumo alimentar entre camundongos ARicWT e ARicKO em nenhum dos protocolos realizados. Essas discrepâncias no consumo alimentar entre os dois estudos podem ser decorrentes de diferenças na composição da microbiota intestinal, temperatura, bem como diferenças genéticas/epigenéticas entre as colônias de camundongos. Os mecanismos pelos quais a deleção de Rictor em adipócitos tem maior ganho de massa corporal na HFn3 são desconhecidos, mas podem estar associados à redução do gasto energético. Nesse sentido, encontramos que camundongos ARicKO tem menor consumo de oxigênio no iTAB, e que o aumento de consumo de oxigênio neste tecido induzido por HFn3 é totalmente bloqueado pela

deleção de Rictor. Ainda, a deleção de Rictor impede o *browning* do iTAB induzido por HFn3. Se o reduzido *browning* e consumo de oxigênio em ARicKO na HFn3 é um dos mecanismos envolvidos no maior ganho de massa corporal em ARicKO precisa ser investigado. Entretanto, o potencial de geração de calor e de aumento do gasto energético pelo *browning* do TAB é reduzido [1], e portanto, outros mecanismos podem ser determinantes da massa corporal. Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou que a proteína UCP-1 não é necessária para a redução de massa corporal induzida pela dieta HFn3 [250], suportando a ideia de que a deleção de Rictor possa controlar o ganho de massa corporal independentemente do *browning* do iTAB.

Considerando que a via PI3K-mTORC2-AKT tem um papel essencial na captação de glicose pela translocação de GLUT-4 sensível à insulina [38], é possível que essa via seja essencial nas ações dos ácidos graxos ω -3 na sensibilidade à insulina. Aqui, demonstramos que a deleção de Rictor em adipócitos impede parcialmente a melhora na sensibilidade à insulina induzida pelos ácidos graxos ω -3. Nosso laboratório demonstrou que a inibição de PPAR γ bloqueia a ação de ácidos graxos ω -3 na tolerância à glicose [236]. No Capítulo III, demonstramos que a deleção de mTORC2 reduz as ações do ligante de PPAR γ P α nos tecidos adiposos. Portanto, um dos mecanismos pelo qual mTORC2 controla a sensibilidade à insulina pode estar envolvido com a atividade transcricional de PPAR γ .

Ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 também inibem a inflamação por mecanismos que envolvem mudanças na composição de membranas celulares, bem como, conversão de ômega-3 em oxilipinas via ação de ciclooxigenases, lipoxigenases e enzimas do citocromo P450 [257]. Essas oxilipinas promovem efeitos autócrinos e parácrinos que resolvem a inflamação [257]. Aqui, encontramos que a dieta HFn3 reduz tanto citocinas pró-inflamatórias (TNF α , IL-6 e IL-1 β) quanto a anti-inflamatória IL-10 em ARicWT, sem diferença quando comparados a ARicKO. Portanto, mTORC2 em adipócitos não é necessário para os efeitos dos ácidos graxos poli-insaturados ω -3 na inflamação do tecido adiposo. Três estudos utilizando camundongos com deleção de Rictor em adipócitos encontraram resultados controversos sobre a participação de Rictor no processo inflamatório. O primeiro estudo argumenta que camundongos ARicKO tem aumento do conteúdo de TNF α e de macrófagos no tecido adiposo epididimal após 11 semanas de alimentação com

dieta hiperlipídica causando inflamação desse tecido que, de acordo com os autores, precede e é a causa da resistência insulínica desses camundongos [65]. Nesse sentido, um estudo recente demonstrou que a deleção de Rictor impede a melhora da inflamação induzida pelo fator de crescimento de fibroblastos 1 (FGF-1) por mecanismo dependente da citocina CCL2 [258]. Em oposição a esses dois estudos, um trabalho demonstrou que a deleção de Rictor em adipócitos impede o processo inflamatório no tecido adiposo induzido pelo agente causador da tuberculose [259]. Nossos dados sugerem, assim como em [259], que ARicKO são protegidos da inflamação no TAB epididimal induzidos por uma dieta HFD, e que os efeitos dos ácidos graxos ω -3 na melhora da sensibilidade à insulina não envolvem o processo inflamatório.

A deleção de Rictor em adipócitos reduz TAG e ácidos graxos livres circulantes na HFD, pois estes, são provavelmente direcionados ao fígado onde são estocados promovendo esteatose hepática (Capítulo III). Aqui, encontramos que a dieta HFn3 reverte o quadro de esteatose, reduzindo a deposição lipídica nos hepatócitos. Ácidos graxos ômega-3 são potentes inibidores da lipogênese *de novo*, por inibirem a atividade e expressão das enzimas ACC, FAS e SCD1 [160,260,261]. Entretanto, os mecanismos de controle da lipogênese *de novo* induzidos por esses ácidos graxos é desconhecido. Um dos mecanismos, não descrito na literatura, pode ser via mTOR. mTORC1 e mTORC2 promovem a síntese lipídica por mecanismos que envolvem o controle de SREBP1 e lipina por mTORC1, e SREBP1 e ChREBP1 por mTORC2 [20,27,262]. No fígado de camundongos ARicKO alimentados com HFD há o aumento do conteúdo de Akt fosforilada em Ser473 e de S6 fosforilada em Ser240/244, mediado por mTORC2 e mTORC1, respectivamente. A dieta HFn3 reduz em ARicKO o conteúdo de FAS e Akt fosforilada em Ser473, mas não altera o conteúdo de S6 fosforilada. Esses dados sugerem que a melhora na esteatose hepática induzida por ácidos graxos ômega-3 são dependentes da inibição de mTORC2 e não de mTORC1.

Em suma, esses resultados indicam que Rictor é fundamental para a melhora na sensibilidade à insulina tanto no tecido adiposo quanto no fígado. Os mecanismos envolvidos nessas respostas ainda são desconhecidos.

Conclusão

Nesse estudo, demonstramos a participação de Rictor em adipócitos na melhora da homeostase da glicose induzida pelos ácidos graxos ômega-3. De forma complementar, a deficiência de Rictor prejudica a melhora na sensibilidade à insulina por mecanismos independentes da inflamação. Ainda, os ácidos graxos ômega-3 revertem a esteatose hepática mesmo com um quadro de resistência insulínica. Por fim, demonstramos que camundongos ARicKO tem maior ganho de massa corporal em uma dieta enriquecida com ω -3, provavelmente, por mecanismos de redução de gasto de energia, dentre eles, a redução do consumo de oxigênio no iTAB.

Capítulo V

Considerações Finais

Nesta tese estudamos a participação de Rictor/mTORC2 em adipócitos na termogênese adaptativa, obesidade induzida por dieta e nas ações da pioglitazona e óleo de peixe, com o objetivo de avaliar o metabolismo energético, glicídico e lipídico. Em conjunto, nossos dados expandem o conhecimento da participação de mTORC2 no controle do metabolismo e demonstram a importância desse complexo na expansão dos tecidos adiposos e na sensibilidade à insulina.

Conclusões

- Camundongos com deleção de Rictor em adipócitos tem reduzido conteúdo total de UCP-1 no tecido adiposo marrom e inguinal, o que conduz à redução da capacidade termogênica e aumento compensatório de tremor muscular após aclimação ao frio;
- Rictor/mTORC2 em adipócitos é necessário para a captação de glicose no tecido adiposo marrom estimulada pela pioglitazona, mas não pelo frio;
- Camundongos com deleção de Rictor em adipócitos são resistentes à insulina quando aclimatados ao frio ou alimentados com dieta hiperlipídica rica em ácidos graxos provenientes da banha de porco ou do óleo de peixe, mas são tolerantes à glicose;
- Camundongos com deleção de Rictor em adipócitos são parcialmente protegidos do ganho de massa corporal e apresentam redução da adiposidade quando alimentados com dieta hiperlipídica rica em ácidos graxos provenientes da banha de porco;
- Rictor/mTORC2 em adipócitos é essencial para a expansão do tecido adiposo marrom induzida pelo frio, dieta hiperlipídica e pioglitazona, por diferentes mecanismos que envolvem a proliferação celular, menor lipogênese *de novo* e maior lipólise;
- Camundongos com deleção de Rictor em adipócitos desenvolvem esteatose hepática, a qual é exacerbada pela pioglitazona, mas inibida pela dieta hiperlipídica rica em óleo de peixe.

Bibliografia

1. Castro É, Silva TEO, Festuccia WT. Critical review of beige adipocyte thermogenic activation and contribution to whole-body energy expenditure. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2017 Jan 28;31(2):1–9.
2. Aristóteles. THE HISTORY OF ANIMALS. Aristótele. Balme. E and translated by DM, editor. Harvard University Press, 1991.; Volume III: Books 7-10.
3. Sabatini DM. Twenty-five years of mTOR: Uncovering the link from nutrients to growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(45):11818–25.
4. Vézina C, Kudelski A. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot (Tokyo)*. 1975;28(10):721–6.
5. Kahan BD. Discoverer of the treasure from a barren island: Suren Sehgal (10 February 1932 to 21 January 2003). *Transplantation*. 2003 Aug 15;76(3):623–4.
6. Market Research T. Sirolimus Market [Internet]. Sirolimus Market. 2018 [cited 2005 Jan 20]. p. 166.
7. NIH. No Title [Internet]. Clinical Trials Database. 2021 [cited 2021 May 12].
8. Bierer BE, Mattila PS, Standaert RF, Herzenberg LA, Burakoff SJ, Crabtree G, Schreiber SL. Two distinct signal transmission pathways in T lymphocytes are inhibited by complexes formed between an immunophilin and either FK506 or rapamycin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(23):9231–5.
9. Kim J, Guan KL. mTOR as a central hub of nutrient signalling and cell growth. *Nat Cell Biol*. 2019;21(1):63–71.
10. Sabatini DM, Erdjument-Bromage H, Lui M, Tempst P, Snyder SH. RAFT1: A mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell*. 1994 Jul;78(1):35–43.
11. Zheng XF, Fiorentino D, Chen J, Crabtree GR, Schreiber SL. TOR kinase domains are required for two distinct functions, only one of which is inhibited by rapamycin. *Cell*. 1995;82(1):121–30.
12. Beretta L, Gingras AC, Svitkin Y V, Hall MN, Sonenberg N. Rapamycin blocks the phosphorylation of 4E-BP1 and inhibits cap-dependent initiation of translation. *EMBO J*. 1996 Feb 1;15(3):658–64.
13. Chung J, Kuo CJ, Crabtree GR, Blenis J. Rapamycin-FKBP specifically blocks growth-dependent activation of and signaling by the 70 kd S6 protein kinases. *Cell*. 1992;69(7):1227–36.
14. Burnett PE, Barrow RK, Cohen NA, Snyder SH, Sabatini DM. RAFT1 phosphorylation of the translational regulators p70 S6 kinase and 4E-BP1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(4):1432–7.
15. Condon KJ, Sabatini DM. Nutrient regulation of mTORC1 at a glance. *J Cell Sci*. 2019;132(21):0–2.
16. Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. MTOR: From growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011;12(1):21–35.
17. Jewell JL, Guan KL. Nutrient signaling to mTOR and cell growth. *Trends Biochem Sci*. 2013;38(5):233–42.
18. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*. 2017;168(6):960–76.
19. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci*. 2009 Oct 15;122(20):3589–94.
20. Lamming DW, Sabatini DM. A central role for mTOR in lipid homeostasis. *Cell Metab*. 2013;18(4):465–9.
21. Magdalon J, Chimin P, Belchior T, Neves RX, Vieira-Lara MA, Andrade ML, Farias TS, Bolsoni-lopas A, Paschoal VA, Yamashita AS, Kowaltowski AJ, Festuccia WT. Constitutive adipocyte mTORC1 activation enhances mitochondrial activity and reduces visceral adiposity in mice. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids*.

- 2016 May 31;1861(5):430–8.
22. Nojima H, Tokunaga C, Eguchi S, Oshiro N, Hidayat S, Yoshino KI, Hara K, Tanaka N, Avruch J, Yonezawa K. The mammalian target of rapamycin (mTOR) partner, raptor, binds the mTOR substrates p70 S6 kinase and 4E-BP1 through their TOR signaling (TOS) motif. *J Biol Chem*. 2003;278(18):15461–4.
 23. Polak P, Cybulski N, Feige JN, Auwerx J, Rüegg MA, Hall MN. Adipose-Specific Knockout of raptor Results in Lean Mice with Enhanced Mitochondrial Respiration. *Cell Metab*. 2008 Nov;8(5):399–410.
 24. Umemura A, Park EJ, Taniguchi K, Lee JH, Shalapour S, Valasek MA, Aghajan M, Nakagawa H, Seki E, Hall MN, Karin M. Liver damage, inflammation, and enhanced tumorigenesis after persistent mTORC1 inhibition. *Cell Metab*. 2014;20(1):133–44.
 25. Chimin P, Andrade ML, Belchior T, Paschoal VA, Magdalon J, Yamashita AS, Castro É, Castoldi A, Chaves-filho AB, Yoshinaga MY, Miyamoto S, Câmara NO, Festuccia WT. Adipocyte mTORC1 deficiency promotes adipose tissue inflammation and NLRP3 inflammasome activation via oxidative stress and de novo ceramide synthesis. *J Lipid Res*. 2017 Sep;58(9):1797–807.
 26. Guertin DA, Stevens DM, Thoreen CC, Burds AA, Kalaany NY, Moffat J, Brown M, Fitzgerald KJ, Sabatini DM. Ablation in Mice of the mTORC Components raptor, rictor, or mLST8 Reveals that mTORC2 Is Required for Signaling to Akt-FOXO and PKC α , but Not S6K1. *Dev Cell*. 2006;11(6):859–71.
 27. Liu GY, Sabatini DM. mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020;21(4):183–203.
 28. Liu XL, Pan Q, Cao HX, Xin FZ, Zhao ZH, Yang RX, Zeng J, Zhou H, Fan JG. Lipotoxic Hepatocyte-Derived Exosomal MicroRNA 192-5p Activates Macrophages Through Rictor/Akt/Forkhead Box Transcription Factor O1 Signaling in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Hepatology*. 2020;72(2):454–69.
 29. Wang X, Proud CG. The mTOR Pathway in the Control of Protein Synthesis. *Physiology*. 2006 Oct;21(5):362–9.
 30. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*. 2012 Apr;149(2):274–93.
 31. Blanchard P, Festuccia WT, Houde VP, St-Pierre P, Brûlé S, Turcotte V, Côté M, Bellmann K, Marette A, Deshaies Y. Major involvement of mTOR in the PPAR γ -induced stimulation of adipose tissue lipid uptake and fat accretion. *J Lipid Res*. 2012 Jun;53(6):1117–25.
 32. Caron A, Richard D, Laplante M. The Roles of mTOR Complexes in Lipid Metabolism. *Annu Rev Nutr*. 2015;35(1):321–48.
 33. Andrade ML, Gilio GR, Perandini LA, Peixoto AS, Moreno MF, Oliveira TE, Vieira TS, Ortiz-silva M, Thomazelli CA, Chaves-filho AB, Belchior T, Chimin P, Magdalon J, Ivison R, Pant D, Tsai L, Yoshinaga MY, Miyamoto S, Festuccia WT. BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids PPAR γ -induced upregulation of subcutaneous fat adiponectin secretion , glyceroneogenesis and BCAA oxidation requires mTORC1 activity. 2021;1866(April).
 34. Haissaguerre M, Saucisse N, Cota D. Influence of mTOR in energy and metabolic homeostasis. *Mol Cell Endocrinol*. 2014;397(1–2):67–77.
 35. Morita M, Gravel SP, Chénard V, Sikström K, Zheng L, Alain T, Gandin V, Avizonis D, Arguello M, Zakaria C, McLaughlan S, Nouet Y, Pause A, Pollak M, Gottlieb E, Larsson O, St-Pierre J, Topisirovic I, Sonenberg N. MTORC1 controls mitochondrial activity and biogenesis through 4E-BP-dependent translational regulation. *Cell Metab*. 2013;18(5):698–711.
 36. Fu W, Hall MN. Regulation of MTORC2 signaling. *Genes (Basel)*. 2020;11(9):1–19.

37. Martinez Calejman C, Trefely S, Entwisle SW, Luciano A, Jung SM, Hsiao W, Torres A, Hung CM, Li H, Snyder NW, Villén J, Wellen KE, Guertin DA. mTORC2-AKT signaling to ATP-citrate lyase drives brown adipogenesis and de novo lipogenesis. *Nat Commun.* 2020;11(1).
38. Booth A, Magnuson A, Fouts J, Foster MT. Adipose tissue: an endocrine organ playing a role in metabolic regulation. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 2016 Jan 1;26(1):25–42.
39. Festuccia WT. Regulation of Adipocyte and Macrophage Functions by mTORC1 and 2 in Metabolic Diseases. *Mol Nutr Food Res.* 2021;65(1):1–9.
40. Albert V, Svensson K, Shimobayashi M, Colombi M, Muñoz S, Jimenez V, Handschin C, Bosch F, Hall MN, Munoz S, Jimenez V, Handschin C, Bosch F, Hall MN. mTORC 2 sustains thermogenesis via Akt-induced glucose uptake and glycolysis in brown adipose tissue. *EMBO Mol Med.* 2016 Mar 1;8(3):232–46.
41. Hresko RC, Mueckler M. mTOR·RICTOR is the Ser473 kinase for Akt/protein kinase B in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem.* 2005;280(49):40406–16.
42. Knudsen JR, Fritzen AM, James DE, Jensen TE, Kleinert M, Richter EA. Growth Factor-Dependent and -Independent Activation of mTORC2. *Trends Endocrinol Metab.* 2020;31(1):13–24.
43. Cho CS, Kowalsky AH, Lee JH. Pathological consequences of hepatic mtorc1 dysregulation. *Genes (Basel).* 2020;11(8):1–9.
44. Villanueva A, Chiang DY, Newell P, Peix J, Thung S, Alsinet C, Tovar V, Roayaie S, Minguez B, Sole M, Battiston C, van Laarhoven S, Fiel MI, Di Feo A, Hoshida Y, Yea S, Toffanin S, Ramos A, Martignetti JA, Mazzaferro V, Bruix J, Waxman S, Schwartz M, Meyerson M, Friedman SL, Llovet JM. Pivotal Role of mTOR Signaling in Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology.* 2008;135(6):1–21.
45. Yu Y, Yoon SO, Poulogiannis G, Yang Q, Ma XM, Villén J, Kubica N, Hoffman GR, Cantley LC, Gygi SP, Blenis J. Phosphoproteomic analysis identifies Grb10 as an mTORC1 substrate that negatively regulates insulin signaling. *Science (80-).* 2011;332(6035):1322–6.
46. Hsu PP, Kang SA, Rameseder J, Zhang Y, Ottina KA, Lim D, Peterson TR, Choi Y, Gray NS, Yaffe MB, Marto JA, Sabatini DM. The mTOR-Regulated Phosphoproteome Reveals a Mechanism of mTORC1-Mediated Inhibition of Growth Factor Signaling. *Science (80-).* 2011 Jun 10;332(6035):1317–22.
47. Mukaida S, Evans BA, Bengtsson T, Hutchinson DS, Sato M. Adrenoceptors promote glucose uptake into adipocytes and muscle by an insulin-independent signaling pathway involving mechanistic target of rapamycin complex 2. *Pharmacol Res.* 2017;116:87–92.
48. Olsen JM, Åslund A, Bokhari MH, Hutchinson DS, Bengtsson T. Acute β -adrenoceptor mediated glucose clearance in brown adipose tissue; a distinct pathway independent of functional insulin signaling. *Mol Metab.* 2019;30(October):240–9.
49. Olsen JM, Sato M, Dallner OS, Sandström AL, Pisani DF, Chambard J, Amri E, Hutchinson DS, Bengtsson T. Glucose uptake in brown fat cells is dependent on mTOR complex 2–promoted GLUT1 translocation. 2014;207(3).
50. Sato M, Evans BA, Sandström AL, Chia LY, Mukaida S, Thai BS, Nguyen A, Lim L, Tan CYR, Baltos JA, White PJ, May LT, Hutchinson DS, Summers RJ, Bengtsson T. α 1A-Adrenoceptors activate mTOR signalling and glucose uptake in cardiomyocytes. *Biochem Pharmacol.* 2018;148:27–40.
51. Olsen JM, Csikasz RI, Dehvari N, Lu L, Sandström A, Öberg AI, Nedergaard J, Stone-Elander S, Bengtsson T. β 3 -Adrenergically induced glucose uptake in brown adipose tissue is independent of UCP1 presence or activity: Mediation through the mTOR pathway. *Mol Metab.* 2017 Mar;6(6):611–9.

52. Sato M, Dehvari N, Oberg AI, Dallner OS, Sandstrom AL, Olsen JM, Csikasz RI, Summers RJ, Hutchinson DS, Bengtsson T. Improving Type 2 Diabetes Through a Distinct Adrenergic Signaling Pathway Involving mTORC2 That Mediates Glucose Uptake in Skeletal Muscle. *Diabetes*. 2014 Dec 1;63(12):4115–29.
53. Jung SM, Hung C, Hildebrand SR, Mostoslavsky R, Metallo CM, Guertin DA, Jung SM, Hung C, Hildebrand SR, Sanchez-gurmaches J, Martinez-pastor B, Hsiao W, Tang Y, Li H, Daniels DL, Mostoslavsky R, Metallo CM. Non-canonical mTORC2 Signaling Regulates Brown Regulates Brown Adipocyte Lipid Catabolism through SIRT6-FoxO1. *Mol Cell*. 2019;75(4):807-822.e8.
54. Corradetti MN, Guan KL. Upstream of the mammalian target of rapamycin: Do all roads pass through mTOR? *Oncogene*. 2006;25(48):6347–60.
55. Luo Y, Xu W, Li G, Cui W. Weighing in on mTOR complex 2 signaling: The expanding role in cell metabolism. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018.
56. Linke M, Fritsch SD, Sukhbaatar N, Hengstschläger M, Weichhart T. mTORC1 and mTORC2 as regulators of cell metabolism in immunity. *FEBS Lett*. 2017;591(19):3089–103.
57. Oh WJ, Jacinto E. mTOR complex 2 signaling and functions. *Cell Cycle*. 2011;10(14):2305–16.
58. Kazyken D, Magnuson B, Bodur C, Acosta-Jaquez HA, Zhang D, Tong X, Barnes TM, Steinl GK, Patterson NE, Altheim CH, Sharma N, Inoki K, Cartee GD, Bridges D, Yin L, Riddle SM, Fingar DC. AMPK directly activates mTORC2 to promote cell survival during acute energetic stress. *Sci Signal*. 2019;12(585).
59. Ottaviani E, Malagoli D, Franceschi C. The evolution of the adipose tissue: A neglected enigma. *Gen Comp Endocrinol*. 2011;174(1):1–4.
60. Hall KD, Heymsfield SB, Kemnitz JW, Klein S, Schoeller DA, Speakman JR. Energy balance and its components: Implications for body weight regulation. *Am J Clin Nutr*. 2012 Apr 1;95(4):989–94.
61. Craigie D. Case of Inflammation of the Adipose Tissue, Forming the Sheath of the Carotid Artery, Followed by Erosion and Perforation of the Arterial Tissue and Fatal Hemorrhage; with Some Remarks on the Peculiarities of Inflammation of the Adipose Tissue. *Edinburgh Med Surg J*. 1837 Oct 1;48(133):396–412.
62. Cook KS, Min HY, Johnson D, Chaplinsky RJ, Flier JS, Hunt CR SB. Adipsin : A Circulating Serine Protease Homolog. *Science*. 1987;237(4813):402–5.
63. Leiria LO, Wang CH, Lynes MD, Yang K, Shamsi F, Sato M, Sugimoto S, Chen EY, Bussberg V, Narain NR, Sansbury BE, Darcy J, Huang TL, Kodani SD, Sakaguchi M, Rocha AL, Schulz TJ, Bartelt A, Hotamisligil GS, Hirshman MF, van Leyen K, Goodyear LJ, Blüher M, Cypess AM, Kiebish MA, Spite M, Tseng YH. 12-Lipoxygenase Regulates Cold Adaptation and Glucose Metabolism by Producing the Omega-3 Lipid 12-HEPE from Brown Fat. *Cell Metab*. 2019;30(4):768-783.e7.
64. Zhang B, Yang Y, Xiang L, Zhao Z, Ye R. Adipose-derived exosomes: A novel adipokine in obesity-associated diabetes. *J Cell Physiol*. 2019;234(10):16692–702.
65. Shimobayashi M, Albert V, Woelnerhanssen B, Frei IC, Weissenberger D, Meyer-Gerspach AC, Clement N, Moes S, Colombi M, Meier JA, Swierczynska MM, Jenö P, Beglinger C, Peterli R, Hall MN. Insulin resistance causes inflammation in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2018;128(4):1538–50.
66. Alexaki VI, Chavakis T. The role of innate immunity in the regulation of brown and beige adipogenesis. *Rev Endocr Metab Disord*. 2016;17(1):41–9.
67. Rodríguez A, Ezquerro S, Méndez-Giménez L, Becerril S, Frühbeck G. Revisiting the adipocyte: a model for integration of cytokine signaling in the regulation of energy metabolism. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 2015;309(8):E691–714.
68. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor

- necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. 1993 Jan 1;259(5091):87–91.
69. Lee P, Linderman JD, Smith S, Brychta RJ, Wang J, Idelson C, Perron RM, Werner CD, Phan GQ, Kammula US, Kebebew E, Pacak K, Chen KY, Celi FS. Irisin and FGF21 Are Cold-Induced Endocrine Activators of Brown Fat Function in Humans. *Cell Metab*. 2014 Feb;19(2):302–9.
 70. Hansen IR. The secretome of brown adipose tissue. 2014.
 71. Pukajlo K, Kolackov K, Łączmański Ł, Daroszewski J. Irisin – a new mediator of energy homeostasis. *Postepy Hig Med Dosw*. 2015 Feb 21;69:233–42.
 72. Cammisotto PG, Bukowiecki LJ. Mechanisms of leptin secretion from white adipocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002;283(1):C244–50.
 73. Heyn GS, Corrêa LH, Magalhães KG. The Impact of Adipose Tissue-Derived miRNAs in Metabolic Syndrome, Obesity, and Cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020;11(October):1–15.
 74. Thomou T, Mori MA, Dreyfuss JM, Konishi M, Sakaguchi M, Wolfrum C, Rao TN, Winnay JN, Garcia-martin R, Grinspoon SK, Gorden P, Kahn CR. Adipose-derived circulating miRNAs regulate gene expression in other tissues. *Nat Publ Gr*. 2017;
 75. Chen Y, Pan R, Pfeifer A. Regulation of brown and beige fat by microRNAs. *Pharmacol Ther*. 2017 Feb;170:1–7.
 76. Chouchani ET, Kajimura S. Metabolic adaptation and maladaptation in adipose tissue. *Nat Metab*. 2019;(February).
 77. Sanchez-Gurmaches J, Guertin DA. Adipocyte lineages: Tracing back the origins of fat. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2014;1842(3):340–51.
 78. Mathis D. Immunological goings-on in visceral adipose tissue. *Cell Metab*. 2013;17(6):851–9.
 79. Rosito GA, Massaro JM, Hoffmann U, Ruberg FL, Mahabadi AA, Vasan RS, Donnell CJO, Fox CS. Pericardial Fat , Visceral Abdominal Fat , Cardiovascular Disease Risk Factors , and Vascular Calcification in a Community-Based Sample The Framingham Heart Study. 2015;
 80. Rosen ED, Spiegelman BM. What we talk about when we talk about fat. *Cell*. 2014 Jan;156(1–2):20–44.
 81. Sanchez-Gurmaches J, Guertin DA. Adipocytes arise from multiple lineages that are heterogeneously and dynamically distributed. *Nat Commun*. 2014 Jun 19;5(May):1–13.
 82. Cinti S. The adipose organ. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids*. 2005 Sep 1;73(1 SPEC. ISS.):9–15.
 83. Harms M, Seale P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat Med*. 2013 Sep 29;19(10):1252–63.
 84. Lefterova MI, Haakonsson AK, Lazar MA, Mandrup S. PPAR?? and the global map of adipogenesis and beyond. *Trends Endocrinol Metab*. 2014 Jun;25(6):293–302.
 85. Blanchard P, Moreira RJ, Castro É, Caron A, Côté M, Andrade ML, Oliveira TE, Ortiz-Silva M, Peixoto AS, Anne F, Gélinas Y, Guerra-sá R, Deshaies Y, Festuccia WT, de Castro É, Caron A, Côté M, Andrade ML, Oliveira TE, Ortiz-Silva M, Peixoto AS, Dias FA, Gélinas Y, Guerra-sá R, Deshaies Y, Festuccia WT. PPAR γ is a major regulator of branched-chain amino acid blood levels and catabolism in white and brown adipose tissues. *Metabolism*. 2018;89:27–38.
 86. Porter C, Herndon DN, Chondronikola M, Chao T, Annamalai P, Bhattarai N, Saraf MK, Capek KD, Reidy PT, Daquinag AC, Kolonin MG, Rasmussen BB, Borsheim E, Toliver-Kinsky T, Sidossis LS. Human and Mouse Brown Adipose Tissue Mitochondria Have Comparable UCP1 Function. *Cell Metab*. 2016;24(2):246–55.
 87. Kraunsøe R, Boushel R, Hansen CN, Schjerling P, Qvortrup K, Støckel M, Mikines

- KJ, Dela F. Mitochondrial respiration in subcutaneous and visceral adipose tissue from patients with morbid obesity. *J Physiol*. 2010;588(12):2023–32.
88. Young P, Arch JRS, Ashwell M. Brown adipose tissue in the parametrial fat pad of the mouse. *FEBS Lett*. 1984 Feb 13;167(1):10–4.
89. Petrovic N, Walden TB, Shabalina IG, Timmons JA, Cannon B, Nedergaard J. Chronic peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J Biol Chem*. 2010 Mar 5;285(10):7153–64.
90. Bargut TCL, Souza-Mello V, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Browning of white adipose tissue: lessons from experimental models. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2017 Jan 18;0(0):1–13.
91. Cinti S. Transdifferentiation properties of adipocytes in the adipose organ. *AJP Endocrinol Metab*. 2009 Nov 1;297(5):E977–86.
92. Frontini A, Vitali A, Perugini J, Murano I, Romiti C, Ricquier D, Guerrieri M, Cinti S. White-to-brown transdifferentiation of omental adipocytes in patients affected by pheochromocytoma. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids*. 2013 May;1831(5):950–9.
93. Giordano A, Smorlesi A, Frontini A, Barbatelli G, Cinti S. White, brown and pink adipocytes: The extraordinary plasticity of the adipose organ. *Eur J Endocrinol*. 2014 Apr 10;170(5):R159–71.
94. Pilkington AC, Paz HA, Wankhade UD. Beige Adipose Tissue Identification and Marker Specificity—Overview. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021;12(March):1–9.
95. Cinti S. Pink Adipocytes. *Trends Endocrinol Metab*. 2018;xx:1–16.
96. Strawford A, Antelo F, Christiansen M, Hellerstein MK. Adipose tissue triglyceride turnover, de novo lipogenesis, and cell proliferation in humans measured with $^2\text{H}_2\text{O}$. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 2004;286(4 49-4):577–88.
97. Mottillo EP, Balasubramanian P, Lee Y-H, Weng C, Erin E, Kershaw EE, Granneman JG. Coupling of lipolysis and de novo lipogenesis in brown, beige, and white adipose tissues during chronic β_3 -adrenergic receptor activation. *J Lipid Res*. 2014 Nov;55(11):2276–86.
98. Ameer F, Scandiuzzi L, Hasnain S, Kalbacher H, Zaidi N. De novo lipogenesis in health and disease. *Metabolism*. 2014;63(7):895–902.
99. Morigny P, Boucher J, Arner P, Langin D. Lipid and glucose metabolism in white adipocytes: pathways, dysfunction and therapeutics. *Nat Rev Endocrinol*. 2021;17(May).
100. Swierczynski J, Zabrocka L, Goyke E, Raczynska S, Adamonis W, Sledzinski Z. Enhanced glycerol 3-phosphate dehydrogenase activity in adipose tissue of obese humans. *Mol Cell Biochem*. 2003;254(1–2):55–9.
101. Reshef L, Olswang Y, Cassuto H, Blum B, Croniger CM, Kalhan SC, Tilghman SM, Hanson RW. Glyceroneogenesis and the triglyceride/fatty acid cycle. *J Biol Chem*. 2003;278(33):30413–6.
102. Persico PA, Cerchio GM, Jeffay H. Glycerokinase in mammalian adipose tissue: stimulation by lipogenic substances. *Am J Physiol*. 1975;228(6):1868–74.
103. Festuccia WTL, Guerra-Sá R, Kawashita NH, Garófalo MAR, Evangelista EA, Rodrigues V, Kettelhut IC, Migliorini RH. Expression of glycerokinase in brown adipose tissue is stimulated by the sympathetic nervous system. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol*. 2003 Jun 1;284(6):R1536–41.
104. Coleman RA, Mashek DG. Mammalian triacylglycerol metabolism: Synthesis, lipolysis, and signaling. *Chem Rev*. 2011;111(10):6359–86.
105. Festuccia WT, Blanchard P-G, Deshaies Y. Control of Brown Adipose Tissue Glucose and Lipid Metabolism by PPAR? *Front Endocrinol (Lausanne)*.

- 2011;2(December):1–6.
106. Frühbeck G, Méndez-Giménez L, Fernández-Formoso J-A, Fernández S, Rodríguez A. Regulation of adipocyte lipolysis. *Nutr Res Rev*. 2014 Jun 28;27(01):63–93.
 107. Bolsoni-Lopes A, Alonso-Vale MIC. Lipolysis and lipases in white adipose tissue – An update. *Arch Endocrinol Metab*. 2015;59(4):335–42.
 108. Duncan RE, Ahmadian M, Jaworski K, Sarkadi-Nagy E, Sul HS. Regulation of lipolysis in adipocytes. *Annu Rev Nutr*. 2007;27:79–101.
 109. Klip A, McGraw TE, James DE. Thirty sweet years of GLUT4. *J Biol Chem*. 2019 Jul;294(30):11369–81.
 110. Moraes PA, Yonamine CY, Correa D, Junior P, Victor J, Esteves D, Machado UF, Mori RC. Insulin acutely triggers transcription of *Slc2a4* gene: Participation of the. *Life Sci*. 2014;114(1):36–44.
 111. Abel ED, Peroni O, Kim JK, Kim Y-B, Boss O, Hadro E, Minnemann T, Shulman GI, Kahn BB. Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature*. 2001 Feb;409(6821):729–33.
 112. Santoro A, McGraw TE, Kahn BB. Insulin action in adipocytes, adipose remodeling, and systemic effects. *Cell Metab*. 2021;33(4):748–57.
 113. Cybulski N, Polak P, Auwerx J, Rüegg MA, Hall MN. mTOR complex 2 in adipose tissue negatively controls whole-body growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(24):9902–7.
 114. Kumar A, Lawrence JC, Jung DY, Ko HJ, Keller SR, Kim JK, Magnuson M a, Harris TE. Fat Cell-Specific Ablation of Rictor in Mice Impairs Insulin-Regulated Fat Cell and Whole-Body Glucose and Lipid Metabolism. *Diabetes*. 2010 Jun 1;59(6):1397–406.
 115. Klingenspor M, Fromme T, Hughes DA, Manzke L, Polymeropoulos E, Riemann T, Trzcionka M, Hirschberg V, Jastroch M. An ancient look at UCP1. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg*. 2008 Jul;1777(7–8):637–41.
 116. Cannon B, Nedergaard J. Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. *Physiol Rev*. 2004 Jan 1;84(1):277–359.
 117. Bartness TJ, Ryu V. Neural control of white, beige and brown adipocytes. *Int J Obes Suppl*. 2015;5(Suppl 1):S35-9.
 118. Miyoshi H, Souza SC, Zhang H-H, Strissel KJ, Christoffolete MA, Kovsan J, Rudich A, Kraemer FB, Bianco AC, Obin MS, Greenberg AS. Perilipin Promotes Hormone-sensitive Lipase-mediated Adipocyte Lipolysis via Phosphorylation-dependent and -independent Mechanisms. *J Biol Chem*. 2006 Jun 9;281(23):15837–44.
 119. Cannon B, Nedergaard JAN. Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. *Physiol Rev*. 2004 Jan 1;84(1):277–359.
 120. Shabalina IG, Jacobsson A, Cannon B, Nedergaard J. Native UCP1 displays simple competitive kinetics between the regulators purine nucleotides and fatty acids. *J Biol Chem*. 2004;279(37):38236–48.
 121. Azzu V, Jastroch M, Divakaruni AS, Brand MD. The regulation and turnover of mitochondrial uncoupling proteins. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg*. 2010;1797(6–7):785–91.
 122. Shin H, Ma Y, Chanturiya T, Cao Q, Wang Y, Kadegowda AKG, Jackson R, Rumore D, Xue B, Shi H, Gavrilova O, Yu L. Lipolysis in Brown Adipocytes Is Not Essential for Cold-Induced Thermogenesis in Mice. *Cell Metab*. 2017 Oct;26(5):1–14.
 123. Schreiber R, Diwoy C, Schoiswohl G, Feiler U, Wongsiriroj N, Abdellatif M, Kolb D, Hoeks J, Kershaw EE, Sedej S, Schrauwen P, Haemmerle G, Zechner R. Cold-Induced Thermogenesis Depends on ATGL-Mediated Lipolysis in Cardiac Muscle,

- but Not Brown Adipose Tissue. *Cell Metab.* 2017 Nov;26(5):753-763.e7.
124. Kazak L, Chouchani ET, Jedrychowski MP, Erickson BK, Shinoda K, Cohen P, Vetrivelan R, Lu GZ, Laznik D, Hasenfuss SC, Kajimura S, Gygi SP, Bruce M. A Creatine - Driven Substrate Cycle Enhances Energy Expenditure and Thermogenesis in Beige Fat.
 125. Mottillo EP, Ramseyer VD, Granneman JG. SERCA2b Cycles Its Way to UCP1-Independent Thermogenesis in Beige Fat. *Cell Metab.* 2018;27(1):7–9.
 126. Ikeda K, Kang Q, Yoneshiro T, Camporez JP, Maki H, Homma M, Shinoda K, Chen Y, Lu X, Maretich P, Tajima K, Ajuwon KM, Soga T, Kajimura S. UCP1-independent signaling involving SERCA2b-mediated calcium cycling regulates beige fat thermogenesis and systemic glucose homeostasis. *Nat Med.* 2017;23(12):1454–65.
 127. Foster DO, Frydman ML. Brown adipose tissue: the dominant site of nonshivering thermogenesis in the rat. *Experientia Suppl.* 1978;32:147–51.
 128. Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, Kuo FC, Palmer EL, Tseng Y-H, Doria A, Kolodny GM, Kahn CR. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med.* 2009 Apr 9;360(15):1509–17.
 129. Cypess AM, Kahn CR. Brown fat as a therapy for obesity and diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2010;17(2):143–9.
 130. Sharp LZ, Shinoda K, Ohno H, Scheel DW, Tomoda E, Ruiz L, Hu H, Wang L, Pavlova Z, Gilsanz V, Kajimura S. Human BAT Possesses Molecular Signatures That Resemble Beige/Brite Cells. *PLoS One.* 2012;7(11).
 131. Cypess AM, Weiner LS, Roberts-Toler C, Elia EF, Kessler SH, Kahn PA, English J, Chatman K, Trauger SA, Doria A, Kolodny GM. Activation of human brown adipose tissue by a β 3-adrenergic receptor agonist. *Cell Metab.* 2015;21(1):33–8.
 132. Townsend KL, Tseng Y-H. Of mice and men: novel insights regarding constitutive and recruitable brown adipocytes. *Int J Obes Suppl.* 2015;5(Suppl 1):S15-20.
 133. Taittonen M, Ph D, Laine J, Ph D, Savisto N. Functional Brown Adipose Tissue in Healthy Adults. *N Engl J Med.* 2009 Apr 9;360(15):1518–25.
 134. Haththotuwa RN, Wijeyaratne CN, Senarath U. Worldwide epidemic of obesity [Internet]. *Obesity and Obstetrics. INC;* 2020. 3–8 p.
 135. Speakman JR. A Nonadaptive Scenario Explaining the Genetic Predisposition to Obesity: The “Predation Release” Hypothesis. *Cell Metab.* 2007;6(1):5–12.
 136. Prentice AM, Hennig BJ, Fulford AJ. Evolutionary origins of the obesity epidemic: Natural selection of thrifty genes or genetic drift following predation release? *Int J Obes.* 2008;32(11):1607–10.
 137. Hall KD, Heymsfield SB, Kemnitz JW, Klein S, Schoeller DA, Speakman JR. Energy balance and its components: Implications for body weight regulation. *Am J Clin Nutr.* 2012;95(4):989–94.
 138. Speakman JR. Obesity and thermoregulation [Internet]. 1st ed. Vol. 156, *Thermoregulation Part I.* Elsevier B.V.; 2018. 431–443 p.
 139. Brown RJ, Araujo-Vilar D, Cheung PT, Dunger D, Garg A, Jack M, Mungai L, Oral EA, Patni N, Rother KI, Von Schnurbein J, Sorkina E, Stanley T, Vigouroux C, Wabitsch M, Williams R, Yorifuji T. The diagnosis and management of lipodystrophy syndromes: A multi-society practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016;101(12):4500–11.
 140. Vegiopoulos A, Rohm M, Herzig S. Adipose tissue: between the extremes. *EMBO J.* 2017;36(14):1999–2017.
 141. Cybulski N, Polak P, Auwerx J, Rüegg MA, Hall MN. mTOR complex 2 in adipose tissue negatively controls whole-body growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(24):9902–7.

142. Kumar A, Lawrence JC, Jung DY, Ko HJ, Keller SR, Kim JK, Magnuson MA, Harris TE. Fat Cell-Specific Ablation of Rictor in Mice Impairs Insulin-Regulated Fat Cell and Whole- Body Glucose and Lipid Metabolism. 2010;(November 2015).
143. Urs S, Harrington A, Liaw L, Small D. Selective expression of an α 2/Fatty Acid Binding Protein4-Cre transgene in non-adipogenic tissues during embryonic development. *Transgenic Res.* 2006;15(5):647–53.
144. Lee KY, Russell SJ, Ussar S, Boucher J, Vernochet C, Mori MA, Smyth G, Rourk M, Cederquist C, Rosen ED, Kahn BB, Kahn CR. Lessons on conditional gene targeting in mouse adipose tissue. *Diabetes.* 2013;62(3):864–74.
145. Martens K, Bottelbergs A, Baes M. Ectopic recombination in the central and peripheral nervous system by α 2/FABP4-Cre mice: Implications for metabolism research. *FEBS Lett.* 2010;584(5):1054–8.
146. Tang Y, Wallace M, Sanchez-Gurmaches J, Hsiao W-Y, Li H, Lee PL, Vernia S, Metallo CM, Guertin DA. Adipose tissue mTORC2 regulates ChREBP-driven de novo lipogenesis and hepatic glucose metabolism. *Nat Commun.* 2016 Apr 21;7(8):11365.
147. Chimin P, Andrade ML, Belchior T, Paschoal VA, Paulo S. Adipocyte mTORC1 deficiency promotes adipose tissue inflammation and NLRP3 inflammasome activation via oxidative stress and de novo ceramide synthesis. :1–30.
148. Hung C-M, Calejman CM, Sanchez-gurmaches J, Li H, Clish CB, Hettmer S, Wagers AJ, Guertin DA, Sanchez- J, Li H, Clish CB, Hettmer S, Mice P, Obesity A, Hung C-M, Calejman CM, Sanchez-gurmaches J, Li H, Clish CB, Hettmer S, Wagers AJ, Guertin DA. Rictor/mTORC2 Loss in the Myf5 Lineage Reprograms Brown Fat Metabolism and Protects Mice against Obesity and Metabolic Disease. *Cell Rep.* 2014 Jul;8(1):256–71.
149. Harms M, Seale P. Brown and beige fat: Development, function and therapeutic potential. *Nat Med.* 2013;19(10):1252–63.
150. Labbé SM, Caron XA, Festuccia WT, Lecomte R, Richard D. Interscapular brown adipose tissue denervation does not promote the oxidative activity of inguinal white adipose tissue in male mice. *Am J Physiol - Endocrinol Metab.* 2018;315(5):E815–24.
151. Nedergaard J, Cannon B. UCP1 mRNA does not produce heat. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids.* 2013;1831(5):943–9.
152. Shabalina IG, Petrovic N, Jong JMA De, Kalinovich A V, Cannon B, de Jong JMA, Kalinovich A V, Cannon B, Nedergaard J, deJong JA, Kalinovich A V, Cannon B, Nedergaard J. UCP1 in Brite/Beige Adipose Tissue Mitochondria Is Functionally Thermogenic. *Cell Rep.* 2013 Dec;5(5):1196–203.
153. Labbé SM, Mouchiroud M, Caron A, Secco B, Freinkman E, Lamoureux G, Gélinas Y, Lecomte R, Bossé Y, Chimin P, Festuccia WT, Richard D, Laplante M. mTORC1 is Required for Brown Adipose Tissue Recruitment and Metabolic Adaptation to Cold. *Sci Rep.* 2016 Dec 23;6(1):37223.
154. Liu D, Bordicchia M, Zhang C, Fang H, Wei W, Li J, Guilherme A, Guntur K, Czech MP, Collins S. Activation of mTORC1 is essential for β -adrenergic stimulation of adipose browning. 2016;126(5).
155. Tran CM, Mukherjee S, Ye L, Frederick DW, Kissig M, Davis JG, Lamming DW, Seale P, Baur JA. Rapamycin blocks induction of the thermogenic program in white adipose tissue. *Diabetes.* 2016 Apr;65(4):927–41.
156. Steiner AA, Flatow EA, Brito CF, Fonseca MT, Komegae EN. Respiratory gas exchange as a new aid to monitor acidosis in endotoxemic rats: relationship to metabolic fuel substrates and thermometabolic responses. *Physiol Rep.* 2017 Jan;5(1):e13100.
157. Festuccia WT, Blanchard P-G, Belchior T, Chimin P, Paschoal VA, Magdalon J,

- Hirabara SM, Simões D, St-Pierre P, Carpinelli A, Marette A, Deshaies Y. PPAR γ activation attenuates glucose intolerance induced by mTOR inhibition with rapamycin in rats. *Am J Physiol Metab.* 2014 May 1;306(9):E1046–54.
158. Festuccia WT, Laplante M, Berthiaume M, Gélinas Y, Deshaies Y. PPAR γ agonism increases rat adipose tissue lipolysis, expression of glyceride lipases, and the response of lipolysis to hormonal control. *Diabetologia.* 2006 Sep 5;49(10):2427–36.
159. Festuccia WT, Blanchard P, Turcotte V, Laplante M, Sariahmetoglu M, Brindley DN, Richard D, Deshaies Y. The PPAR γ agonist rosiglitazone enhances rat brown adipose tissue lipogenesis from glucose without altering glucose uptake. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2009;296(5):R1327-35.
160. Moreira RJ, Castro É, Oliveira TE, Belchior T, Peixoto AS, Chaves-Filho AB, Moreno MF, Lima JD, Yoshinaga M, Miyamoto S, Morais MRPT, Zorn TMT, Cogliati B, Iwai LK, Palmisano G, Cabral FJ, Festuccia W. Lipoatrophy-Associated Insulin Resistance and Hepatic Steatosis are Attenuated by Intake of Diet Rich in Omega 3 Fatty Acids. *Mol Nutr Food Res.* 2020 Apr;64(7):1900833.
161. Festuccia WT, Blanchard P, Richard D, Deshaies Y. Basal adrenergic tone is required for maximal stimulation of rat brown adipose tissue UCP1 expression by chronic PPAR- γ activation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2010;299(1):R159-67.
162. Hao Q, Yadav R, Basse AL, Petersen S, Sonne SB, Rasmussen S, Zhu Q, Lu Z, Wang J, Audouze K, Gupta R, Madsen L, Kristiansen K, Hansen JB. Transcriptome profiling of brown adipose tissue during cold exposure reveals extensive regulation of glucose metabolism. *Am J Physiol - Endocrinol Metab.* 2015;308(5):E380–92.
163. Lasar D, Rosenwald M, Kiehlmann E, Balaz M, Tall B, Opitz L, Lidell ME, Zamboni N, Krzmar P, Sun W, Varga L, Stefanicka P, Ukropec J, Nuutila P, Virtanen K, Amri EZ, Enerbäck S, Wahli W, Wolfrum C. Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma Controls Mature Brown Adipocyte Inducibility through Glycerol Kinase. *Cell Rep.* 2018;22(3):760–73.
164. Olichon-Berthe C, Van Obberghen E, Le Marchand-Brustel Y. Effect of cold acclimation on the expression of glucose transporter Glut 4. *Mol Cell Endocrinol.* 1992;89(1–2):11–8.
165. Lee PL, Jung SM, Guertin DA. The Complex Roles of Mechanistic Target of Rapamycin in Adipocytes and Beyond. *Trends Endocrinol Metab.* 2017;28(5):319–39.
166. Tremblay F, Gagnon AM, Veilleux A, Sorisky A, Marette A. Activation of the mammalian target of rapamycin pathway acutely inhibits insulin signaling to Akt and glucose transport in 3T3-L1 and human adipocytes. *Endocrinology.* 2005;146(3):1328–37.
167. Nedergaard J, Wang Y, Cannon B. Cell proliferation and apoptosis inhibition: essential processes for recruitment of the full thermogenic capacity of brown adipose tissue. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids.* 2019;1864(1):51–8.
168. Berggreen C, Gormand A, Omar B, Degerman E, Göransson O. Protein kinase B activity is required for the effects of insulin on lipid metabolism in adipocytes. *Am J Physiol - Endocrinol Metab.* 2009;296(4).
169. Hsiao WY, Jung SM, Tang Y, Haley JA, Li R, Li H, Calejman CM, Sanchez-Gurmaches J, Hung CM, Luciano AK, DeMambro V, Wellen KE, Rosen CJ, Zhu LJ, Guertin DA. The Lipid Handling Capacity of Subcutaneous Fat Is Programmed by mTORC2 during Development. *Cell Rep.* 2020;33(1):108223.
170. Sanchez-gurmaches J, Jespersen NZ, Nielsen S, Scheele C, Guertin DA, Sanchez-gurmaches J, Tang Y, Jespersen NZ, Wallace M, Calejman CM. Brown

- Fat AKT2 Is a Cold-Induced Kinase that Stimulates ChREBP-Mediated De Novo Lipogenesis to Optimize Fuel Storage and Thermogenesis Article Brown Fat AKT2 Is a Cold-Induced Kinase that Stimulates ChREBP-Mediated De Novo Lipogenesis to Optimize Fuel Sto. *Cell Metab.* 2018;1–15.
171. Yang W-S, Jeng C-Y, Wu T-J, Tanaka S, Funahashi T, Matsuzawa Y, Wang J-P, Chen C-L, Tai T-Y, Chuang L-M. Synthetic Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- Agonist, Rosiglitazone, Increases Plasma Levels of Adiponectin in Type 2 Diabetic Patients. *Diabetes Care.* 2002 Feb 1;25(2):376–80.
 172. Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, Kihara S, Nishizawa H, Kishida K, Nagaretani H, Matsuda M, Komuro R, Ouchi N, Kuriyama H, Hotta K, Nakamura T, Shimomura I, Matsuzawa Y. PPAR γ Ligands Increase Expression and Plasma Concentrations of Adiponectin, an Adipose-Derived Protein. *Diabetes.* 2001;50(9):2094–9.
 173. Li X, Zhang D, Vatner DF, Goedeke L, Hirabara SM, Zhang Y, Perry RJ, Shulman GI. Mechanisms by which adiponectin reverses high fat diet-induced insulin resistance in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020;117(51):32584–93.
 174. Haman F, Blondin DP. Shivering thermogenesis in humans: Origin, contribution and metabolic requirement. *Temperature.* 2017;4(3):217–26.
 175. Wang Y, Kwon H, Su X, Wondisford FE. Glycerol not lactate is the major net carbon source for gluconeogenesis in mice during both short and prolonged fasting. *Mol Metab.* 2020;31(November 2019):36–44.
 176. Kalemba KM, Wang Y, Xu H, Chiles E, McMillin SM, Kwon H, Su X, Wondisford FE. Glycerol induces G6pc in primary mouse hepatocytes and is the preferred substrate for gluconeogenesis both in vitro and in vivo. *J Biol Chem.* 2019;294(48):18017–28.
 177. Wilson-Fritch L, Nicoloso S, Chouinard M, Lazar MA, Chui PC, Leszyk J, Straubhaar J, Czech MP, Corvera S. Mitochondrial remodeling in adipose tissue associated with obesity and treatment with rosiglitazone. *J Clin Invest.* 2004;114(9):1281–9.
 178. Laplante M, Festuccia WT, Soucy G, G elinas Y, Lalonde J, Berger JP, Deshaies Y. Mechanisms of the depot specificity of peroxisome proliferator-activated receptor γ action on adipose tissue metabolism. *Diabetes.* 2006;55(10):2771–8.
 179. Pisani DF, Barquissau V, Chambard JC, Beuzelin D, Ghandour RA, Giroud M, Mairal A, Pagnotta S, Cinti S, Langin D, Amri EZ. Mitochondrial fission is associated with UCP1 activity in human brite/beige adipocytes. *Mol Metab.* 2018;7(November 2017):35–44.
 180. Festuccia WT, Blanchard PG, Deshaies Y. Control of brown adipose tissue glucose and lipid metabolism by PPAR γ . *Front Endocrinol (Lausanne).* 2011;2(DEC):1–6.
 181. Zhu Y, Qi C, Korenberg JR, Chen XN, Noya D, Rao MS, Reddy JK. Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor gamma (mPPAR gamma) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR gamma isoforms. *Proc Natl Acad Sci.* 1995 Aug 15;92(17):7921–5.
 182. Fajas L, Auboeuf D, Rasp e E, Schoonjans K, Lefebvre A-M, Saladin R, Najib J, Laville M, Fruchart J-C, Deeb S, Vidal-Puig A, Flier J, Briggs MR, Staels B, Vidal H, Auwerx J. The Organization, Promoter Analysis, and Expression of the Human PPAR γ Gene. *J Biol Chem.* 1997 Jul 25;272(30):18779–89.
 183. Elbrecht A, Chen Y, Cullinan CA, Hayes N, Leibowitz MD, Moller DE, Berger J. Molecular Cloning, Expression and Characterization of Human Peroxisome Proliferator Activated Receptors γ 1 and γ 2. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996 Jul;224(2):431–7.
 184. Braissant O, Foufelle F, Scotto C, Dau ca M, Wahli W. Differential expression of

- peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology*. 1996 Jan;137(1):354–66.
185. Mukherjee R, Jow L, Croston GE, Paterniti JR. Identification, Characterization, and Tissue Distribution of Human Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR) Isoforms PPAR γ 2 versus PPAR γ 1 and Activation with Retinoid X Receptor Agonists and Antagonists. *J Biol Chem*. 1997 Mar 21;272(12):8071–6.
 186. Rosen ED, Spiegelman BM. PPAR : a Nuclear Regulator of Metabolism, Differentiation, and Cell Growth. *J Biol Chem*. 2001 Oct 12;276(41):37731–4.
 187. Alimirah F, Peng X, Yuan L, Mehta RR, von Knethen A, Choubey D, Mehta RG. Crosstalk between the peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) and the vitamin D receptor (VDR) in human breast cancer cells: PPAR γ binds to VDR and inhibits 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ mediated transactivation. *Exp Cell Res*. 2012;318(19):2490–7.
 188. Soccio RE, Chen ER, Lazar MA. Thiazolidinediones and the promise of insulin sensitization in type 2 diabetes. *Cell Metab*. 2014;20(4):573–91.
 189. Nedergaard J, Petrovic N, Lindgren EM, Jacobsson A, Cannon B. PPAR?? in the control of brown adipocyte differentiation. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2005 May 30 [cited 2016 May 10];1740(2):293–304.
 190. Lüdtke A, Buettner J, Schmidt HHJ, Worman HJ. New PPAR γ mutation leads to lipodystrophy and loss of protein function that is partially restored by a synthetic ligand. *J Med Genet*. 2007;44(9):1–5.
 191. Blanchard PG, Turcotte V, Côté M, Gélinas Y, Nilsson S, Olivecrona G, Deshaies Y, Festuccia WT. Peroxisome proliferator-activated receptor γ activation favours selective subcutaneous lipid deposition by coordinately regulating lipoprotein lipase modulators, fatty acid transporters and lipogenic enzymes. *Acta Physiol*. 2016 Jul;217(3):227–39.
 192. Festuccia WT, Blanchard P-G, Turcotte V, Laplante M, Sariahmetoglu M, Brindley DN, Deshaies Y. Depot-specific effects of the PPAR γ agonist rosiglitazone on adipose tissue glucose uptake and metabolism. *J Lipid Res*. 2009;50(6):1185–94.
 193. Tan GD, Fielding BA, Currie JM, Humphreys SM, Dörsage M, Frayn KN, Laville M, Vidal H, Karpe F. The effects of rosiglitazone on fatty acid and triglyceride metabolism in type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2005 Jan 24;48(1):83–95.
 194. Imai T, Takakuwa R, Marchand S, Dentz E, Bornert J-M, Messaddeq N, Wendling O, Mark M, Desvergne B, Wahli W, Chambon P, Metzger D. Peroxisome proliferator-activated receptor is required in mature white and brown adipocytes for their survival in the mouse. *Proc Natl Acad Sci*. 2004 Mar 30;101(13):4543–7.
 195. Tontonoz P, Spiegelman BM. Fat and Beyond: The Diverse Biology of PPAR γ . *Annu Rev Biochem*. 2008 Jun;77(1):289–312.
 196. Peng J, Huan Y, Jiang Q, Sun SJ, Jia CM, Shen ZF. Effects and potential mechanisms of pioglitazone on lipid metabolism in obese diabetic KKAy mice. *PPAR Res*. 2014;2014.
 197. Giorgino F, Leonardini A, Laviola L, Perrini S, Natalicchio A. Cross-Talk between PPAR γ and insulin signaling and modulation of Insulin Sensitivity. *PPAR Res*. 2009;2009.
 198. Johnson AMF, Olefsky JM. The origins and drivers of insulin resistance. *Cell*. 2013;152(4):673–84.
 199. Festuccia WT, Blanchard P-G, Oliveira TB, Magdalon J, Paschoal V a, Richard D, Deshaies Y. PPAR activation attenuates cold-induced upregulation of thyroid status and brown adipose tissue PGC-1 and D2. *AJP Regul Integr Comp Physiol*. 2012 Dec 15;303(12):R1277–85.

200. Siersbaek R, Nielsen R, Mandrup S. PPAR γ in adipocyte differentiation and metabolism - Novel insights from genome-wide studies. *FEBS Lett.* 2010 Aug 4;584(15):3242–9.
201. Festuccia WT, Oztezcan S, Laplante M, Berthiaume M, Michel C, Dohgu S, Denis RG, Brito MN, Brito NA, Miller DS, Banks WA, Bartness TJ, Richard D, Deshaies Y. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ -mediated positive energy balance in the rat is associated with reduced sympathetic drive to adipose tissues and thyroid status. *Endocrinology.* 2008 May;149(5):2121–30.
202. Jiang G, Dallas-Yang Q, Li Z, Szalkowski D, Liu F, Shen X, Wu M, Zhou G, Doebber T, Berger J, Moller DE, Zhang BB. Potentiation of insulin signaling in tissues of Zucker obese rats after acute and long-term treatment with PPAR γ agonists. *Diabetes.* 2002;51(8):2412–9.
203. Hammarstedt A, Rotter Sopasakis V, Gogg S, Jansson PA, Smith U. Improved insulin sensitivity and adipose tissue dysregulation after short-term treatment with pioglitazone in non-diabetic, insulin-resistant subjects. *Diabetologia.* 2005;48(1):96–104.
204. Sugii S, Olson P, Sears DD, Saberi M, Atkins AR, Barish GD, Hong SH, Castro GL, Yin YQ, Nelson MC, Hsiao G, Greaves DR, Downes M, Yu RT, Olefsky JM, Evans RM. PPAR γ activation in adipocytes is sufficient for systemic insulin sensitization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(52):22504–9.
205. Blüher M, Michael MD, Peroni OD, Ueki K, Carter N, Kahn BB, Kahn CR. Adipose tissue selective insulin receptor knockout protects against obesity and obesity-related glucose intolerance. *Dev Cell.* 2002;3(1):25–38.
206. Blüher M, Kahn BB, Kahn CR. Extended longevity in mice lacking the insulin receptor in adipose tissue. *Science (80-).* 2003;299(5606):572–4.
207. Boucher J, Softic S, El Ouaamari A, Krumpoch MT, Kleinridders A, Kulkarni RN, O'Neill BT, Kahn CR. Differential roles of insulin and IGF-1 receptors in adipose tissue development and function. *Diabetes.* 2016;65(8):2201–13.
208. Nelson VLB, Jiang YP, Dickman KG, Ballou LM, Lin RZ. Adipose tissue insulin resistance due to loss of PI3K p110 α leads to decreased energy expenditure and obesity. *Am J Physiol - Endocrinol Metab.* 2014;306(10).
209. Morley TS, Xia JY, Scherer PE. Selective enhancement of insulin sensitivity in the mature adipocyte is sufficient for systemic metabolic improvements. *Nat Commun.* 2015;6.
210. Komazawa N, Matsuda M, Kondoh G, Mizunoya W, Iwaki M, Takagi T, Sumikawa Y, Inoue K, Suzuki A, Mak TW, Nakano T, Fushiki T, Takeda J, Shimomura I. Enhanced insulin sensitivity, energy expenditure and thermogenesis in adipose-specific Pten suppression in mice. *Nat Med.* 2004;10(11):1208–15.
211. Shan T, Zhang P, Jiang Q, Xiong Y, Wang Y. Adipocyte-specific deletion of mTOR inhibits adipose tissue development and causes insulin resistance in mice. *Diabetologia.* 2016;1995–2004.
212. Stanford KI, Middelbeek RJ, Townsend KL, An D, Nygaard EB, Hitchcox KM, Markan KR, Nakano K, Hirshman MF, Tseng YH, Goodyear LJ. Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity. *J Clin Invest.* 2013;123(1):215–23.
213. Wasserman D, Rm LH. Regulation of Muscle Glucose Uptake Regulation and Assessment of Muscle Glucose Uptake.
214. Markan KR, Naber MC, Ameka MK, Anderegg MD. Circulating FGF21 Is Liver Derived and Enhances Glucose Uptake During Refeeding and Overfeeding. 2014;63(April):4057–63.
215. Caron A, Bakan I, Laplante M, Carpentier C, Lecomte R, Richard D. In vivo measurement of energy substrate contribution to cold-induced brown adipose

- tissue thermogenesis. 2019;
216. Rieusset J, Andreelli F, Auboeuf D, Roques M, Va P, Riou JP, Auwerx J, Laville M, Vi H. Insulin Acutely Regulates the Expression of the. (23):699–706.
 217. Kim H, Kim M, Im S-K, Fang S. Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes. *Lab Anim Res.* 2018;34(4):147.
 218. Cardoso AR, Kakimoto PAHB, Kowaltowski AJ. Diet-Sensitive Sources of Reactive Oxygen Species in Liver Mitochondria: Role of Very Long Chain Acyl-CoA Dehydrogenases. *PLoS One.* 2013;8(10):1–13.
 219. Menezes-Filho SL, Amigo I, Prado FM, Ferreira NC, Koike MK, Pinto IFD, Miyamoto S, Montero EFS, Medeiros MHG, Kowaltowski AJ. Caloric restriction protects livers from ischemia/reperfusion damage by preventing Ca²⁺-induced mitochondrial permeability transition. *Free Radic Biol Med.* 2017;110(May):219–27.
 220. Kruger NJ. The Bradford method for protein quantitation. In: *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). New Jersey: Humana Press; 1994. p. 9–15.
 221. Kakimoto PA, Chausse B, Caldeira Da Silva CC, Júnior JD, Kowaltowski AJ. Resilient hepatic mitochondrial function and lack of iNOS dependence in diet-induced insulin resistance. *PLoS One.* 2019;14(2):1–17.
 222. Bian YH, Xu J, Zhao WY, Zhang ZZ, Tu L, Cao H, Zhang ZG. Targeting mTORC2 component rictor inhibits cell proliferation and promotes apoptosis in gastric cancer. *Am J Transl Res.* 2017;9(9):4317–30.
 223. Cao W, Li M, Wu T, Feng F, Feng T, Xu Y, Sun C. αMSH prevents ROS-induced apoptosis by inhibiting Foxo1/mTORC2 in mice adipose tissue. *Oncotarget.* 2017;8(25):40872–84.
 224. Yoon MS. The role of mammalian target of rapamycin (mTOR) in insulin signaling. *Nutrients.* 2017;9(11).
 225. Panasyuk G, Espeillac C, Chauvin C, Pradelli LA, Horie Y, Suzuki A, Annicotte JS, Fajas L, Foretz M, Verdeguer F, Pontoglio M, Ferré P, Scoazec JY, Birnbaum MJ, Ricci JE, Pende M. PPAR γ contributes to PKM2 and HK2 expression in fatty liver. *Nat Commun.* 2012;3(Umr 8104).
 226. Lee YK, Park JE, Lee M, Hardwick JP. Hepatic lipid homeostasis by peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2. *Liver Res.* 2018;2(4):209–15.
 227. Armoni M, Harel C, Karni S, Chen H, Bar-Yoseph F, Ver MR, Quon MJ, Karnieli E. FOXO1 represses peroxisome proliferator-activated receptor- γ 1 and - γ 2 gene promoters in primary adipocytes: A novel paradigm to increase insulin sensitivity. *J Biol Chem.* 2006;281(29):19881–91.
 228. Gross DN, Van Den Heuvel APJ, Birnbaum MJ. The role of FoxO in the regulation of metabolism. *Oncogene.* 2008;27(16):2320–36.
 229. Ioannilli L, Ciccarone F, Ciriolo MR. Adipose Tissue and FoxO1: Bridging Physiology and Mechanisms. *Cells.* 2020 Mar 31;9(4):849.
 230. Vadlakonda L, Dash A, Pasupuleti M, Kumar KA. The paradox of Akt-mTOR interactions. 2013;3(June):1–9.
 231. Jung SM, Hung C, Hildebrand SR, Sanchez-Gurmaches J, Martinez-Pastor B, Gengatharan JM, Wallace M, Mukhopadhyay D, Martinez Calejman C, Luciano AK, Hsiao W, Tang Y, Li H, Daniels DL, Mostoslavsky R, Metallo CM, Guertin DA. Non-canonical mTORC2 Signaling Regulates Brown Adipocyte Lipid Catabolism through SIRT6-FoxO1. *Mol Cell.* 2019 Aug;75(4):807-822.e8.
 232. Torres-Castillo N, Silva-Gómez JA, Campos-Perez W, Barron-Cabrera E, Hernandez-Cañaveral I, Garcia-Cazarin M, Marquez-Sandoval Y, Gonzalez-Becerra K, Barron-Gallardo C, Martinez-Lopez E. High Dietary ω -6: ω -3 PUFA Ratio Is Positively Associated with Excessive Adiposity and Waist Circumference. *Obes Facts.* 2018;11(4):344–53.

233. Simopoulos AP. An increase in the Omega-6/Omega-3 fatty acid ratio increases the risk for obesity. *Nutrients*. 2016;8(3):1–17.
234. Simopoulos AP, DiNicolantonio JJ. The importance of a balanced ω -6 to ω -3 ratio in the prevention and management of obesity. *Open Hear*. 2016 Sep 25;3(2):e000385.
235. Flachs P, Horakova O, Brauner P, Rossmeisl M, Pecina P, Franssen-Van Hal N, Ruzickova J, Sponarova J, Drahotka Z, Vlcek C, Keijer J, Houstek J, Kopecky J. Polyunsaturated fatty acids of marine origin upregulate mitochondrial biogenesis and induce β -oxidation in white fat. *Diabetologia*. 2005;48(11):2365–75.
236. Belchior T, Paschoal VA, Magdalon J, Chimin P, Farias TM, Chaves-Filho AB, Gorjão R, St.-Pierre P, Miyamoto S, Kang JX, Deshaies Y, Marette A, Festuccia W. Omega-3 fatty acids protect from diet-induced obesity, glucose intolerance, and adipose tissue inflammation through PPAR γ -dependent and PPAR γ -independent actions. *Mol Nutr Food Res*. 2015;59(5):957–67.
237. Hegde M V., Zanzwar AA, Adekar SP. Omega-3 fatty acids: Keys to nutritional health [Internet]. *Omega-3 Fatty Acids: Keys to Nutritional Health*. 2016. 1–610 p.
238. Bargut TCL, Souza-Mello V, Mandarim-De-Lacerda CA, Aguila MB. Fish oil diet modulates epididymal and inguinal adipocyte metabolism in mice. *Food Funct*. 2016;7(3):1468–76.
239. Flachs P, Rossmeisl M, Kopecky J. The effect of n-3 fatty acids on glucose homeostasis and insulin sensitivity. *Physiol Res*. 2014;63(SUPPL.):93–118.
240. Kuda O, Rossmeisl M, Kopecky J. Omega-3 fatty acids and adipose tissue biology. *Mol Aspects Med*. 2018;64:147–60.
241. Morris DL, Singer K, Lumeng CN. Adipose tissue macrophages: phenotypic plasticity and diversity in lean and obese states. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2011 Jul 20;14(4):341–6.
242. Lepretti M, Martucciello S, Aceves MAB, Putti R, Lionetti L. Omega-3 fatty acids and insulin resistance: focus on the regulation of mitochondria and endoplasmic reticulum stress. *Nutrients*. 2018;10(3):1–20.
243. Moreira RJ, Castro É, Oliveira TE, Belchior T, Peixoto AS, Chaves-Filho AB, Moreno MF, Lima JD, Yoshinaga M, Miyamoto S, Morais MRPT, Zorn TMT, Cogliati B, Iwai LK, Palmisano G, Cabral FJ, Festuccia W. Lipoatrophy-Associated Insulin Resistance and Hepatic Steatosis are Attenuated by Intake of Diet Rich in Omega 3 Fatty Acids. *Mol Nutr Food Res*. 2020;64(7):1–13.
244. Oh DY, Talukdar S, Bae EJ, Imamura T, Morinaga H, Fan WQ, Li P, Lu WJ, Watkins SM, Olefsky JM. GPR120 Is an Omega-3 Fatty Acid Receptor Mediating Potent Anti-inflammatory and Insulin-Sensitizing Effects. *Cell*. 2010;142(5):687–98.
245. Belchior T, Paschoal VA, Magdalon J, Chimin P, Farias TM, Chaves-filho AB, Gorj R, Kang JX, Deshaies Y, St P, Miyamoto S, Chaves-filho AB, Gorj R, Festuccia W, Kang JX, Deshaies Y. Omega-3 fatty acids protect from diet-induced obesity , glucose intolerance , and adipose tissue inflammation through PPAR γ - dependent and PPAR γ -independent actions. 2015;957–67.
246. Puglisi M, Hastly A, Saraswathi V. The role of adipose tissue in mediating the beneficial effects of dietary fish oil. *J Nutr Biochem*. 2011;22(2):101–8.

247. Petto J, Carlos A, Motta MT, Santos R, Filho T, Gibran D, Santo E, Lázaro J, Ribas L, Marice A, Ladeia T. Adiponectina : Caracterização , Ação Metabólica e Cardiovascular. 2015;28(5):424–32.
248. Rossi A, Lord JM, Ampk M-Á. Adiponectin inhibits neutrophil apoptosis via activation of AMP kinase , PKB and ERK 1 / 2 MAP kinase. 2013;1469–80.
249. Pinel A, Rigaudière JP, Jouve C, Capel F. Modulation of insulin resistance and the adipocyte-skeletal muscle cell cross-talk by LCn-3PUFA. *Int J Mol Sci.* 2018;19(9).
250. Oliveira TE, Castro É, Belchior T, Andrade ML, Chaves-Filho AB, Peixoto AS, Moreno MF, Ortiz-Silva M, Moreira RJ, Inague A, Yoshinaga MY, Miyamoto S, Moustaid-Moussa N, Festuccia WT. Fish Oil Protects Wild Type and Uncoupling Protein 1-Deficient Mice from Obesity and Glucose Intolerance by Increasing Energy Expenditure. *Mol Nutr Food Res.* 2019;63(7):1–13.
251. Bargut TCL, Silva-e-Silva ACAG, Souza-Mello V, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Mice fed fish oil diet and upregulation of brown adipose tissue thermogenic markers. *Eur J Nutr.* 2016;55(1):159–69.
252. Kim M, Goto T, Yu R, Uchida K, Tominaga M, Kano Y, Takahashi N, Kawada T. Fish oil intake induces UCP1 upregulation in brown and white adipose tissue via the sympathetic nervous system. *Sci Rep.* 2015 Nov 17;5(April):18013.
253. Lund J, Larsen LH, Lauritzen L. Fish oil as a potential activator of brown and beige fat thermogenesis. *Adipocyte.* 2018;7(2):88–95.
254. Bargut TCL, Santos LP, Machado DGL, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Eicosapentaenoic acid (EPA) vs. Docosahexaenoic acid (DHA): Effects in epididymal white adipose tissue of mice fed a high-fructose diet. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids.* 2017;123:14–24.
255. Derogis PBMC, Freitas FP, Marques ASF, Cunha D, Appolinário PP, de Paula F, Lourenço TC, Murgu M, Di Mascio P, Medeiros MHG, Miyamoto S. The Development of a Specific and Sensitive LC-MS-Based Method for the Detection and Quantification of Hydroperoxy- and Hydroxydocosahexaenoic Acids as a Tool for Lipidomic Analysis. *PLoS One.* 2013;8(10):1–13.
256. Gu Z, Wu J, Wang S, Suburu J, Chen H, Thomas MJ, Shi L, Edwards IJ, Berquin IM, Chen YQ. Polyunsaturated fatty acids affect the localization and signaling of PIP3/AKT in prostate cancer cells. *Carcinogenesis.* 2013;34(9):1968–75.
257. Calder PC. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes. *Nutrients.* 2010;2(3):355–74.
258. Zhao L, Fan M, Zhao L, Yun H, Yang Y, Wang C, Qin D. Fibroblast growth factor 1 ameliorates adipose tissue inflammation and systemic insulin resistance via enhancing adipocyte mTORC2/Rictor signal. *J Cell Mol Med.* 2020;(May):12813–25.
259. Martinez N, Cheng CY, Ketheesan N, Cullen A, Tang Y, Lum J, West K, Poidinger M, Guertin DA, Singhal A, Kornfeld H. mTORC2/Akt activation in adipocytes is required for adipose tissue inflammation in tuberculosis. *EBioMedicine.* 2019;45:314–27.
260. Nicola M, Di D, Russolillo A, Lupoli R, Ambrosino P, Minno A Di, Nicola M, Di D, Russolillo A, Minno A Di, Tarantino G. Omega-3 fatty acids for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease. 2012;18(41):5839–47.
261. Sato A, Kawano H, Notsu T, Ohta M, Nakakuki M, Mizuguchi K, Itoh M, Suganami

- T, Ogawa Y. Antiobesity effect of eicosapentaenoic acid in high-fat/high-sucrose diet-induced obesity: Importance of hepatic lipogenesis. *Diabetes*. 2010;59(10):2495–504.
262. Han J, Wang Y. mTORC1 signaling in hepatic lipid metabolism. *Protein Cell*. 2018;9(2):145–51.