

Ministério da Saúde  
FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR  
**Mestrado em Biologia Celular e Molecular**

**EFEITOS DA LEPTINA NA ADIPOGÊNESE E  
PRODUÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS POR  
ADIPÓCITOS 3T3-L1**

LOHANNA PALHINHA DO AMARAL

RIO DE JANEIRO - RJ

2017

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Mestrado em Biologia Celular e Molecular**

LOHANNA PALHINHA DO AMARAL

EFEITOS DA LEPTINA NA ADIPOGÊNESE E PRODUÇÃO DE MEDIADORES  
INFLAMATÓRIOS POR ADIPÓCITOS 3T3-L1

Orientadora: Clarissa Menezes Maya Monteiro

Dissertação desenvolvida no Laboratório de Imunofarmacologia – Instituto Oswaldo Cruz e apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

RIO DE JANEIRO – RJ

2017

Amaral, Lohanna Palhinha do.

Efeitos da leptina na adipogênese e produção de mediadores inflamatórios por adipócitos 3T3-L1 / Lohanna Palhinha do Amaral. - Rio de Janeiro, 2017.

88 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2017.

Orientadora: Clarissa Menezes Maya Monteiro.

Bibliografia: f. 49-64

1. Adipogênese. 2. Obesidade. 3. Leptina. 4. 3T3-L1. 5. Gotas lipídicas. I. Título.

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Mestrado em Biologia Celular e Molecular**

Lohanna Palhinha do Amaral

**EFEITOS DA LEPTINA NA ADIPOGÊNESE E PRODUÇÃO DE MEDIADORES  
INFLAMATÓRIOS POR ADIPÓCITOS 3T3-L1**

**ORIENTADORA:** Profa. Dra. Clarissa Menezes Maya Monteiro

Aprovada em 13/02/2017

**EXAMINADORES:**

Profa. Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani – Presidente

Prof. Dr. Dumith Chequer Bou-Habib

Prof. Dr. Pedro Manoel Mendes de Moraes Vieira

Profa. Dra. Christianne Bandeira de Melo – Revisora e Suplente

Prof. Dr. Vinícius de Frias Carvalho – Suplente

Rio de Janeiro, 13 de fevereiro de 2017

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família e amigos por toda a torcida e suporte nos momentos difíceis e decisivos. Obrigada por não terem desistido de mim quando eu quase o fiz. Vocês me mantiveram nos trilhos por incontáveis vezes, algumas das quais vocês nem têm conhecimento. Sei que vão continuar me apoiando em tudo que eu precisar, me confortando e me mostrando o lado positivo até do que der errado. Por essas e outras, este trabalho e todos os que vierem eu dedico a vocês.

Ao meu grande parceiro e amigo, Eugenio Hottz, por todas as discussões científicas, ideias, por toda a ajuda na execução de vários experimentos e por todas as bobearias do tipo luva e gelo seco – que agora, só agora (não faça de novo), eu reconheço como um momento de descontração. Nosso convívio tornou esse período muito mais prazeroso. Agradeço pelo companheirismo dentro e fora do laboratório, por me chantagear/esconder meu celular e fazer com que eu escrevesse mais rápido, por estar sempre presente e me fazendo bem de alguma forma. E é claro, por ter sido e por ser uma grande inspiração para mim.

À minha orientadora Clarissa Maya Monteiro, que muitas vezes abriu mão de ser legal para me colocar na linha (brincadeira!). Sem sua insistência e seus argumentos para não me deixar desistir de Biomedicina, eu provavelmente estaria terminando um curso de Administração agora... Agradeço do fundo do meu tecido adiposo pela paciência de me convencer a continuar fazendo o que eu realmente gosto. Obrigada também pela confiança, pelos puxões de orelha merecidos e pelos momentos de descontração e amizade. Beijos assépticos no coração!

Agradeço à Dra. Patrícia T. Bozza por me receber em seu laboratório quando eu era apenas uma caloura assustada. Aos amigos do Laboratório de Imunofarmacologia pelas contribuições, dicas, reclamações compartilhadas e festinhas! Um agradecimento especial à Dra. Cecília de Almeida por sua contribuição intelectual e aos amigos Edson Cabeça de Assis e Rose Branco Rodrigues por arrumarem nossas bagunças e auxiliarem em todas as burocracias administrativas que não são muito o nosso forte.

Às meninas-leptina, Sally Liechocki, Glaucia Almeida e Narayana Fazolini, agradeço profundamente por todos os *brainstorms*, ensinamentos e momentos compartilhados. Agradeço em especial à paulista mais gente boa do mundo, Jéssica Aparecida Pereira, minha parceira de ELISAs, contas intermináveis, experimentos noturnos, venenos e marmotas. Mesmo em pouco tempo construímos uma amizade muito especial e indispensável, agora com novo itinerário! Sem você esse período teria sido muito mais difícil, cabrita.

Agradeço à Dra. Christianne Bandeira de Melo, da UFRJ, e às suas alunas Maria Lira e Natália Amorim pela colaboração no projeto.

Muito obrigada aos professores, coordenadores e à equipe da secretaria acadêmica do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, em especial à Julimar Loures da Silva Ferreira por sua boa vontade e competência inquestionáveis ao tratar dos assuntos administrativos da pós-graduação e por tornar nossa vida tão mais fácil!

Agradeço também ao suporte financeiro do CNPq, CAPES-SUS, FAPERJ e FIOCRUZ.

*Happiness can be found  
Even in the darkest of times  
If one only remembers  
To turn on the lights*

J. K. Rowling

## SUMÁRIO

<b>Lista de Figuras</b> .....	viii
<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	ix
<b>Resumo</b> .....	xii
<b>Abstract</b> .....	xiii
<b>1. Introdução</b> .....	1
1.1. Epidemiologia da Obesidade .....	2
1.2. Obesidade metabolismo e inflamação .....	3
1.3. Adipogênese.....	6
1.3.1. Caveolinas .....	9
1.3.2. Perilipinas.....	10
1.4. Leptina e balanço energético .....	13
<b>2. Objetivos</b> .....	20
2.1. Objetivo Geral.....	20
2.2. Objetivos Específicos.....	20
<b>3. Materiais e Métodos</b> .....	21
3.1. Cultura de células NIH3T3-L1 .....	21
3.2. Formação de gotas lipídicas.....	22
3.3. Análise da expressão de proteínas por <i>Western Blot</i> .....	23
3.4. Dosagem de citocinas e mediadores lipídicos .....	23
3.5. Análises estatísticas .....	23
<b>4. Resultados</b> .....	25
4.1. Diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1 .....	25
4.2. Leptina ativa as vias de JAK2/STAT3 e PI3K/AKT/mTOR em adipócitos .....	28
4.3. Leptina induz a diferenciação de adipócitos 3T3-L1 .....	29
4.4. Leptina substitui insulina na indução da adipogênese .....	33
4.5. Leptina modula a produção de eicosanóides durante a adipogênese .....	35
4.6. Leptina induz aumento da expressão e secreção de TNF- $\alpha$ .....	38
<b>5. Discussão</b> .....	39
<b>6. Conclusões</b> .....	48
<b>Referências</b> .....	49
Anexo I. Leptina ativa JAK2 e AKT em adipócitos.....	65
Anexo II. Redução de PLIN2 por leptina ao longo da adipogênese.....	66
Anexo III. Leptina diminui expressão de PLIN2 em pré-adipócitos.....	67



Anexo IV. Leptina aumenta a expressão de PLIN1 em fases tardias da adipogênese .....	68
Anexo V. Leptina aumenta caveolina-1 em pré-adipócitos e adipócitos .....	69
Anexo VI. Leptina aumenta PPAR $\gamma$ em pré-adipócitos e adipócitos.....	70
Anexo VII. Leptina aumenta SREBP-1c em pré-adipócitos e adipócitos.....	71
Anexo VIII. Leptina diminui a expressão de COX-2 em pré-adipócitos e adipócitos.....	72
Anexo IX. Leptina diminui agudamente expressão de COX-2 em pré-adipócitos e adipócitos .....	73
Anexo X. Leptina diminui a expressão de COX-1 em pré-adipócitos e adipócitos.....	74
Anexo XI. Leptina aumenta TNF- $\alpha$ em pré-adipócitos e adipócitos.....	75

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Sobrepeso e obesidade no Brasil.....	3
Figura 1.2. Desenvolvimento da síndrome metabólica associada à obesidade .....	5
Figura 1.3. Mecanismos moleculares da adipogênese.....	7
Figura 1.4. Regulação da lipólise por PLIN1 .....	12
Figura 1.5. Ações de leptina e insulina no balanço energético.....	17
Figura 1.6. Sinalização de leptina e insulina no núcleo ARC .....	18
Figura 3.1. Protocolo de diferenciação de pré-adipócitos da linhagem NIH3T3-L1 .....	22
Figura 4.1. Diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1 .....	26
Figura 4.2. Adipócitos 3T3-L1 secretam leptina.....	27
Figura 4.3. Leptina induz fosforilação de JAK2, AKT e S6K .....	29
Figura 4.4. Leptina induz aumento de gotas lipídicas em adipócitos.....	30
Figura 4.5. Leptina modula a expressão de proteínas relacionadas à adipogênese.....	32
Figura 4.6. Leptina substitui insulina durante a diferenciação de células 3T3-L1 .....	34
Figura 4.7. Leptina reduz expressão de COX-1 e COX-2.....	36
Figura 4.8. Leptina aumenta a secreção de PGD2 durante a adipogênese .....	37
Figura 4.9. Leptina induz aumento de TNF- $\alpha$ em pré-adipócitos e adipócitos.....	38
Figura 6.1. Efeitos pró-adipogênicos da leptina.....	48

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADRP	proteína relacionada ao tecido adiposo
AICAR:	5-Aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleotídeo
AgRP	proteína relacionada a agouti
AMP	adenosina monofosfato
AMPc	adenosina monofosfato cíclica
AMPK	quinase ativada por AMP
ARC	núcleo arqueado do hipotálamo
ATGL	lipase de triglicerídeos do tecido adiposo
ATP	adenosina trifosfato
C/EBP	proteína ligadora da região intensificadora CCAAT
CA	catecolaminas
CART	transcrito relacionado à cocaína e à anfetamina
CAV	caveolina
CGI-58	do inglês <i>Comparative Gene Identification 58</i>
COX	ciclooxigenase
EIA	imunoensaio enzimático
ELISA	ensaio imunossorvente ligado à enzima
eNOS	óxido nítrico sintase endotelial
ERK	quinase regulada por sinal extracelular
FAS	ácido graxo sintase
FoxO1	do inglês <i>Forkhead box O1</i>
GLUT	transportador de glicose
GTP	guanosina trifosfato
HSL	lipase hormônio-sensível

ICV	intracerebroventricular
IEC	Linhagem de células do epitélio intestinal de ratos
IKK	quinase do inibidor de $\kappa$ B
IL	interleucina
IMC	Índice de Massa Corporal
IR	receptor de insulina
IRS	substrato do receptor de insulina
IGF	fator de crescimento semelhante à insulina
JAK	quinase Janus
JNK	do inglês <i>c-Jun N-terminal Kinase</i>
LepR	receptor de leptina
LHA	área lateral hipotalâmica
LTM	antagonista de LepR (do inglês, <i>Leptin Triple Mutant</i> )
MAPK	proteína quinase quinase quinase quinase 4 ativada por mitógenos
MCP	proteína quimioatrativa para monócitos
MCR	receptor de melanocortina
MGL	lipase de monoacilglicerol
MSC	células-tronco mesenquimais
MSH	hormônio estimulante da melanocortina
mTOR	alvo de rapamicina de mamíferos
NPY	neuropeptídeo Y
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORO	do inglês <i>Oil Red O</i>
PAT	Perilipina/ADRP/TIP47
PG	prostaglandina

PI3K	fosfatidilinositol-3 quinase
PKA/B/C	proteína quinase A/B/C
PLA <sub>2</sub>	fosfolipase A <sub>2</sub>
PLIN	perilipina
PMV	núcleo pré-mamilar hipotalâmico
POMC	proopiomelanocortina
PPAR	receptor ativado por proliferador de peroxissomos
PREF	fator de pré-adipócitos
PTP-1B	proteína fosfatase-1B
RXR	receptor de retinóide X
S6K	quinase da proteína ribossomal p70 S6
SOCS	supressor da sinalização de citocinas
SREBP	proteína ligadora da região reguladora de esteróides
STAT	transdutor de sinal e ativador da transcrição
TIP47	do inglês <i>Tail Interacting Protein 47</i>
TLR	receptor semelhante a <i>Toll</i>
TNF	fator de necrose tumoral
TZD	tiazolidinediona
VIGITEL	Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico

## RESUMO

### **EFEITOS DA LEPTINA NA ADIPOGÊNESE E RESPOSTA INFLAMATÓRIA ASSOCIADA À ADIPÓCITOS**

Lohanna Palhinha do Amaral

A leptina é uma adipocina essencial na modulação do balanço energético e peso corporal através da sua sinalização no hipotálamo, pela qual inibe a ingesta alimentar e induz o gasto energético. Além disso, a leptina tem efeitos periféricos importantes, que incluem a ativação de células do sistema imune e indução da formação de gotas lipídicas nessas células. Centralmente os efeitos lipolíticos da leptina no tecido adiposo são bastante definidos e periféricamente a leptina induz a formação de gotas lipídicas em vários tipos celulares. Contudo, as modificações induzidas pela leptina localmente nos adipócitos e sua influência na adipogênese não são totalmente esclarecidas na literatura. Estes efeitos locais da leptina são importantes na obesidade, onde existe resistência central à sinalização desta adipocina e provavelmente seus efeitos periféricos prevalecem. Nosso objetivo foi avaliar os efeitos da exposição dos adipócitos à leptina exógena *in vitro* na regulação da adipogênese e da liberação de mediadores inflamatórios. Para isso, nós diferenciamos a linhagem murina de pré-adipócitos 3T3-L1 na presença ou ausência de leptina, avaliando por *Western Blot*, ELISA/EIA e microscopia de fluorescência as células na fase não-diferenciada (pré-adipócitos) e em três fases da diferenciação dos adipócitos. Durante a adipogênese em células controle, nós observamos uma diminuição na expressão de ADRP/PLIN2 e um aumento de Perilipina/PLIN1, o que foi anteriormente associado ao crescimento das gotas lipídicas. Quando as células foram diferenciadas na presença de leptina, a redução de PLIN2 e aumento de PLIN1 foram antecipados, sugerindo a predominância de gotas lipídicas grandes, como demonstrado pelas nossas imagens de microscopia. Também observamos que o tratamento com leptina induziu um aumento na expressão dos fatores pró-adipogênicos PPAR $\gamma$  e SREBP-1c e de caveolina-1, proteína essencial para a formação de gotas lipídicas. Nós também investigamos a via de síntese de eicosanóides, sabidamente importante para a inflamação e adipogênese. Observamos uma diminuição na expressão de COX-1 e -2 e que este efeito foi potencializado pelo tratamento com leptina. Avaliamos dois dos produtos de COXs, as prostaglandinas D<sub>2</sub> e E<sub>2</sub>, associadas à indução e inibição da adipogênese, respectivamente. Observamos que, em células controle, a PGD<sub>2</sub> aumenta na primeira fase da diferenciação e é reduzida progressivamente ao longo da adipogênese, enquanto PGE<sub>2</sub> é reduzida na primeira fase e mantida em níveis baixos. O tratamento com leptina manteve a secreção de PGD<sub>2</sub> em níveis altos até as fases finais da diferenciação e não alterou PGE<sub>2</sub>, indicando que a leptina modifica o balanço de eicosanóides em células 3T3-L1, favorecendo a adipogênese. A citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  teve sua expressão e secreção aumentadas ao longo da diferenciação, e o tratamento com leptina levou a uma antecipação deste aumento. Também demonstramos que a leptina é capaz de sinalizar através de seu receptor LepRb em adipócitos 3T3-L1, ativando as vias de PI3K/AKT/mTOR e JAK2/STAT3. Concluímos que a leptina antecipa o padrão de expressão e secreção de proteínas relacionadas à adipogênese e à inflamação que seria observado apenas nas fases finais da diferenciação em células controle. Em resumo, mostramos que na ausência de seus efeitos centrais, a leptina se comporta como um fator pró-adipogênico. Estes dados contribuem para o entendimento da ação metabólica da leptina e possivelmente para futuras terapias para a obesidade.

## ABSTRACT

### **EFFECTS OF LEPTIN ON ADIPOGENESES AND ADIPOCYTE-RELATED INFLAMMATORY RESPONSE**

Lohanna Palhinha do Amaral

Leptin is an adipokine with essential roles in the modulation of energy balance and body weight through its signaling in the hypothalamus, inhibiting food intake and inducing energy expenditure. Besides, leptin also has important peripheral effects, among which are the activation and recruitment of immune cells and the induction of lipid droplets formation in these cells. Centrally, the lipolytic effects of leptin towards the adipose tissue are well defined, while peripherally it's known that leptin induces lipid droplet formation in various cell types. However, what modifications leptin can perform on its own producer cells, the adipocytes, and how leptin influences adipogenesis remain as elusive questions. During obesity, there is a central resistance to leptin's signaling and its peripheral effects probably prevail. Our aim was to evaluate the effects of adipocyte exposure to exogenous leptin in vitro in terms of adipogenesis and release of inflammatory mediators. For this purpose, we differentiated the murine lineage of preadipocytes NIH3T3-L1 in the presence or absence of leptin, monitoring cells in the undifferentiated state (preadipocytes) and in the early, middle and late phases of differentiation (adipocytes). During adipogenesis in control cells, we observed a decrease in the expression of ADRP/PLIN2 and an increase in Perilipin/PLIN1, which was previously associated to lipid droplets' enlargement. When cells were differentiated in the presence of leptin, PLIN2 reduction and PLIN1 increase were anticipated, suggesting the predominance of large lipid droplets, as demonstrated by our microscopy images. Also, leptin treatment increased the expression of proadipogenic factors such as PPAR $\gamma$  and SREBP-1c and of caveolin-1, a caveolae protein essential for lipid droplet formation. Regarding inflammation, TNF- $\alpha$  had both its expression and secretion augmented as differentiation advanced. We also investigated the arachidonic acid pathway, known to play major roles in inflammation and adipogenesis, and observed a decrease in COX-1 and -2 expressions, enzymes that catalyze the production of prostaglandins. This decrease was potentiated by leptin treatment. Two of COXs products were evaluated, prostaglandins D<sub>2</sub> and E<sub>2</sub>, associated with induction and inhibition of adipogenesis, respectively. In control cells, we saw an increase in PGD<sub>2</sub> secretion in the first phase of differentiation, progressively decreasing along with adipogenesis, while PGE<sub>2</sub> is reduced in the first phase and kept at low levels. Leptin treatment maintained PGD<sub>2</sub> secretion at high levels until the final phases of differentiation and didn't alter PGE<sub>2</sub>, indicating that leptin shifts eicosanoid balance in 3T3-L1 cells, favouring adipogenesis. The secretion and expression of the proinflammatory cytokine TNF- $\alpha$  were augmented during differentiation, and leptin treatment anticipated this increase. We also showed that leptin is able to signal through its receptor LepRb in 3T3-L1 adipocytes, activating PI3K/AKT/mTOR and JAK2/STAT3 pathways. We concluded that leptin anticipates the pattern of expression and secretion of adipogenesis- and inflammation-related proteins that would only be observed in later phases in control cells. In summary, we showed that, in the absence of its central signaling, leptin behaves as a proadipogenic factor. These findings contribute to the understanding of leptin's metabolic actions and possibly for the development of future therapies for obesity.

## 1. Introdução

A obesidade é caracterizada pelo aumento do peso corporal, desbalanço hormonal, e inflamação crônica de baixo grau. Pode ser causada por fatores genéticos, epigenéticos, ambientais e até mesmo psicológicos (Hotamisligil 2006). A ingestão de dietas hipercalóricas leva à hipertrofia do tecido adiposo devido ao armazenamento do excesso de calorias na forma de ácidos graxos (Guilherme et al. 2008; Hotamisligil 2006). O aumento da massa de tecido adiposo consiste em um maior acúmulo lipídico pelos adipócitos e na geração destes através da diferenciação de pré-adipócitos, processo altamente controlado chamado de adipogênese (Lefterova et al. 2014). Além disso, já foi demonstrado que a proliferação de células precursoras de adipócitos também é um evento importante para a hipertrofia do tecido adiposo (Jeffery et al. 2015). O tecido adiposo é um órgão endócrino importante no controle do peso corporal e balanço energético através da produção de adipocinas como a leptina (Varela and Horvath 2012). A leptina tem efeitos centrais no hipotálamo, onde induz o gasto energético e a inibição da ingesta alimentar (Kwon, Kim, and Kim 2016; Varela and Horvath 2012). Além destes, a leptina tem efeitos periféricos em vários outros tipos celulares geralmente ativando vias de diferenciação (Scheller et al. 2010), de proliferação e sobrevivência, como demonstrado em células de câncer de mama (Blanquer-Rosselló et al. 2015; Wei et al. 2016) e células epiteliais (Fazolini et al. 2015), além de induzir a ativação de células do sistema imune, como demonstrado pelo nosso grupo em macrófagos (Maya-Monteiro et al. 2008).

O aumento da massa adiposa ativa respostas inflamatórias relacionadas à hipóxia dos adipócitos e à lipotoxicidade provocada pelo excesso de ácidos graxos, elevando a produção de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$  e a interleucina (IL)-6 e quimiocinas como a proteína quimioatrativa de monócitos (MCP)-1 por adipócitos e macrófagos residentes no tecido (Hotamisligil 2006; Hellmann et al. 2013; Ray, Mahata, and De 2016; Guilherme et al. 2008). A secreção desses fatores induz o recrutamento de células do sistema imune para o tecido adiposo, principalmente macrófagos, que então contribuem para a manutenção da inflamação. Já foi mostrado que TNF- $\alpha$ , uma das principais citocinas secretadas durante a obesidade, induz lipólise. A lipólise contribui de forma importante para o aumento de ácidos graxos livres na circulação observado em pacientes obesos. Os ácidos graxos livres podem ser tóxicos para as células e seu excesso acaba levando ao acúmulo ectópico de gordura, causando disfunção em células  $\beta$  e células musculares, por exemplo. Isto, combinado ao excesso de glicose no sangue e sobrecarga de células  $\beta$  devido à intensa produção de insulina, culmina no desenvolvimento de resistência à insulina que frequentemente evolui para o quadro de diabetes do tipo 2 (Hotamisligil 2006; Hellmann et al. 2013; Ray, Mahata, and De 2016; Guilherme et al. 2008). Outras comorbidades podem se desenvolver a partir do quadro de



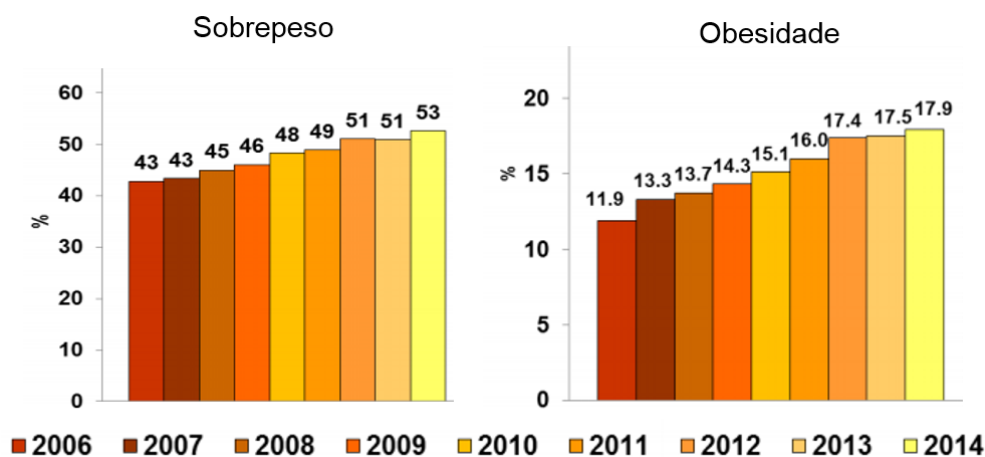
obesidade: a deposição de placas de gordura em vasos sanguíneos pode levar à diversos problemas cardiovasculares (aterosclerose e ao infarto do miocárdio entre outros) e a ativação de vias de proliferação celular pode culminar no aparecimento de vários tipos de câncer (Bullwinkle et al. 2016; Maya-Monteiro and Bozza 2008). A obesidade vem sendo bastante estudada nas últimas três décadas. Porém, devido à complexidade e à influência da doença em praticamente todos os sistemas do organismo, a investigação sobre os mecanismos envolvidos nas alterações metabólicas se faz cada vez mais necessária.

### **1.1. Epidemiologia da Obesidade**

A obesidade é uma doença inflamatória crônica cujos índices vêm crescendo progressivamente ao redor do mundo. Paradoxalmente, é ao mesmo tempo uma das doenças mais visíveis e mais negligenciadas da atualidade. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS 2016), em 2014, 39% da população adulta mundial tinha sobrepeso e 13% apresentava obesidade. O desenvolvimento de sobrepeso e a evolução para a obesidade tendem a aumentar com a facilidade de acesso a alimentos de baixo valor nutricional e ricos em gordura e açúcar, elevando cada vez mais o risco de incidência de comorbidades como aterosclerose, câncer e diabetes tipo 2, além de distúrbios psicossociais e econômicos de grande impacto.

De acordo com a Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL), os índices de sobrepeso e obesidade no Brasil em adultos cresceram de 43% e 11,9% em 2006 para 52,5% e 17,9% em 2014, respectivamente (**Figura 1.1**) (Ministério da Saúde 2015). A classificação do estado nutricional é feita com base no índice de massa corporal (IMC), calculado através da fórmula: peso (kg)/altura<sup>2</sup> (m). O IMC maior ou igual a 25 é considerado sobrepeso e maior ou igual a 30, obesidade.

A obesidade envolve o aumento do tecido adiposo, e isto implica não somente em um maior acúmulo lipídico nos adipócitos, mas também na proliferação de células precursoras e diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos para que o tecido se adapte à maior demanda de armazenamento (Jeffery et al. 2015). Este processo de diferenciação é chamado adipogênese.



**Figura 1.1. Sobrepeso e obesidade no Brasil.** Porcentagem de indivíduos brasileiros com sobrepeso e obesidade, no período de 2006 a 2014, de acordo com a VIGITEL. Total de 40853 entrevistas. Imagem adaptada de: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/abril/15/PPT-Vigitel-2014-.pdf>.

## 1.2. Obesidade: metabolismo e inflamação

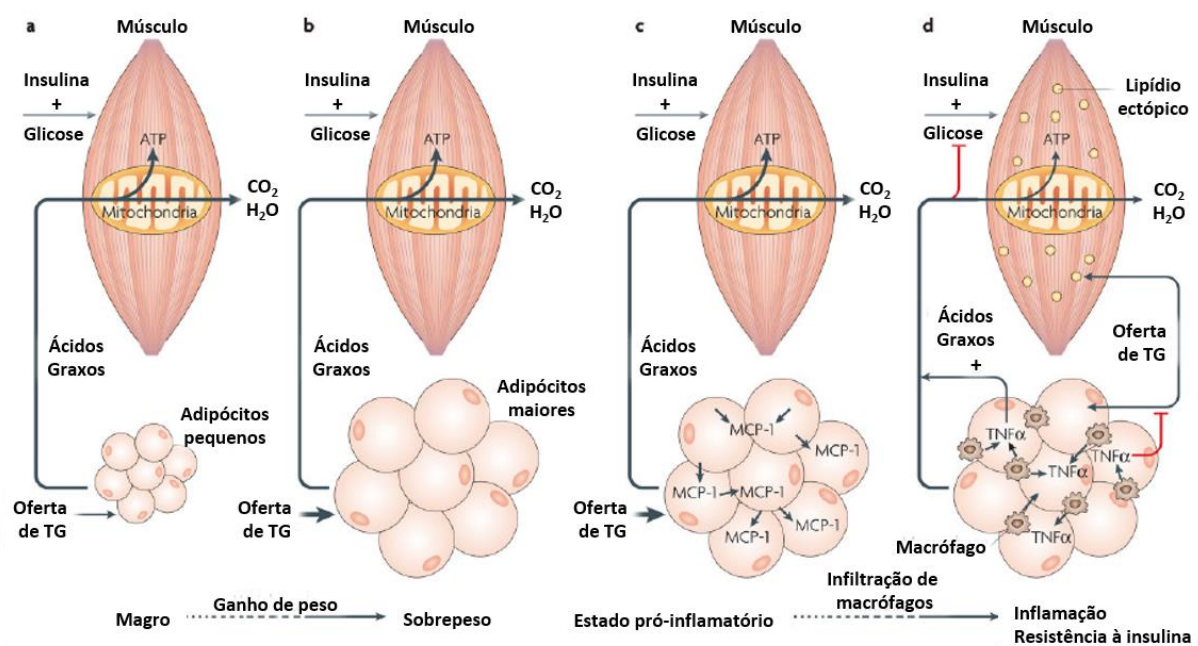
O tecido adiposo tem duas funções principais: a de secretar as quantidades apropriadas de adipocinas e a de reduzir a circulação de ácidos graxos livres, estocando-os na forma de triacilgliceróis em suas gotas lipídicas. O aumento do peso corporal acompanha uma série de mecanismos compensatórios para recuperar a homeostase energética do organismo (Amitani et al. 2013). Dentre estes mecanismos, estão o aumento da secreção de leptina pelo tecido adiposo e o aumento da secreção de insulina pelas células  $\beta$  do pâncreas, devido ao aumento de glicose sanguínea (Amitani et al. 2013). O aumento exacerbado da massa de tecido adiposo que ocorre na obesidade eleva drasticamente os níveis circulantes de leptina, o que contribui para o desenvolvimento de resistência central a este hormônio, mais especificamente no núcleo arqueado (ARC) do hipotálamo (Bjorbaek 2009; Gonçalves et al. 2014). Além disso, a resistência à insulina está quase sempre presente em indivíduos obesos, devido à hipossensibilidade dos tecidos e consequente exaustão e disfunção das células  $\beta$ . Com isso, a indução da captação e do metabolismo de glicose e a inibição da ingesta alimentar ficam prejudicados.

O consumo de dietas hipercalóricas leva a uma sobrecarga metabólica, com aumento na oferta de triglicerídeos e glicose. Inicialmente, o organismo compensa essa sobrecarga aumentando a produção de insulina pelo pâncreas, estocando lipídios no tecido adiposo e oxidando ácidos graxos no músculo (Hotamisligil 2006). Nesse estágio, onde a ingesta alimentar supera o gasto energético, o indivíduo começa a ganhar peso corporal, passando do

estado magro para o de sobrepeso. Uma vez mantida a sobrecarga metabólica, fatores como a lipotoxicidade dos ácidos graxos em excesso, a ativação de macrófagos residentes e a secreção de quimiocinas e citocinas, como MCP-1 e TNF- $\alpha$ , levam ao recrutamento de células do sistema imune para o tecido adiposo. A infiltração de macrófagos no tecido adiposo hipertrofiado é um aspecto importante no desenvolvimento da síndrome metabólica uma vez que potencializa a secreção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e TNF- $\alpha$  (Paniagua 2016; Hotamisligil 2006; Maury and Brichard 2010; Guilherme et al. 2008). TNF- $\alpha$  é um potente indutor de lipólise e inibidor da síntese lipídica, contribuindo desta forma para o aumento de ácidos graxos circulantes e causando o acúmulo de triglicerídeos e lipídios ativados ectopicamente em hepatócitos, células  $\beta$  e células musculares, o que induz estresse e disfunção nessas células (**Figura 1.2**) (Guilherme et al. 2008; Greenberg et al. 2011). Em conjunto, esses fatores constituem a síndrome metabólica associada à obesidade, com o desenvolvimento de resistência a hormônios como a leptina e insulina. Com isso, aumentam os riscos do aparecimento de comorbidades como diabetes tipo 2 e aterosclerose.

TNF- $\alpha$  inibe a expressão do receptor  $\gamma$  ativado por proliferadores de peroxissoma (PPAR $\gamma$ ) em vários estágios, incluindo a transcrição, estabilidade do RNAm e da proteína em si (Guilherme et al. 2008; Tang et al. 2006). Levando em conta a função essencial do PPAR $\gamma$  na indução do acúmulo lipídico (Lefterova et al. 2014; Christodoulides and Vidal-Puig 2010; Arimura et al. 2004), sua inibição acaba levando ao aumento de ácidos graxos livres circulantes, causando grande impacto na sensibilidade à insulina e processos inflamatórios. A ativação de quinases de Ser/Thr (resíduos que geralmente causam inibição da proteína quando fosforilados), já foi associada à ação dos ácidos graxos livres. A fosforilação inibitória das proteínas IRS (substratos do receptor de insulina) pode ser mediada por várias quinases, como JNK (quinase c-Jun N-terminal), IKK $\beta$  (inibidora da quinase do fator nuclear  $\kappa$ B), PKC $\theta$  (proteína quinase  $\theta$ ), mTOR (alvo da rapamicina em mamíferos), dentre outras, em resposta aos ácidos graxos, que também são capazes de sinalizar via TLR4 (receptor semelhante a *Toll* 4), iniciando respostas inflamatórias. Além disso, o PPAR $\gamma$  é indispensável para a polarização e ativação de macrófagos. Odegaard e colaboradores mostraram que a deleção de PPAR $\gamma$  em células mielóides reduziu a polarização dos macrófagos para o perfil M2 (antiinflamatório), pré-dispondo os camundongos à obesidade induzida por dieta e à resistência à insulina (Odegaard et al. 2007). Devido às ações benéficas de PPAR $\gamma$ , agonistas da classe das tiazolidinedionas (TZDs) vêm sendo utilizados no tratamento da diabetes tipo 2 (Boden et al. 2005). Portanto, a inibição de PPAR $\gamma$  por TNF- $\alpha$  contribui para a manutenção de um estado pró-inflamatório e metabolicamente alterado associado à obesidade.

A inibição da sinalização de insulina por TNF- $\alpha$  também acontece diretamente: semelhante aos ácidos graxos livres, TNF- $\alpha$  é capaz de reduzir a sinalização de insulina e o transporte de glicose. Estas ações são mediadas, pelo menos em parte, pela fosforilação inibitória de proteínas IRS e têm a participação das enzimas MAP4K4 (proteína quinase quinase quinase quinase 4 ativada por mitógenos), JNK1/2 e ERK1/2 (quinase regulada por sinais extracelulares), ativadas por TNF- $\alpha$  (Bouzakri and Zierath 2007; Tesz et al. 2007). O grupo de Michael Czech demonstrou inclusive que a ativação de MAP4K4 induzida por TNF- $\alpha$  age inibindo PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$  (proteína ligadora da região intensificadora CCAAT), C/EBP $\beta$  e GLUT4 (transportador de glicose) (Tang et al. 2006).



**Figura 1.2. Desenvolvimento da síndrome metabólica associada à obesidade.** No estado magro, a glicose e os lipídios provenientes da dieta são captados pelas células, metabolizados e estocados. Com o consumo de dietas hipercalóricas, o excesso de lipídios e glicose causa uma sobrecarga metabólica, induzindo a liberação de moléculas de quimioatração, como MCP-1, para macrófagos. Os macrófagos residentes ativados em conjunto com os macrófagos recrutados da circulação, contribuem de forma importante para a secreção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ . Desta forma, ocorre indução da lipólise e inibição da síntese lipídica, o que reduz a  $\beta$ -oxidação e aumenta a liberação de ácidos graxos e lipídios ativados para a circulação. Consequentemente, os ácidos graxos livres e triglicerídeos acumulam-se ectopicamente em outros órgãos e tecidos, como o músculo esquelético e pâncreas, levando à disfunção das células musculares e células  $\beta$ . Além disso, TNF- $\alpha$  e ácidos graxos livres são capazes de reduzir a sensibilidade à insulina diretamente, ativando quinases como JNK1/2 e MAP4K4, que fosforilam o substrato do receptor de insulina (IRS) e o transportador de glicose GLUT4. Figura adaptada de Guilherme e cols, 2008.

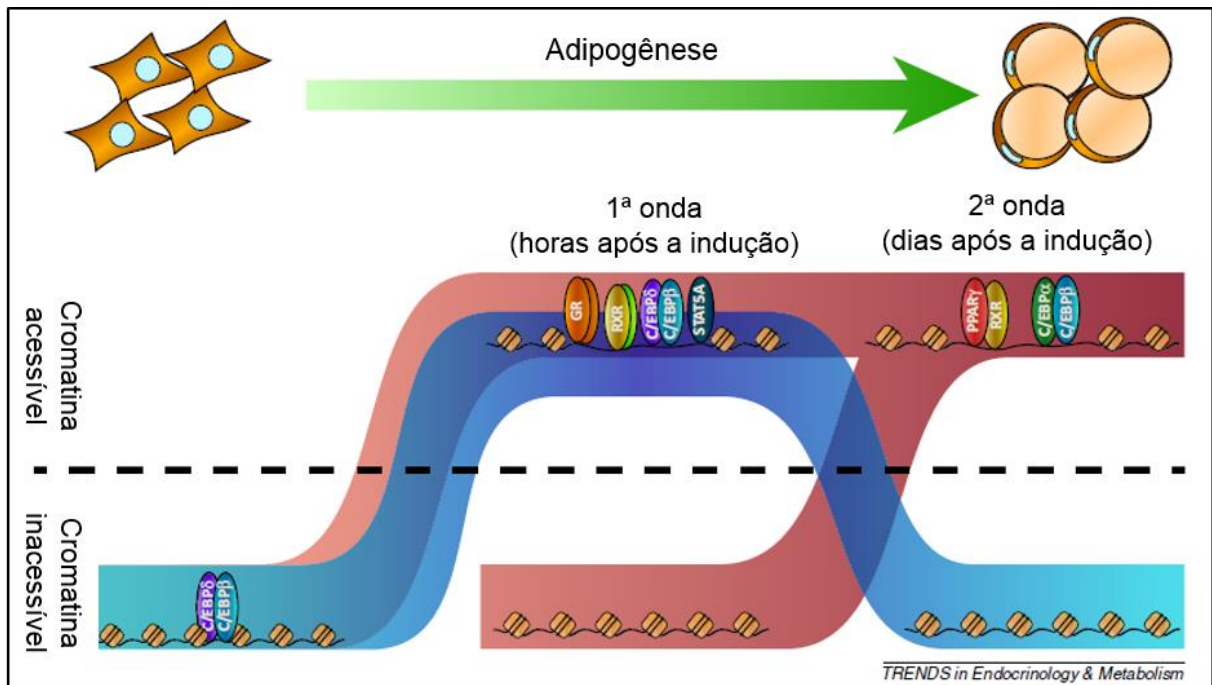
Em resumo, a obesidade é acompanhada por profundas modificações metabólicas decorrentes da hipertrofia do tecido adiposo e excesso de calorias na dieta. O desenvolvimento de resistência central a hormônios como leptina e insulina e a perda de sensibilidade periférica à insulina, em conjunto com o estado inflamatório, caracterizam a obesidade como uma doença metabólica e inflamatória crônica. A redução de peso não é algo simples para indivíduos obesos: é uma questão de alterações metabólicas e perda da resposta a alguns hormônios, influenciada muitas vezes por fatores genéticos. O entendimento do metabolismo do tecido adiposo é importante para o desenvolvimento de futuros tratamentos contra a doença e melhoria da qualidade de vida dos pacientes.

### **1.3. Adipogênese**

Os adipócitos constituem o tipo celular predominante no tecido adiposo. Têm uma morfologia característica, com grandes gotas lipídicas que ocupam quase a totalidade de seu citoplasma. A geração de adipócitos, conhecida como adipogênese, é um processo altamente regulado que envolve mudanças drásticas na morfologia e nas propriedades das células e consiste na diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos. Este processo difere da lipogênese por não ser um sinônimo de síntese lipídica: a adipogênese ocorre quando a lipogênese supera a lipólise, resultando no aumento do acúmulo lipídico. Para que a adipogênese ocorra, é necessário o estímulo de fatores associados à regulação do metabolismo lipídico e vias de anabolismo, ao passo que genes como PREF-1 (fator de pré-adipócitos 1), característicos de células não-diferenciadas, devem ser inativados.

A família de fatores de transcrição C/EBP, foi a primeira a ser descrita como crítica para a diferenciação de adipócitos *in vitro* (White and Stephens 2010). Em 1997, Tanaka e colaboradores geraram camundongos deficientes para as proteínas C/EBP $\beta$  e C/EBP $\delta$  e mostraram que 85% dos animais morriam no estágio neonatal. Além disso, demonstraram que os camundongos selvagens possuíam gotas lipídicas no tecido adiposo marrom na região interescapular 20 h após o nascimento, o que não era observado nos camundongos deficientes (Tanaka et al. 1997). De fato, estes fatores têm a capacidade de se ligar a elementos responsivos no DNA mesmo com a cromatina ainda condensada e pouco acessível, constituindo então o primeiro aspecto da indução da adipogênese (Lefterova et al. 2014). Isto corrobora com os resultados obtidos por Tanaka e colaboradores, uma vez que sem estes dois fatores de transcrição iniciais, a adipogênese não tem início (Tanaka et al. 1997). A ligação de C/EBP $\beta$  e C/EBP $\delta$  induz sua própria expressão e a de outros fatores importantes como RXR (receptor de retinóide  $\alpha$ ) e STAT5A (proteína transdutora de sinal e ativadora da transcrição) que então

ligam-se à cromatina em um estado menos condensado, constituindo a primeira onda da adipogênese que ocorre horas após a sua indução. Os fatores da primeira onda estimulam a expressão das proteínas da segunda onda adipogênica, que ocorre por dias após a indução. Dentre essas proteínas estão o PPAR $\gamma$ , que se heterodimeriza com RXR já ligado aos seus elementos responsivos, C/EBP $\alpha$  e C/EBP $\beta$  (**Figura 1.3**). PPAR $\gamma$  e C/EBP $\alpha$  mutuamente induzem a expressão uma da outra e possuem sítios de ligação muitas vezes sobrepostos (Tontonoz and Spiegelman 2008).



**Figura 1.3. Mecanismos moleculares da adipogênese.** Na fase de pré-adipócitos, as proteínas C/EBP ligam-se a regiões responsivas mesmo com a cromatina inacessível e induzem a expressão de fatores que darão prosseguimento ao processo de diferenciação, como as próprias C/EBP, GR, RXR e STAT5A. A ligação dessas proteínas a elementos responsivos no DNA ocorre h após a indução da adipogênese, fase em que a cromatina está mais acessível. Esse processo caracteriza a primeira onda da adipogênese. As proteínas da primeira onda induzem então a expressão das proteínas da segunda onda que ocorre dias após a indução da diferenciação. Estas proteínas então (PPAR, seu coativador RXR, e C/EBP) se ligam a regiões acessíveis de cromatina e resultam no amadurecimento dos adipócitos e manutenção de seu metabolismo. Figura adaptada de Lefterova e cols, 2014.

Os sítios de ligação a PPAR $\gamma$  durante a indução da adipogênese são bastante similares na maioria dos depósitos de tecido adiposo. Porém, foi demonstrado que existem algumas regiões específicas às quais o PPAR $\gamma$  se liga que parecem estar relacionadas ao fenótipo e à localização dos adipócitos (tecido adiposo branco ou marrom, epididimal ou subcutâneo, por exemplo).

Curiosamente, a ligação de PPAR $\gamma$  a sítios característicos de cada tipo de adipócito parece estar associada à expressão de genes específicos que também contribuem para a caracterização da célula (Siersbaek et al. 2012). Portanto, PPAR $\gamma$  parece participar tanto da diferenciação adipocítica em geral quanto da caracterização dos diferentes adipócitos.

Uma das proteínas classicamente conhecidas por sua função de ativação da síntese lipídica é a SREBP-1c (proteína ligadora do elemento regulatório de esterol), isoforma presente principalmente no fígado e tecido adiposo. A SREBP-1c é regulado em resposta à insulina (Eberlé et al. 2004) e é responsável pela ativação de proteínas associadas à lipogênese e à adipogênese, como ligantes de PPAR $\gamma$  (White and Stephens 2010).

Sabe-se que a citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  é um potente indutor da lipólise e inibidor de PPAR $\gamma$  (Guilherme et al. 2008). Em 1999, foi demonstrado por Stewart e colaboradores que o estímulo com TNF- $\alpha$  durante a indução da adipogênese *in vitro* levava a uma drástica redução na diferenciação e acúmulo lipídico nas células, assim como na expressão de PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$ , STAT1 e STAT5A e B. Enquanto isso, o tratamento com um agonista de PPAR $\gamma$  foi capaz de recuperar todos esses parâmetros, induzindo a adipogênese. Quando o agonista de PPAR $\gamma$  era administrado junto ao TNF- $\alpha$  no coquetel de diferenciação dos pré-adipócitos, a redução do processo adipogênico causada pelo tratamento com TNF- $\alpha$  sozinho não era observada (Stewart et al. 1999), corroborando com o papel essencial de PPAR $\gamma$  na progressão da adipogênese.

Outra via que regula a expressão de PPAR $\gamma$  e, conseqüentemente, a adipogênese, é a via de produção de eicosanóides. Por ação da enzima fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), o ácido araquidônico é liberado por hidrólise de fosfolipídios de membrana. O ácido araquidônico é então convertido a leucotrienos pelas lipooxigenases ou à prostaglandina (PG) H<sub>2</sub> pelas PGH<sub>2</sub> sintases ciclooxigenases-1 e -2 (COX-1 e -2). A PGH<sub>2</sub> sofre ação de outras sintases, dando origem a prostaglandinas como PGD<sub>2</sub> e PGE<sub>2</sub>. É sabido que os produtos de COX têm grande influência na adipogênese, geralmente por modularem a expressão de PPAR $\gamma$  (Fujimori 2012). Foi demonstrado que PGE<sub>2</sub> e PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  têm papéis anti-adipogênicos (Hu et al. 2016), enquanto PGD<sub>2</sub> e PGI<sub>2</sub> (também conhecida como prostaciclina) estimulam a adipogênese e a sensibilidade à insulina (Fujitani et al. 2010; Khan et al. 2016).

Embora a regulação da lipogênese (síntese lipídica) já tenha sido descrita como dependente de hormônios como a insulina (Eberlé et al. 2004), a regulação hormonal da adipogênese não foi suficientemente explorada até o presente momento, sendo um dos alvos deste trabalho. A adipogênese está diretamente relacionada ao aumento e à biogênese de gotas lipídicas, de forma que o estudo destas organelas se faz necessário para o entendimento da regulação deste processo. Além de sítios de armazenamento lipídico, as gotas lipídicas são consideradas hoje organelas celulares formadas por uma única camada lipídica, envolvidas em processos como

sinalização de insulina, síntese de eicosanóides, resposta à infecções e ativação celular (Mattos et al. 2010; Silva et al. 2009; Feingold et al. 2010; Toledo et al. 2016; Araújo-Santos et al. 2010; Accioly et al. 2008; Greenberg et al. 2011). Dentre as proteínas envolvidas na formação de gotas lipídicas e na regulação da sinalização e fluxo de ácidos graxos, estão as caveolinas e as proteínas da família das Perilipinas (PLIN).

### 1.3.1. Caveolinas

As cavéolas são microdomínios de membrana resistentes a detergentes (*lipid rafts*) ricos em colesterol e esfingolipídios. Estas invaginações membranares são abundantemente encontradas em adipócitos (Pilch and Liu 2011), e são capazes de potencializar vias de sinalização, participar de processos de endocitose e fluxo de ácidos graxos (Cohen et al. 2003; Codenotti et al. 2016; Yamamoto et al. 1998; Jasmin et al. 2006; Pilch and Liu 2011). A caveolina (CAV), uma das principais proteínas que constituem as cavéolas, tem a capacidade de se ligar a ácidos graxos, participando ativamente do fluxo transmembranar e armazenamento de ácidos graxos nas gotas lipídicas (Pilch and Liu 2011; Greenberg et al. 2011). Pol e colaboradores mostraram que ao aumentar o conteúdo lipídico no meio de cultura das células havia uma redistribuição de caveolinas, que migravam da membrana celular para a membrana das gotas lipídicas. Ao reduzir o conteúdo lipídico, os autores mostraram que este efeito era revertido (Pol et al. 2004). Desta forma, foi demonstrado que as caveolinas participam ativamente da regulação do fluxo de ácidos graxos nas gotas lipídicas.

Em relação à regulação do metabolismo, sabe-se que as caveolinas são capazes de interagir com o receptor de insulina, potencializando sua sinalização (Yamamoto et al. 1998), o que justifica o fato de que camundongos deficientes para esta proteína serem resistentes à insulina (Cohen et al. 2003). Isto demonstra que cavolinas são importantes mediadores metabólicos e podem ser proteínas chave no estudo da obesidade e diabetes tipo 2.

Cavolina-1 (CAV-1), a isoforma expressa mais abundantemente em células não musculares, como tecido adiposo e células endoteliais e epiteliais, também parece ter papéis importantes na inflamação. Sabe-se que a via do ácido araquidônico é responsável pela produção de eicosanóides, mediadores lipídicos essenciais para a resposta inflamatória. Chen e colaboradores demonstraram recentemente que a CAV-1 é capaz de se ligar à porção C terminal da COX-2 e induzir a degradação da enzima via proteassoma (Chen et al. 2010), indicando um mecanismo pelo qual a expressão de COX-2 é regulada e mantida em níveis homeostáticos.

De forma interessante, foi proposto que a cavolina-1 pode participar também da regulação negativa da atividade das Janus quinase (JAK), função atualmente atribuída às proteínas da família SOCS (supressores da sinalização de citocinas) (Jasmin et al. 2006). As



proteínas SOCS são importantes reguladores das vias de sinalização de várias citocinas e adipocinas, como a da leptina. A via JAK2/STAT3 ativada por leptina induz a expressão do gene de SOCS3, regulando-a negativamente através da inibição de JAK2 (Kwon, Kim, and Kim 2016). Já foi mostrado que a expressão de SOCS3 está aumentada no hipotálamo de indivíduos obesos, podendo contribuir diretamente para a resistência à sinalização de leptina (Jasmin et al. 2006). Além de similaridades na sequência genética entre caveolinas e proteínas da família SOCS, Park e colaboradores mostraram que camundongos deficientes para CAV-1 mantinham a ativação da via JAK2/STAT5a em glândulas mamárias (Park et al. 2002). Também utilizando a deleção de CAV-1 em camundongos, Razani e colaboradores mostraram que na ausência de CAV-1 há uma maior expressão de eNOS (óxido nítrico sintase endotelial), enzima presente em células endoteliais que produz óxido nítrico, um importante mediador pró-inflamatório e vasorrelaxante. Além disso, os autores mostraram ainda outra característica em comum entre os camundongos deficientes para CAV-1 e SOCS: as células detêm uma maior capacidade proliferativa (Razani, Engelman, et al. 2001). De fato, vários trabalhos já demonstraram a função de supressão tumoral das proteínas SOCS em vários tipos de câncer (Niwa et al. 2005; Sutherland et al. 2004; Weber et al. 2005). De forma interessante, a associação de CAV-1 a essa função vem sendo bastante explorada (Jasmin et al. 2006; Razani, Schlegel, et al. 2001), corroborando com a hipótese de que CAV-1 se comporta como uma proteína da família SOCS.

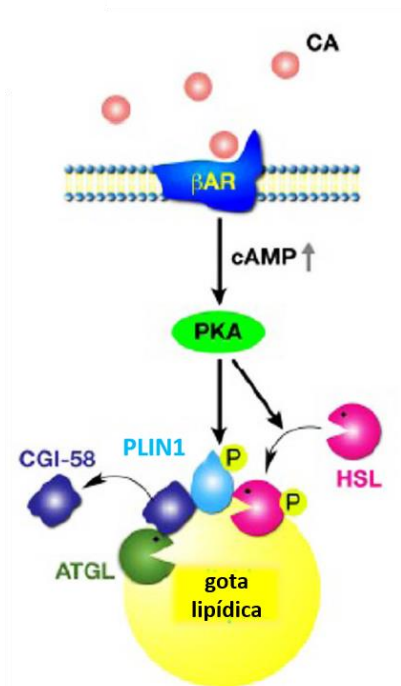
Logo, a caveolina-1 parece participar de processos essenciais para a adipogênese, tanto em relação ao acúmulo lipídico, quanto à resposta inflamatória e proliferação celular, sendo um importante alvo para o estudo molecular da obesidade.

### **1.3.2. Perilipinas**

Na década de 90, o grupo de Londos descreveu pela primeira vez a perilipina e sua regulação mediada por hormônios. Sua denominação foi dada na época pela observação de que esta proteína estava na periferia de gotas lipídicas. Hoje a perilipina é chamada de PLIN1 (perilipina 1) e faz parte de uma família de proteínas associadas a gotas lipídicas, a família das Perilipinas (Kimmel et al. 2010). Os autores mostraram que a perilipina era fosforilada pela proteína quinase A (PKA) mediante estímulos  $\beta$ -adrenérgicos e que a insulina reduzia essa fosforilação através da ativação de uma fosfatase (Egans et al. 1990). Além disso, os autores demonstraram pela primeira vez por imunomarcação que a perilipina (PLIN1) estava associada a gotas lipídicas de adipócitos (Greenberg et al. 1991). Quanto à sua regulação, foi observado que a fosforilação de PLIN1 pela PKA acontecia paralelamente à fosforilação de HSL (lipase sensível a hormônios), o que sugeria que a PLIN1 estava envolvida no processo de regulação da lipólise (Greenberg et al. 1991). A partir da descoberta de Londos, outras quatro proteínas

associadas a gotas lipídicas foram descritas: ADRP (proteína relacionada ao tecido adiposo/PLIN2) e TIP47 (do inglês *tail interacting protein*/PLIN3), S3-12 (PLIN4) e OXPAT (PLIN5) (Bickel, Tansey, and Welte 2009). Estas proteínas foram inicialmente agrupadas na família PAT (quando só tinham sido identificadas as proteínas Perilipina/ADRP/TIP47) (Bickel, Tansey, and Welte 2009) e recentemente foram agrupadas na família das Perilipinas (PLINs), como uma forma de unificar a nomenclatura (Kimmel et al. 2010). As proteínas desta família diferem em vários aspectos, dentre eles o tamanho, a estabilidade quando não estão ligadas às gotas, sua regulação transcricional e localização tecidual. Quanto à localização das PLINs, sabe-se que somente PLIN2 e 3 são ubiquitadamente expressas, enquanto PLIN1 é expressa principalmente em adipócitos do tecido adiposo branco e marrom, PLIN4, no tecido adiposo branco e PLIN5, no coração e em alguns músculos de contração lenta (Brasaemle 2007). Apesar disso, as PLINs compartilham semelhanças em sua sequência genética e a habilidade de participar da regulação do fluxo de lipídios nas gotas (Bickel, Tansey and Welte 2009). Trabalhos recentes utilizando análise proteômica de gotas isoladas identificaram uma série de outras proteínas presentes nas gotas lipídicas, incluindo as que migram do citosol para as gotas sob estímulo de GTP, reforçando o papel destas organelas na regulação metabólica (Bartz et al. 2007).

Durante o jejum prolongado, os níveis de insulina circulante encontram-se baixos e os níveis de AMP cíclico intracelular altos, o que induz ativação da enzima PKA. Esta ativação também pode decorrer de estímulos  $\beta$ -adrenérgicos que, através de receptores acoplados à proteína G, ativam a enzima adenilato ciclase aumentando os níveis de AMP cíclico. Uma vez ativada, a PKA regula uma série de proteínas cujas fosforilações convergem para a ativação de processos catabólicos e inibição de processos anabólicos, de forma a reestabelecer os níveis de ATP da célula. Duas das proteínas reguladas por PKA são HSL e PLIN1. Quando fosforilada, a HSL é translocada do citoplasma para a periferia das gotas lipídicas, acoplando-se à PLIN1. As modificações conformacionais causadas pela fosforilação de PLIN1 favorecem o acesso da HSL ao conteúdo lipídico das gotas. O diacilglicerol proveniente da hidrólise de triacilglicerol pela lipase de triglicerídeos do tecido adiposo (ATGL), também associada às gotas, é então convertido a monoacilglicerol pela HSL (**Figura 1.4**) e ainda hidrolizado a glicerol e ácido graxo pela lipase de monoacilglicerol (MGL). Os produtos da MGL são então exportados dos adipócitos para a circulação (Brasaemle 2007; Bickel, Tansey, and Welte 2009; Greenberg et al. 1991). Devido à sua função regulatória, a PLIN1 muitas vezes é chamada de *gatekeeper* ou “porteira”. Nos períodos pós-prandiais, quando os níveis de glicose estão altos, a secreção de insulina é aumentada, o que inibe a lipólise e induz lipogênese. Neste caso, a ativação da PKA é inibida e a PLIN1 desfosforilada não “permite” o acesso de HSL às gotas lipídicas.



**Figura 1.4. Regulação da lipólise por PLIN1.** A ativação por catecolaminas (CA) de seus receptores  $\beta$ -adrenérgicos associados à proteína G levam à ativação da enzima adenilato ciclase que, por sua vez, aumenta os níveis de AMP cíclico intracelulares. O aumento de AMPc leva à ativação da proteína quinase A (PKA), que então fosforila uma série de proteínas, regulando-as positiva e negativamente. Dentre os alvos de PKA estão a HSL (lipase sensível a hormônios) e a PLIN1, proteína associada a gotas lipídicas de adipócitos. A fosforilação de HSL causa a sua translocação do citoplasma para a periferia das gotas lipídicas, onde liga-se à PLIN1 fosforilada. A PLIN1, uma vez fosforilada, muda sua conformação, permitindo o acesso de HSL ao conteúdo lipídico das gotas. HSL então hidrolisa o diacilglicerol produzido por ATGL (lipase de triglicerídios do tecido adiposo) e seu co-fator CGI-58. (Brasaemle 2007; Bickel, Tansey, and Welte 2009; Greenberg et al. 1991). Figura adaptada de Bickel e cols, 2009.

A ADRP ou adipofilina, mais recentemente chamada de perilipina 2 (PLIN2), é uma proteína associada a gotas lipídicas. Brasaemle e colaboradores mostraram que a PLIN2 é a principal proteína em gotas lipídicas pequenas, ou seja, presente na maioria das células, em pré-adipócitos e adipócitos pouco maduros. À medida que os adipócitos amadurecem e suas gotas lipídicas aumentam de tamanho, há uma substituição de PLIN2 por PLIN1, que passa então a ser a proteína mais abundante na superfície das gotas hipertrofiadas (Brasaemle et al. 1997). PLIN2 foi inicialmente descrita como uma proteína estrutural de gotas lipídicas. Contudo, já foi mostrado que PLIN2 pode se associar à ATGL e/ou CGI-58 (um cofator da ATGL), sugerindo uma influência de PLIN2 na regulação da lipólise (Yamaguchi et al. 2006).

Corroborando para sua função regulatória, o grupo de Andrew Greenberg demonstrou que camundongos deficientes em PLIN2 tinham níveis reduzidos de ácidos graxos circulantes, eram resistentes à obesidade induzida por dieta e à deposição de gordura no fígado, além de apresentarem redução na resposta inflamatória associada ao tecido adiposo (McManaman et al. 2013).

A TIP47 (do inglês *tail interacting protein*) ou PLIN3, foi inicialmente descrita por interagir com a “cauda” citoplasmática dos receptores de manose 6-fosfato e mediar seu transporte para o complexo de Golgi. A PLIN3 tem sua sequência amino-terminal similar às de PLIN1 e 2 e é translocada do citoplasma para as gotas lipídicas em resposta ao aumento do conteúdo lipídico extracelular. Também associada ao metabolismo lipídico, a S3-12 ou PLIN4 é abundantemente expressa em tecidos relacionados ao estoque lipídico, principalmente no tecido adiposo branco (Dalen et al. 2004; Bickel, Tansey and Welte 2009). Já a OXPAT ou PLIN5, é expressa principalmente em tecidos associados à oxidação de ácidos graxos, como no tecido adiposo marrom, músculo esquelético, fígado e coração. Além disso, correlaciona-se negativamente com o IMC em pacientes não-diabéticos e é regulada por PPAR $\gamma$  (Wolins et al. 2006), assim como as outras perilipinas (Arimura et al. 2004; Dalen et al. 2004).

Devido à importância das perilipinas para o metabolismo lipídico, elas são diferencialmente reguladas durante as fases da diferenciação adipocítica, aumentando ou diminuindo ao longo do amadurecimento das gotas lipídicas nos adipócitos.

A regulação dos eventos moleculares descritos acima é feita, em grande parte, por efeitos centrais modificando o tônus adrenérgico. No entanto, vários hormônios atuam diretamente no tecido adiposo modulando a adipogênese, como leptina, insulina e adiponectina. Pouco é sabido em relação às ações locais da leptina no tecido adiposo.

#### **1.4. Leptina e balanço energético**

A primeira evidência de que o peso corporal era controlado centralmente foi proposta na década de 1940 por Hetherington e Ranson. Eles mostraram que a indução de lesões hipotalâmicas tornavam os camundongos obesos (Hetherington and Ranson 1940). 13 anos depois, Gordon Kennedy, além de confirmar os resultados de Hetherington e Ranson, propôs que esse controle era mediado por fatores solúveis no sangue provenientes do tecido adiposo (Kennedy 1953), introduzindo a ideia de que a massa adiposa era regulada endocrinamente. Ainda na década de 1950, George Snell e colaboradores identificaram e caracterizaram uma mutação que gerou camundongos geneticamente obesos (ob/ob) (Ingalls, Dickie, and Snell 1950). Uma mutação em outro gene (db/db) que também gerava camundongos obesos, além de diabéticos e com baixa expectativa de vida, foi descrita em 1966 pelo grupo de Doug Coleman

(Hummel, Dickie, and Coleman 1966). Em 1978, através de experimentos de parabiose entre camundongos ob/ob e db/db, os autores confirmaram a existência de um fator solúvel no sangue responsável pelo controle do peso corporal. Através desses experimentos, eles concluíram que os camundongos ob/ob eram deficientes para esse fator enquanto os db/db não possuíam seu receptor (Coleman 1978). Finalmente, na década de 1990, Jeffrey Friedman e colaboradores clonaram o “gene *ob*” e mostraram que camundongos tratados com a “proteína OB” (produto do gene *ob*) apresentavam normalização do peso corporal e correção da diabetes com redução de tecido adiposo (Zhang et al. 1994). Essa proteína foi chamada pelo próprio Friedman de leptina, do latim *leptos* (magro) e até hoje é reconhecida como uma das principais adipocinas. Desde então o tecido adiposo deixou de ser tratado apenas como estoque energético e passou a ser reconhecido também por sua função endócrina. Os fatores produzidos principalmente pelo tecido adiposo são chamados atualmente de adipocinas, e exercem seus efeitos à curta e à longa distância.

As ações da leptina são mediadas principalmente por seu receptor de cadeia longa LepRb, única isoforma que contém o domínio intracelular completo. Todas as isoformas do receptor compartilham o mesmo domínio extracelular, ou seja, a leptina é capaz de se ligar a todas elas. Contudo, as isoformas curtas e a isoforma solúvel não possuem os domínios necessários para ativar toda a cascata de sinalização, embora possam gerar fosforilação de JAK2 e IRS-1 (Bjørnbæk et al. 1997). Sob a ligação de leptina, seu receptor dimeriza-se e, devido à sua atividade tirosina quinase, autofosforila-se, recrutando proteínas JAK2. Estas se ligam ao receptor, transfosforilam-se e fosforilam o receptor em outro sítio. Proteínas STAT3 são então recrutadas para este segundo sítio do receptor e fosforiladas por JAK2. Uma vez fosforiladas, as proteínas STAT3 desligam-se do receptor e se homodimerizam, translocando-se para o núcleo onde vão contribuir para a transcrição dos genes de resposta à leptina.

A sinalização de leptina ocorre principalmente no núcleo ARC do hipotálamo, onde regula positivamente neurônios anorexigênicos e negativamente neurônios orexigênicos, de forma a induzir a saciedade e a diminuição da ingesta alimentar (Amitani et al. 2013). Essa regulação ocorre através da ativação dos neuropeptídeos POMC (proopiomelanocortina) e CART (transcrito responsivo à cocaína e anfetamina) e da inibição de NPY (neuropeptídeo Y) e AgRP (proteína relacionada a agouti) (Amitani et al. 2013). Quando ativados, neurônios POMC sintetizam e secretam o peptídeo  $\alpha$ -MSH (hormônio estimulante de melanocortina), que age inibindo a ingesta alimentar através da ativação dos receptores de melanocortina (MCRs) (Varela and Horvath 2012). O neuropeptídeo AgRP estimula o apetite através da inibição do efeito do  $\alpha$ -MSH (Varela and Horvath 2012). Portanto, neurônios que expressam POMC, MCRs e AgRP formam o sistema central de melanocortina, um importante centro regulatório

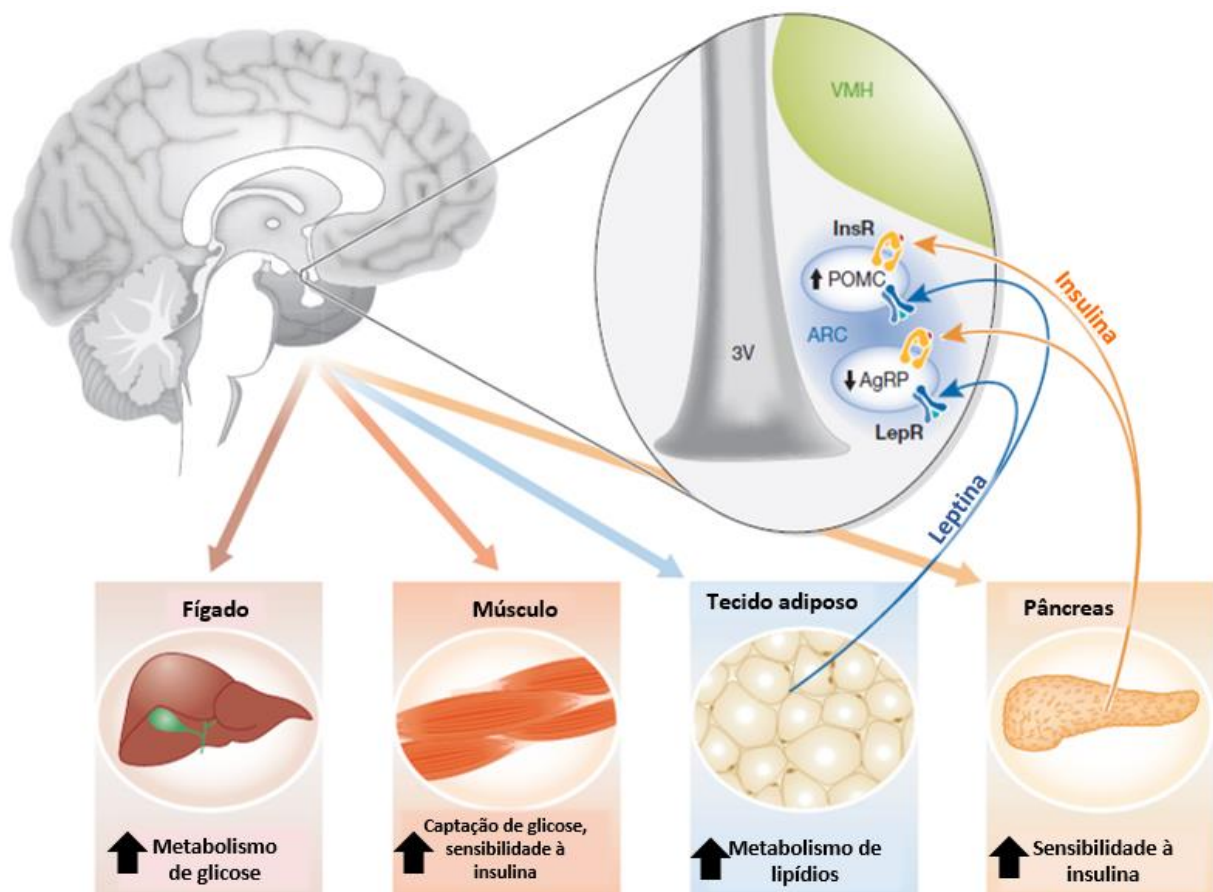
do peso corporal e balanço energético do organismo (Amitani et al. 2013; Gamber et al. 2012; Varela and Horvath 2012) diretamente influenciado por leptina e insulina. De fato, foi demonstrado que a superexpressão do receptor de leptina (LepRb) especificamente em neurônios POMC é suficiente para acelerar o desenvolvimento da doença em camundongos sob dieta hipercalórica e induzir a resistência central à esta adipocina (Gamber et al. 2012). Recentemente, Denroche e colaboradores demonstraram que a inativação do LepRb fora do núcleo ARC, mais precisamente na área lateral hipotalâmica (LHA) e no núcleo pré-mamilar (PMV), protegeu contra o ganho de peso induzido por dieta. De forma interessante, a inibição de LepRb nestas regiões não alterou significativamente o peso corporal, gasto energético ou metabolismo de glicose, mas induziu hiperleptinemia e hiperinsulinemia, além de um aumento na secreção de glucagon (Denroche et al. 2016). Desta forma, a sinalização de leptina nas regiões LHA e PMV também são importantes na regulação dos níveis de insulina e glucagon e contribuem para as alterações observadas na obesidade e na diabetes tipo 2.

Durante a obesidade, a produção e a secreção de adipocinas são alteradas, e o indivíduo acaba desenvolvendo resistência à sinalização central de leptina. A resistência à leptina consiste na redução de seus efeitos centrais, principalmente em neurônios POMC e AgRP do núcleo ARC. Isto pode ser, em parte, devido ao aumento na expressão de proteínas como SOCS3 e PTP-1B (proteína-tirosina-fosfatase 1B), que agem diretamente inibindo a atividade quinase de JAK2 (Bjorbaek 2009). Foi demonstrado que uma deficiência no gene *Socs3* leva ao aumento da sensibilidade à leptina e atenuação da obesidade induzida por dieta hipercalórica (Howard et al. 2004) e que os níveis de SOCS3 estão elevados durante a obesidade (Enriori et al. 2007), especialmente no núcleo ARC do hipotálamo (Münzberg, Flier and Bjørbaek 2004). A contribuição da expressão e atividade do receptor de leptina para as alterações metabólicas relacionadas à obesidade e à diabetes é bastante controversa. Neste contexto, alguns grupos defendem que há uma diminuição da expressão de LepRb e outros, que ela não é modificada, não sendo importante para a resistência à leptina (Enriori et al. 2007).

Outras adipocinas estão também envolvidas na patofisiologia da obesidade, e são importantes para o controle do peso corporal e manutenção da homeostase. Dentre elas, a adiponectina possui efeitos periféricos que convergem para uma ação de sensibilização à insulina, como redução da gliconeogênese hepática (Nawrocki et al. 2006) e aumento da captação de glicose e  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos em células musculares (Tomas et al. 2002). Além disso, injeções intracerebroventriculares (ICV) desta adipocina resultam na redução da ingestão alimentar e ativação de proteínas também ativadas por insulina e leptina, como JAK2 e AKT (ou proteína quinase B – PKB) (Coope et al. 2008), além de reverter a resistência à insulina e inflamação hipotalâmica em camundongos obesos (Koch et al. 2014). A adiponectina

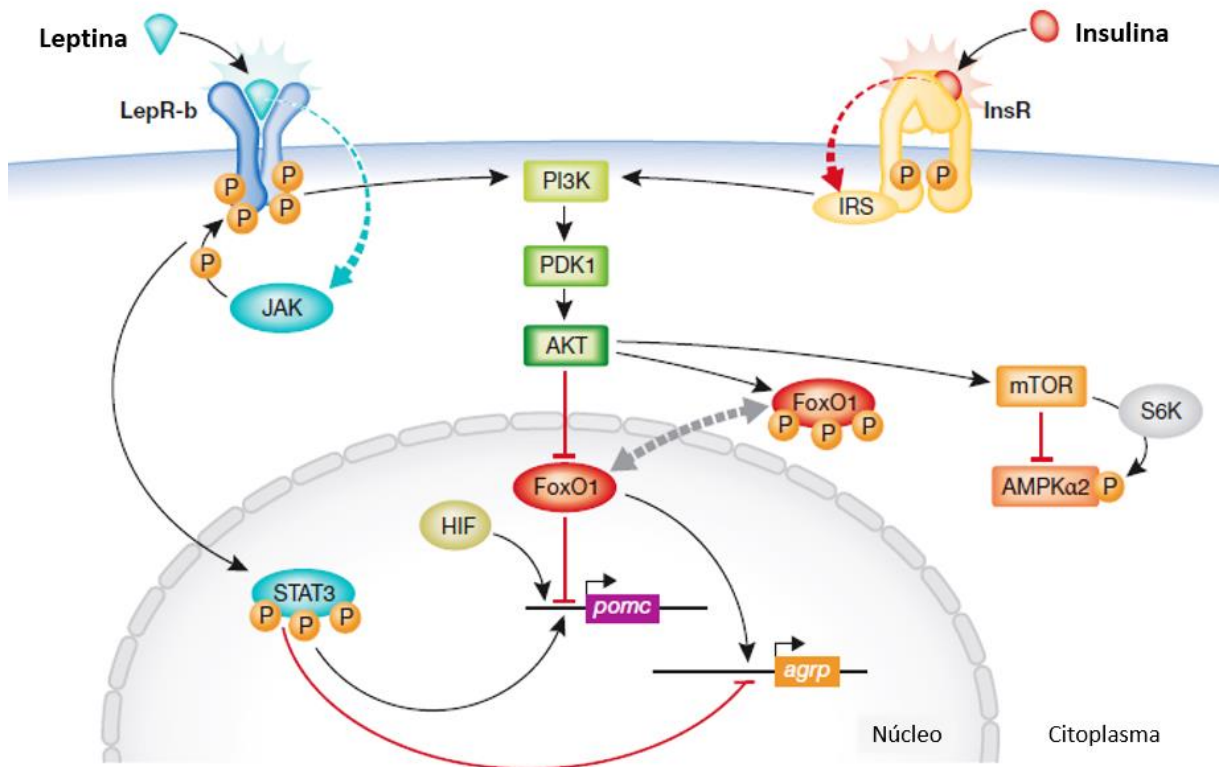
tem seus níveis circulantes reduzidos durante a obesidade (Maury and Brichard 2010), contribuindo para a resistência à insulina e desbalanço energético associados à doença.

Em conjunto com a leptina, a insulina – hormônio produzido pelas células  $\beta$  do pâncreas – tem um papel muito importante no controle do balanço energético. Ambos agem no mesmo grupo de neurônios, inibindo a ingesta alimentar e estimulando o metabolismo e a captação de glicose (**Figura 1.5**). Além de insulina aumentar a fosforilação e ativação de JAK2 (Gual et al. 1998), outra via também é compartilhada por leptina e insulina: uma vez ligada ao receptor, a insulina ativa o IRS, e PI3K (fosfatidilinositol-3 quinase). A PI3K é o ponto de convergência entre os dois hormônios, a partir do qual a sinalização prossegue para a ativação da PKB ou AKT. A AKT tem vários alvos, incluindo mTOR, AMPK (quinase sensível a AMP) e FoxO1 (do inglês *forkhead box O1*). No núcleo ARC do hipotálamo, FoxO1 age como um inibidor dos efeitos de leptina, uma vez que se liga aos promotores dos genes *Pomc* e *Agrp* impedindo a ligação do dímero de STAT3 a estes promotores. A ativação de AKT por leptina e insulina leva à fosforilação de FoxO1 por esta enzima, deslocando-a do núcleo para o citoplasma e deixando os promotores livres para a ligação de STAT3, que vai então ativar *Pomc* e inibir *Agrp* (**Figura 1.6**). A proteína mTOR é uma importante para a sensibilidade a nutrientes, sendo ativada quando o balanço energético está positivo (Haissaguerre, Saucisse, and Cota 2014; Lopez et al. 2013) e envolvida com a indução da adipogênese (Shan et al. 2016; Wu et al. 2016; Bell, Grunder and Sorisky 2000). Já foi demonstrado também que a ativação de mTOR por leptina está envolvida na proliferação e migração celular, sendo fortemente associada à progressão de tumores (Lopez et al. 2013; L. Wang et al. 2015). Uma vez ativada por AKT, mTOR fosforila S6K (quinase da proteína ribossomal p70 S6) que, além de induzir proliferação e síntese proteica, fosforila AMPK, inativando-a (**Figura 1.6**) (Varela and Horvath 2012). A AMPK é uma enzima ativada por baixa disponibilidade de nutrientes, quando os níveis de AMP são maiores que os de ATP. Ela então ativa vias de produção energética, inibindo processos de anabolismo. Devido à sua função anti-proliferativa, ativadores de AMPK estão sendo estudados como potenciais alvos terapêuticos em vários tipos de câncer (El-Masry et al. 2015). Recentemente foi mostrado em diferentes linhagens de células de câncer de mama, que a leptina inibe AMPK mesmo na presença de seu ativador AICAR. Desta forma, a leptina atenua os efeitos de AMPK, contribuindo para a proliferação das células (El-Masry et al. 2015).



**Figura 1.5. Ações de leptina e insulina no balanço energético.** A leptina, produzida por adipócitos maduros, e a insulina, pelas células  $\beta$  do pâncreas, têm efeitos convergentes em relação ao controle do balanço energético do organismo. Ambos os hormônios agem estimulando a saciedade e inibindo a ingesta alimentar enquanto estimulam a captação e o metabolismo de glicose. Estas ações são mediadas principalmente por sinalização no núcleo arqueado (ARC) do hipotálamo, onde os dois hormônios ativam neurônios POMC (anorexigênicos) e inibem neurônios AgRP (orexigênicos). Figura adaptada de Varela & Horvath, 2012 (Varela and Horvath 2012).





**Figura 1.6. Sinalização de leptina e insulina no núcleo ARC.** A ligação da leptina ao seu receptor LepRb leva à ativação de duas vias principais: a via de JAK2/STAT3 e a de PI3K. A primeira via culmina na translocação do dímero de STAT3 para o núcleo e sua ligação aos promotores dos genes de resposta à leptina. A via de PI3K, ativada tanto por leptina quanto por insulina, leva à ativação de AKT e consequente fosforilação de FoxO1, que então desloca-se do núcleo para o citoplasma, permitindo a ligação de STAT3 aos promotores dos genes de resposta aos dois hormônios. Esta ligação culmina na ativação de Pomc e inibição de Agrp, além de vários outros genes importantes para o controle do balanço energético. Além disso, AKT também fosforila e ativa mTOR, induzindo, também por esta via, a sensibilização da célula aos nutrientes e síntese proteica. A ativação de mTOR também leva à fosforilação inibitória de AMPK, proteína ativada por AMP que, quando ativada, inibe vias de síntese e ativa vias de produção energética. Figura adaptada de Varela & Horvath, 2012 (Varela and Horvath 2012).

Em relação ao metabolismo lipídico, é sabido que a insulina estimula a lipogênese e a adipogênese (Boucher et al. 2016). Curiosamente, o papel da leptina nesse aspecto não é suficientemente explorado. No presente trabalho, nós avaliamos os efeitos da leptina na adipogênese e concluímos que a leptina também compartilha o efeito da insulina no estímulo do acúmulo lipídico e na diferenciação de pré-adipócitos. Nós avaliamos também proteínas relacionadas a gotas lipídicas e mediadores pró-adipogênicos e pró-inflamatórios e observamos que células diferenciadas na presença de leptina sofrem uma antecipação do processo de

adipogênese. Desta forma, no presente trabalho mostramos uma função ainda controversa e pouco explorada da leptina em pré-adipócitos e adipócitos, introduzindo esta adipocina como um importante fator pró-adipogênico.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo Geral**

Avaliar os efeitos da leptina no processo adipogênico e na secreção de mediadores inflamatórios em pré-adipócitos e adipócitos.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Avaliar os efeitos da leptina na formação de gotas lipídicas e na expressão de proteínas associadas às gotas durante a diferenciação de células da linhagem murina de pré-adipócitos 3T3-L1;
- Investigar as vias de sinalização ativadas por estímulos agudos de leptina em pré-adipócitos e adipócitos maduros;
- Analisar a modulação por leptina de fatores pró-adipogênicos durante a diferenciação;
- Avaliar a secreção de mediadores inflamatórios ao longo da adipogênese em células diferenciadas na presença de leptina.

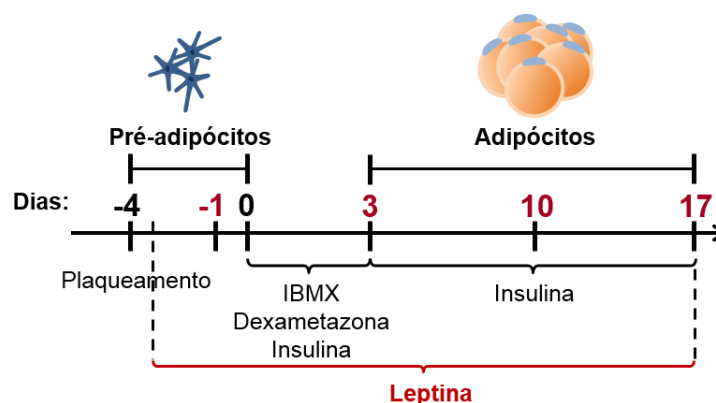
### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1. Cultura de células NIH3T3-L1

A linhagem de pré-adipócitos murinos NIH3T3-L1 foi obtida do Banco Nacional de Células, na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Para manter as células em seu estado não diferenciado (pré-adipócitos), utilizamos meio *Dulbeccos's Modified Eagle Medium* (DMEM) com 4,5 g/L de glicose (*Invitrogen*) suplementado com penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) (*Gibco*) e 10% de soro bovino (*Invitrogen*). As células foram plaqueadas em meio DMEM com 4,5 g/L de glicose contendo penicilina e estreptomicina e 10% de soro fetal bovino (*Invitrogen*), no qual foram mantidas por 4 dias. A diferenciação foi então induzida pela adição de meio DMEM 4,5 g/L de glicose suplementado com penicilina e estreptomicina, 10% soro fetal bovino, 1 µM de dexametazona (*Sigma Aldrich*), 0,5 mM de isobutilmetilxantina (IBMX) (*Sigma Aldrich*) e 0,3 unidades de insulina/mL (*Humulin Regular – Lily*) por 3 dias. Introduzimos então meio DMEM 4,5 g/L de glicose contendo penicilina e estreptomicina, 10% de soro fetal bovino e 0,3 unidades de insulina/mL, substituindo 75% de seu volume total de 2 em 2 dias até o final da diferenciação. As células foram avaliadas em quatro estágios, considerando o momento da indução da diferenciação com o coquetel adipogênico como dia zero. Desta forma, o dia -1 corresponde aos pré-adipócitos e os dias 3, 10 e 17, aos adipócitos progressivamente maduros (**Figura 3.1**).

Para a observação dos efeitos da leptina durante a diferenciação de pré-adipócitos, administramos leptina recombinante (*Peprtech*) nas doses de 0; 0,4; 4 e 40 nM (0; 6,4; 64 e 640 ng/mL, respectivamente) ao longo de toda a diferenciação. A leptina foi repostada a cada troca de meio, conforme protocolo descrito acima.

Para investigar se a leptina substitui a insulina no processo de adipogênese, a insulina foi retirada tanto do meio de indução da diferenciação quanto do meio de maturação das células. Nestes casos, somente a leptina na dose de 4 nM foi repostada a cada troca de meio. A condição controle para este experimento foi a mesma utilizada nos outros ensaios: células diferenciadas na presença de insulina, sem leptina.



**Figura 3.1. Protocolo de diferenciação de pré-adipócitos da linhagem NIH3T3-L1.** As células são submetidas ao meio de indução da diferenciação (IBMX, dexta, insulina) no dia 0. Após 3 dias são mantidas no meio de maturação (insulina) até o final da diferenciação. Nos grupos tratados, a leptina é adicionada a cada troca de meio. As células são analisadas em relação ao tempo de diferenciação: -1 (pré-adipócitos), 3, 10 e 17 dias (adipócitos progressivamente maduros).

### 3.2. Formação de gotas lipídicas

As células foram fixadas com 3,7% de formalina por 10 a 15 mins, lavadas com tampão salina fosfato (PBS) e então coradas com 0,3% de *Oil Red O* (ORO) em isopropanol 100%. Após incubação com ORO por cerca de 1 min, o excesso de corante foi retirado com isopropanol 30% e os poços foram lavados 3 vezes com PBS. As lamínulas retiradas dos poços foram então montadas nas lâminas de microscopia com o meio de montagem *Vectashield* com DAPI (Vector), para posterior visualização por microscopia de fluorescência.

Para a quantificação da coloração foi utilizado o programa *Image J*, através do qual é possível medir a área corada com ORO em pixels e o número de núcleos com DAPI por campo. Desta forma, podemos obter uma média da área marcada para gotas lipídicas por célula. Além disso, para quantificar a marcação com ORO também utilizamos a técnica de extração de ORO. Para extrair o ORO, após a coloração descrita acima, adicionamos 70  $\mu\text{L}/1,9 \text{ cm}^2$  de isopropanol 100% e deixamos a placa vedada e agitando por 30 min. O isopropanol com o ORO extraído é então recolhido e centrifugado a 2500 g por 10 min para excluir a interferência de células soltas durante o procedimento na leitura. O sobrenadante é recolhido e 50  $\mu\text{L}$  são transferidos para uma placa de 96 poços para posterior leitura em espectrofotômetro.

### 3.3. Análise da expressão de proteínas por *Western Blot*

As células foram lisadas diretamente em tampão de amostra (*Laemmli Buffer – Bio-Rad*) a 100° C. Os lisados foram imediatamente aquecidos a 100° C por 5 min, agitados e sonicados por 10 min antes do congelamento. As proteínas provenientes dos lisados foram então separadas por SDS-PAGE em géis de 10% de solução Acrilamida/Bis 37,5:1 (*Bio-Rad*). As proteínas separadas foram transferidas para membranas de nitrocelulose *Amershan Protran 0,45 (GE Healthcare)*, bloqueadas com solução de TBS-T (*Tris-Buffered Saline – Bio-Rad*) com 0,1% de *Tween-20 (Sigma)* suplementada com 5% de leite e incubadas por 18 h com anticorpos primários (diluídos 1:1000 em TBS-T 0,1% + 5% leite) contra PLIN2, PPAR $\gamma$ , Caveolina-1, COX-1 e -2, SREBP-1, AKT e fosfo-AKT (*Santa Cruz Biotechnologies*), TNF- $\alpha$  (*Peprotech*) Perilipina/PLIN1 (*Biorbyt*), JAK2 e fosfo-JAK2, S6K e fosfo-S6K (*Cell Signaling*). Após 5 lavagens com TBS-T 0,1%, as membranas foram incubadas por 1 h com anticorpos secundários (*Vector*) conjugados à peroxidase (HRP) anti-IgG de camundongo, coelho ou cabra diluídos 1:10000 em TBS-T 0,1% + 5% leite e lavadas em seguida por 5 vezes. Para a revelação, foram utilizados os reagentes de quimioluminescência *SuperSignal™ West Pico* e *SuperSignal™ West Dura (Thermo Fisher Scientific)*.

### 3.4. Dosagem de citocinas e mediadores lipídicos

Os sobrenadantes de células 3T3-L1 foram recolhidos nos dias -1, 3, 10 e 17, sempre com 3 dias de contato com as células (tempo após a última troca de meio). Foram então centrifugados a 4°C e a 500 g para a exclusão de células mortas, seguindo-se uma nova centrifugação a 4°C e a 2500 g para a exclusão de debris celulares. Os sobrenadantes foram então congelados a -80° C até o momento do uso. As dosagens de TNF- $\alpha$ , leptina, PGD<sub>2</sub> e PGE<sub>2</sub> foram obtidas a partir de ensaios imunoenzimáticos de captura (ELISA e EIA) de acordo com as instruções de cada kit (*R&D Systems – TNF- $\alpha$  e leptina; Cayman – PGD<sub>2</sub> e PGE<sub>2</sub>*). Para a dosagem de PGD<sub>2</sub> e PGE<sub>2</sub>, todas as amostras foram diluídas 5 vezes.

### 3.5. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa *GraphPad Prism* na versão 5.0 (*GraphPad Software*). As variáveis numéricas foram expressas como média  $\pm$  erro padrão da média. Todas as variáveis numéricas foram testadas para distribuição normal usando o teste de Kolmogorov-Smirnov. Para comparações envolvendo mais de dois grupos com apenas uma característica responsável pelas modificações, foi utilizada a análise de variância *OneWay ANOVA* e o pós-teste de Bonferroni para identificar as diferenças entre os grupos. Para comparações envolvendo mais de dois grupos com duas ou mais características responsáveis

pelas modificações observadas, foi utilizada a análise de variância *TwoWay ANOVA* e o pós-teste de Bonferroni. Para comparações entre dois grupos apenas, as variáveis contínuas foram analisadas através do teste t de student (no caso de distribuição paramétrica/normal) ou o teste U de Mann-Whitney (no caso de distribuição não-paramétrica).

## 4. Resultados

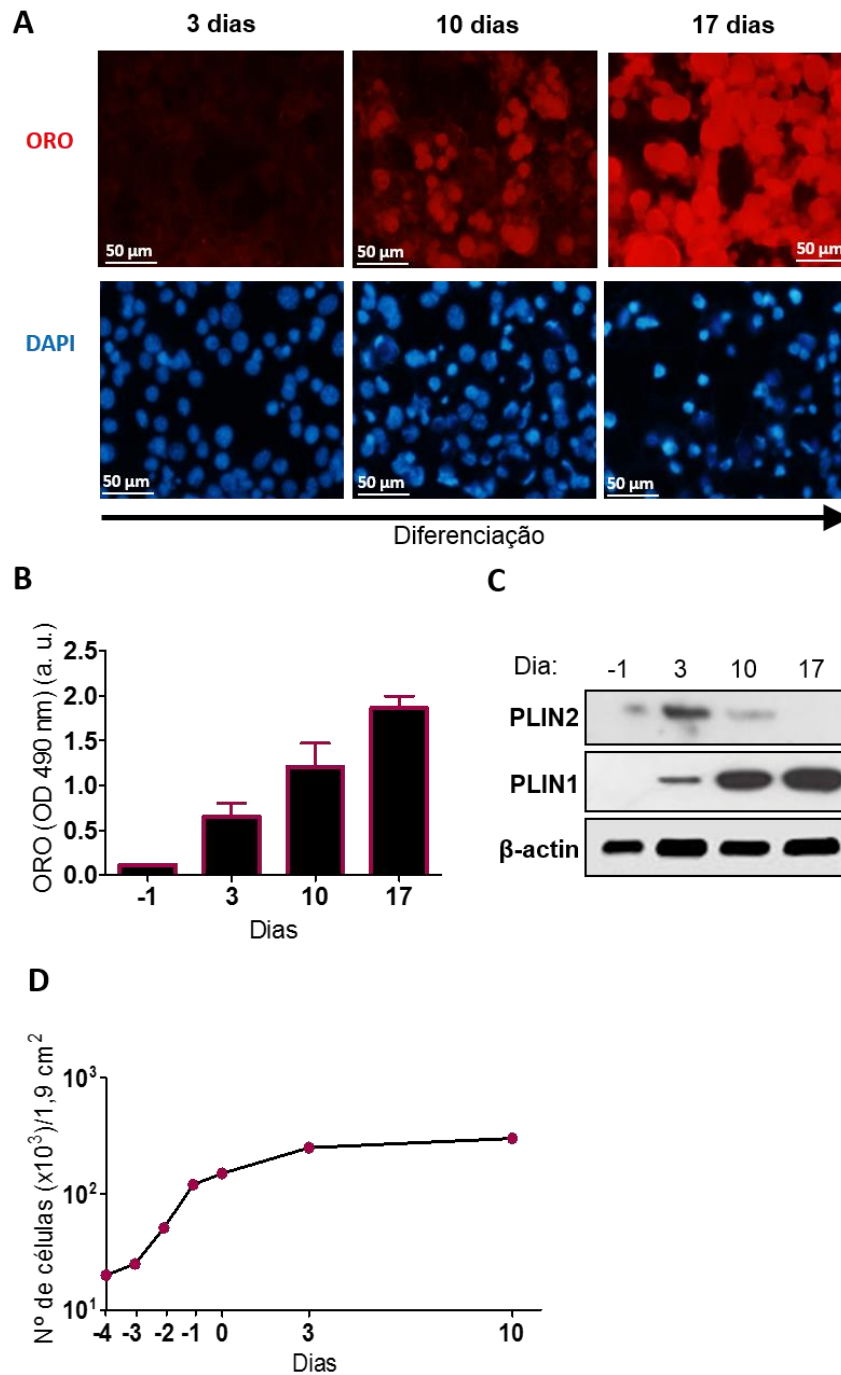
### 4.1. Diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1

Para posterior avaliação dos efeitos da leptina sobre a adipogênese, nós inicialmente caracterizamos a diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1. A progressão da diferenciação da 3T3-L1 em adipócitos foi avaliada comparando-se a biogênese e hipertrofia de gotas lipídicas nos dias -1, 3, 10 e 17. As células foram marcadas com *Oil Red O* (ORO), corante específico para lipídios neutros e DAPI, para núcleo, e observadas por microscopia de fluorescência. Como mostrado na **Figura 4.1 A**, quanto maior o tempo de diferenciação das células (10 e 17 dias), mais marcação com ORO foi observada, indicando que as células estavam em processo de adipogênese e que os adipócitos mais maduros eram encontrados no dia 17. Além disso, quantificamos a marcação através de extração de ORO e leitura em espectrofotômetro. Como mostra a **Figura 4.1 B**, conforme as células diferenciavam, havia um aumento nos níveis de ORO extraído, corroborando com os resultados obtidos a partir das imagens de microscopia descritas anteriormente. De modo importante, nosso trabalho mostra que as células têm um aumento significativo do acúmulo lipídico quando a diferenciação progride até o dia 17. A maioria dos trabalhos que utilizam células 3T3-L1 como modelo procedem com a diferenciação somente até os dias 8 a 10 (Yuan et al. 2016; Y.-T. Wang et al. 2016). Nossos dados indicam que o dia 17 corresponde a adipócitos mais maduros em relação aos estágios anteriores, sendo um estágio mais apropriado para o estudo de células 3T3-L1 diferenciadas.

Um dos aspectos que caracterizam a diferenciação de pré-adipócitos é o aumento das gotas lipídicas. Na maioria dos tipos celulares, inclusive em pré-adipócitos, PLIN2 (ADRP) é a principal proteína estrutural presente na membrana de gotas lipídicas. Porém, conforme a adipogênese ocorre e os adipócitos amadurecem, suas gotas lipídicas aumentam e com isso ocorre a substituição de PLIN2 por PLIN1 na membrana destas organelas (Brasaemle et al. 1997). De acordo com isso, nós mostramos que esta substituição também ocorre ao longo da diferenciação de células 3T3-L1 na ausência de qualquer estímulo (**Figura 4.1 C**).

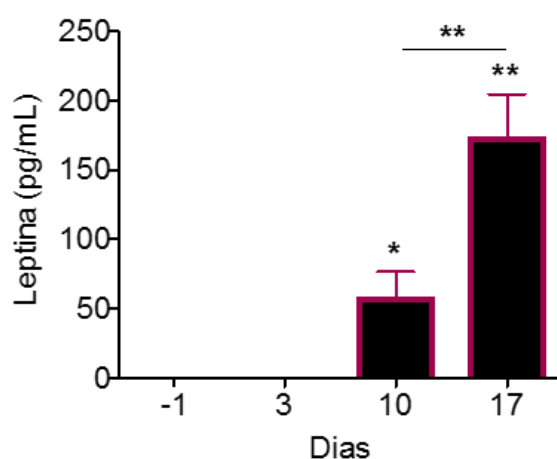
Além disso, nós realizamos a contagem de células durante a diferenciação e a viabilidade foi avaliada pelo teste de exclusão do azul de Trypan (>95% de células viáveis). Nós observamos um aumento progressivo da proliferação celular até o dia -1, a partir do qual a proliferação é reduzida (**Figura 4.1 D**). Este dado, em conjunto com os acima descritos, indica que a fase de expansão clonal das células ocorre até o dia -1, após o qual a proliferação é reduzida e o processo de diferenciação tem início.





**Figura 4.1. Diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1.** (A) Células 3T3-L1 foram marcadas com ORO (em vermelho) para lipídios neutros (gotas lipídicas) e DAPI (em azul) para núcleo. As imagens são representativas de 10 experimentos. (B) Para a quantificação da marcação, foi feita a extração de ORO em isopropanol 100% seguida de leitura em espectrofotômetro. Barras representam média  $\pm$  erro padrão da média de no mínimo 3 experimentos independentes. (C) Análise de *Western blot* da expressão de PLIN2 e PLIN1 ao longo da diferenciação (dias -1, 3, 10 e 17). Representativo de, no mínimo 3 experimentos independentes. (D) O número de células foi obtido através da tripsinização de células plaqueadas e coloração com azul de Trypan nos dias indicados. A curva de crescimento é representativa de 3 experimentos independentes.

A leptina é uma adipocina produzida principalmente por adipócitos maduros (Luo and Liu 2016). Nós utilizamos, então, a dosagem de leptina para avaliar a funcionalidade das células diferenciadas. Nós observamos que a diferenciação é acompanhada por um aumento gradativo na secreção de leptina pelas células (**Figura 4.2**). É importante ressaltar que com 17 dias de diferenciação as células secretam aproximadamente o dobro de leptina em relação às células com 10 dias. Esse dado corrobora com o aumento do conteúdo lipídico após 17 dias observado nas análises de microscopia e extração de ORO (**Figura 4.1A e B**), reafirmando que as células com 17 dias de diferenciação podem ser consideradas adipócitos mais maduros em comparação ao dia 10.

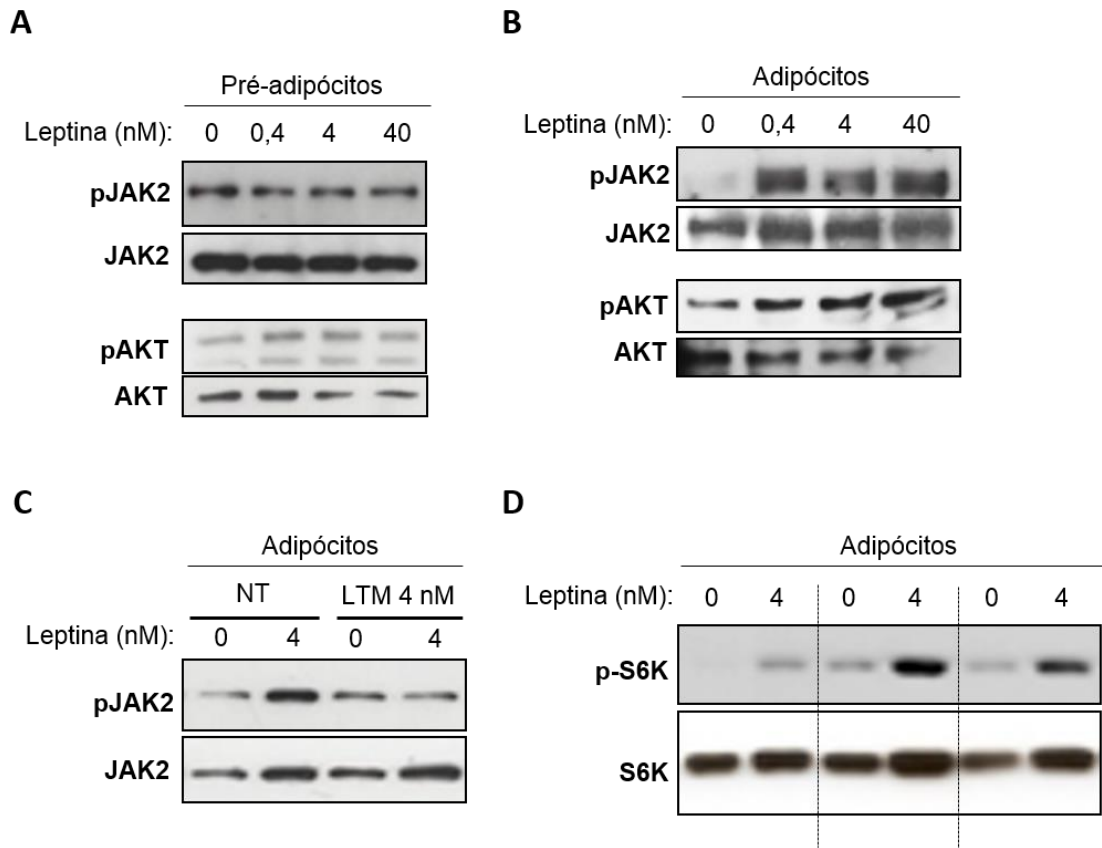


**Figura 4.2. Adipócitos 3T3-L1 secretam leptina.** Concentração de leptina no sobrenadante de células 3T3-L1 em seus estágios não diferenciado (pré-adipócitos, dia -1) e diferenciados (adipócitos com 3, 10 e 17 dias de diferenciação) foi medida através de ELISA. Barras representam média  $\pm$  erro padrão da média de 7 experimentos independentes. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,005$ .

## 4.2. Leptina ativa as vias de JAK2/STAT3 e PI3K/AKT/mTOR em adipócitos

Uma vez que os efeitos da leptina em adipócitos são até então pouco explorados, nós testamos a responsividade dos adipócitos a esta adipocina, investigando a fosforilação de proteínas classicamente ativadas por leptina: JAK2, AKT e mTOR (Maya-Monteiro and Bozza 2008). Para isso, estimulamos pré-adipócitos (dia -1) e adipócitos (dia 17) com leptina nas doses de 0,4, 4 e 40 nM por 20 mins. Nós observamos que a leptina é capaz de induzir a fosforilação de JAK2 e AKT em todas as concentrações testadas em adipócitos, mas não em pré-adipócitos (**Figuras 4.3 A e B, Anexo I**). Para investigar a participação do receptor de leptina LepR nas vias de sinalização analisadas, nós estimulamos adipócitos com leptina na presença do antagonista de LepR LTM (do inglês *Leptin Triple Mutant*). Adipócitos com 17 dias de diferenciação foram estimuladas por 20 mins com leptina 0 ou 4 nM na presença ou ausência do antagonista. Observamos que o aumento da fosforilação de JAK2 induzido por leptina não ocorreu na presença de LTM (**Figura 4.3 C**), o que indica que a sinalização da leptina em adipócitos é mediada pela ligação ao seu receptor LepR.

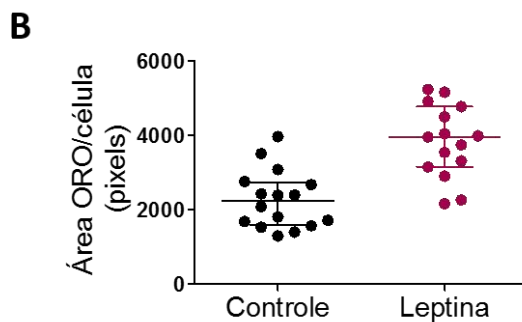
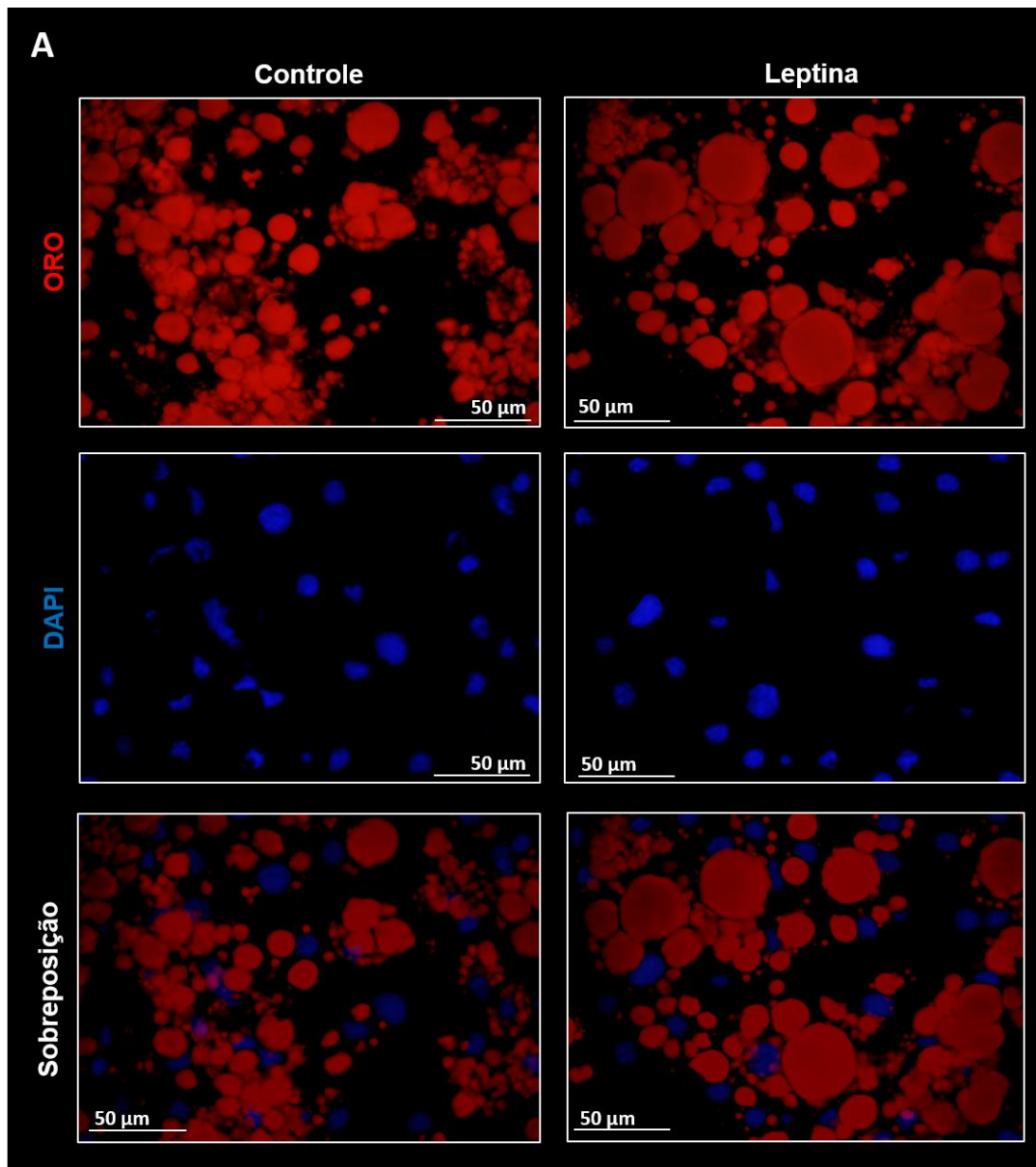
Tendo em vista a importância da via de mTOR para processos celulares relacionados à síntese/anabolismo, e que sua ativação por leptina já foi demonstrada no hipotálamo (Cota et al. 2006), e pelo nosso grupo em macrófagos (Maya-Monteiro et al. 2008) e em células epiteliais intestinais (Fazolini et al. 2015), nós avaliamos a ativação dessa via por leptina em adipócitos com 17 dias diferenciação. Foi observado que mediante o estímulo com 4 nM de leptina por 20 mins os adipócitos tiveram um aumento na fosforilação de S6K, proteína diretamente fosforilada por mTOR (**Figura 4.3 D**). Em conjunto, esses dados demonstram que a leptina é capaz de se ligar ao seu receptor ObR em adipócitos 3T3-L1 e ativar suas vias clássicas de sinalização.



**Figura 4.3. Leptina induz fosforilação de JAK2, AKT e S6K.** Pré-adipócitos (dia -1) (A) e adipócitos (dia 17) (B) foram submetidos a estímulos de 20 min com leptina nas doses de 0,4, 4 e 40 nM para avaliação da fosforilação de JAK2 e AKT. (C) Adipócitos submetidos ao estímulo de 20 mins com 4 nM de leptina na presença ou ausência de 4 nM do antagonista do receptor de leptina LTM e a fosforilação de JAK2 foi avaliada por *Western blot*. NT, grupo não tratado com o antagonista. (D) Fosforilação de S6K avaliada por *Western blot* de adipócitos com 17 dias de diferenciação sob estímulo de 4 nM de leptina por 20 min, provenientes de 3 experimentos independentes.

### 4.3. Leptina induz a diferenciação de adipócitos 3T3-L1

Para verificar o efeito da leptina sobre a adipogênese, células 3T3-L1 foram diferenciadas na presença ou ausência de leptina a partir do dia -3 de cultura (**Figura 3.1**). Nós inicialmente avaliamos o acúmulo lipídico em adipócitos diferenciados por 17 dias na presença de leptina utilizando a coloração com ORO para gotas lipídicas e DAPI para núcleo. Como mostra a **Figura 4.4 A**, adipócitos diferenciados na presença de leptina apresentaram gotas maiores em relação aos adipócitos controle. A quantificação da área marcada por ORO é mostrada na **Figura 4.4B** e confirma o maior acúmulo lipídico em adipócitos tratados com leptina.

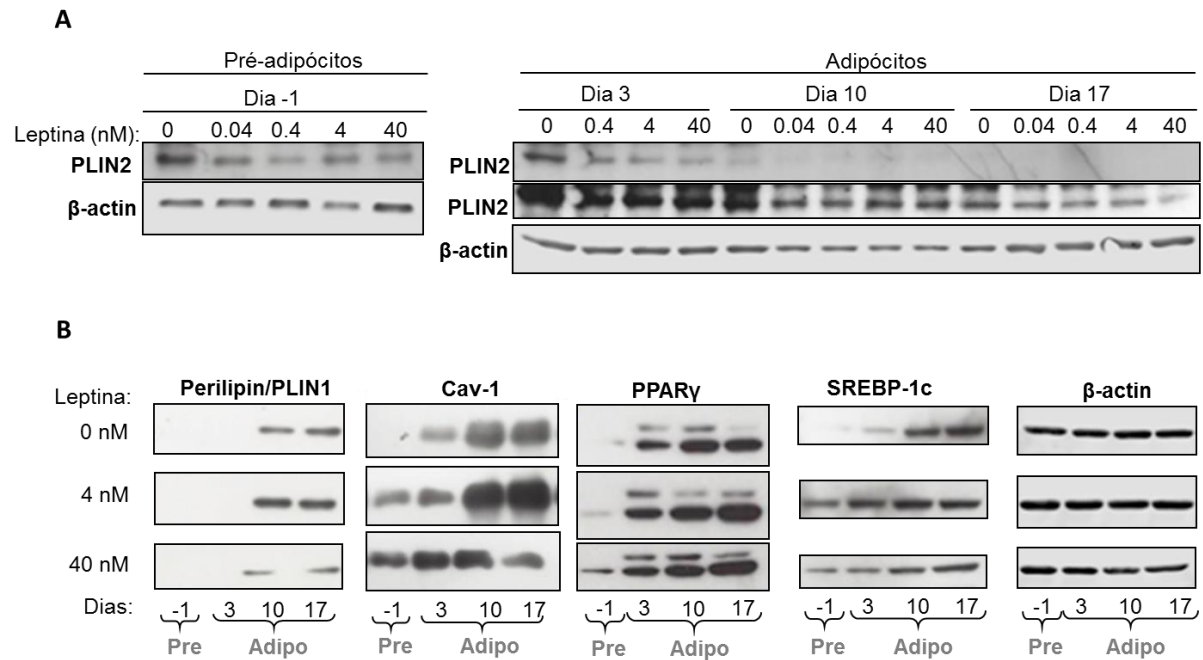


**Figura 4.4. Leptina induz aumento de gotas lipídicas em adipócitos.** Adipócitos foram submetidos ao estímulo com leptina a partir do dia -3 e o estímulo foi mantido durante toda a diferenciação até o dia 17. **(A)** As imagens mostram a coloração com ORO (vermelho), DAPI (azul) e a sobreposição, e são representativas de 2 experimentos independentes. **(B)** Gráfico mostra a quantificação da área marcada com ORO em relação ao número de células após análise das imagens utilizando o programa *Image J*. Cada ponto representa um campo analisado. Barras representam mediana com intervalo interquartil.

Nós então avaliamos a expressão das proteínas envolvidas na formação e estrutura das gotas lipídicas PLIN2, PLIN1 e Cav-1 em células 3T3-L1 diferenciadas na presença ou ausência de leptina até os dias -1, 3, 10 e 17. Inicialmente as células foram tratadas continuamente com quatro doses de leptina (0,04; 0,4; 4 e 40 nM) e a expressão das proteínas em questão foi avaliada ao longo da diferenciação (dados mostrados para PLIN2 na **Figura 4.5 A**). Nós observamos que o tratamento com leptina em todas as doses administradas foi capaz de reduzir a expressão de PLIN2 nos tempos avaliados (3, 10 e 17 dias de diferenciação) (**Figura 4.5 A**). Foram escolhidas as doses de 4 e 40 nM de leptina para representar as análises subsequentes. As replicatas deste experimento encontram-se no **Anexo II e III**.

O tratamento contínuo com leptina na dose de 4 nM, mas não na dose de 40 nM, induziu um aumento na expressão de PLIN1 em adipócitos diferenciados por 10 e 17 dias em comparação às células diferenciadas na ausência do hormônio (**Figura 4.5 B e Anexo IV**). Em conjunto, a redução de PLIN2 e o aumento de PLIN1 ao longo da diferenciação fortalecem o papel de leptina na antecipação do amadurecimento das células. Em paralelo, o tratamento contínuo das células com as doses de 4 e 40 nM de leptina antecipou a expressão de Cav-1 para estágios mais precoces da diferenciação (dia -1), e aumentou a expressão desta proteína em adipócitos diferenciados por 3, 10 e 17 dias em comparação aos adipócitos diferenciados na ausência de leptina (**Figura 4.5 B e Anexo V**).

Finalmente, nós investigamos a ação da leptina sobre a expressão das proteínas relacionadas à adipogênese e à síntese lipídica PPAR $\gamma$  e SREBP1c durante a diferenciação de células 3T3-L1. Nós observamos que o tratamento contínuo com leptina nas doses de 4 e 40 nM induziu um aumento na expressão de PPAR $\gamma$  em pré-adipócitos (dia -1) e adipócitos (dia 17) (**Figura 4.5 B e Anexo VI**). Além disso, observamos um aumento da expressão de SREBP1c nas fases iniciais da diferenciação (dias -1 e 3) de adipócitos tratados com leptina nas doses de 4 e 40 nM em comparação aos adipócitos não tratados (**Figura 4.5 B e Anexo VII**). Em conjunto, esses dados demonstram uma ação pró-adipogênica da leptina.

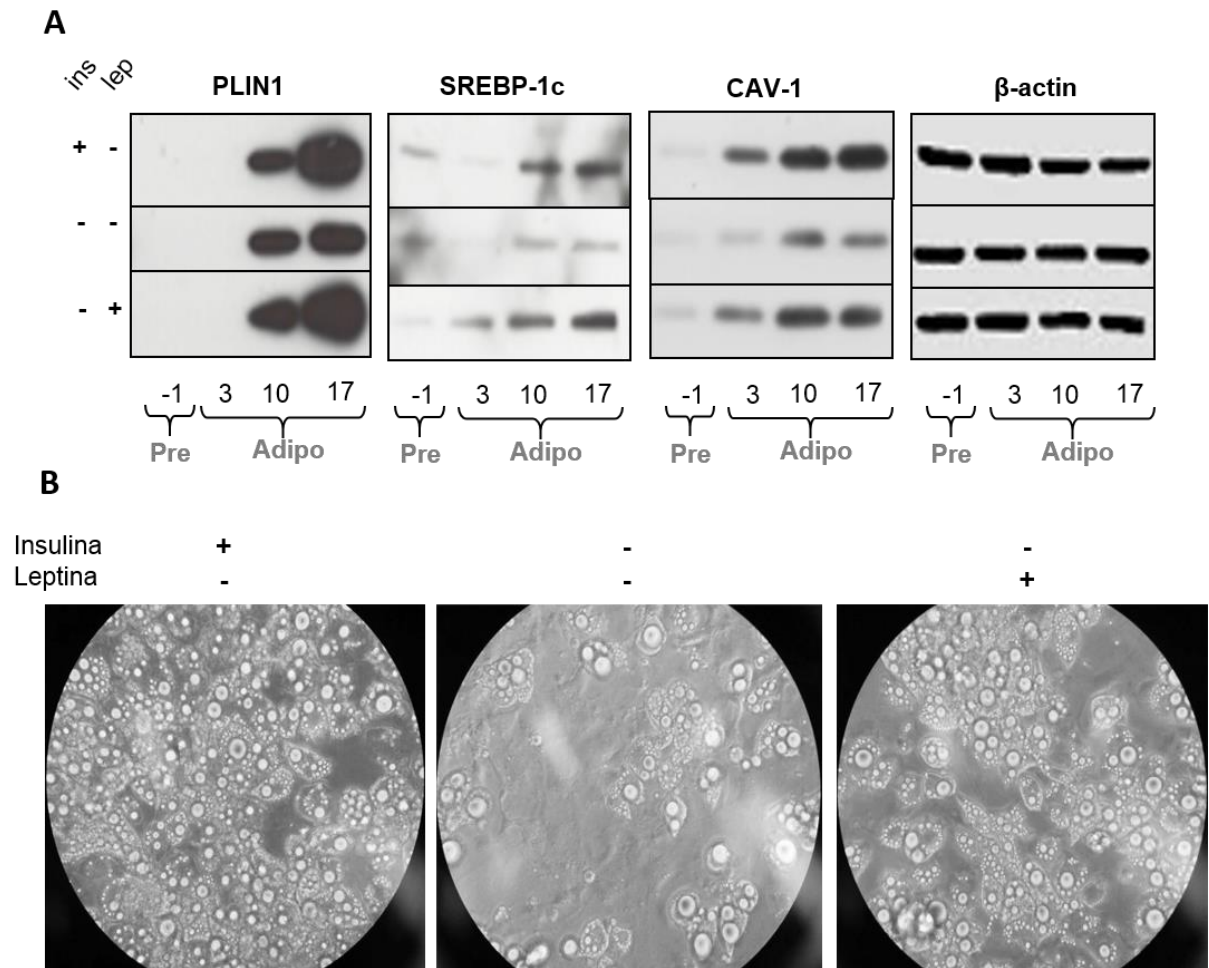


**Figura 4.5. Leptina modula a expressão de proteínas relacionadas à adipogênese.** Células 3T3-L1 foram estimuladas continuamente durante a diferenciação com leptina nas doses de 0,04; 0,4; 4 ou 40 nM e a expressão de PLIN2 (ADRP) (**A**), Cav-1 e PLIN1, PPAR $\gamma$  e SREBP1c (**B**) foi avaliada por *Western blot* nos dias -1 (pré-adipócitos), 3, 10 e 17 (adipócitos). *Blots* representativos de, no mínimo 3 experimentos independentes. Painel (**A**) mostra duas exposições da mesma membrana revelada para PLIN2.

#### 4.4. Leptina substitui insulina na indução da adipogênese

A insulina e a leptina compartilham diversos efeitos incluindo a inibição da ingesta alimentar e a modulação do balanço energético (Varela and Horvath 2012). Além disso, a insulina e a leptina compartilham uma via de sinalização - JAK2/PI3K/AKT (Amitani et al. 2013). A insulina é um hormônio essencial no coquetel adipogênico para que os pré-adipócitos 3T3-L1 diferenciem (Boucher et al. 2016). Uma vez que a leptina apresentou ação pró-adipogênica, nós nos perguntamos se a leptina seria capaz de substituir a insulina na diferenciação das células 3T3-L1. Para isso nós diferenciamos os adipócitos na presença de insulina (0,3 U/mL) (condição controle dos experimentos descritos anteriormente), substituindo a insulina por leptina (4 nM) ou na ausência de ambos os hormônios, e avaliamos a expressão de PLIN1, SREBP-1c e Cav-1 no decorrer da diferenciação. Nós observamos que na ausência dos dois hormônios as células diferenciaram pouco, como evidenciado pela redução da expressão de PLIN1, SREBP-1c e CAV-1 (**Figura 4.6 A**) e pela presença de muitas células não-diferenciadas no dia 17 (**Figura 4.6 B** – painel central) em comparação com o controle com insulina (**Figura 4.6 B** – esquerda). De forma importante, a leptina é capaz de recuperar quase totalmente a adipogênese dessas células mesmo na ausência de insulina, aumentando a expressão de PLIN1, SREBP-1c e Cav (**Figuras 4.6 A**) a formação de gotas lipídicas (**Figuras 4.6 B** – direita) em comparação as células diferenciadas na ausência dos dois hormônios.

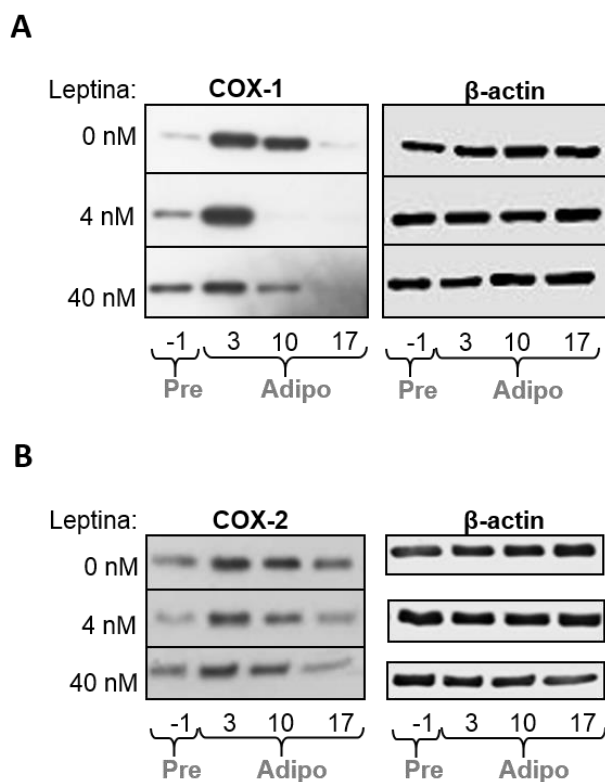




**Figura 4.6. Leptina substitui insulina durante a diferenciação de células 3T3-L1.** As células foram diferenciadas na presença de 0,3 U/mL de insulina, 4 nM de leptina ou na ausência dos dois hormônios. **(A)** Análise da expressão das proteínas PLIN1, SREBP-1c e CAV-1 por *Western blot* nos dias -1, 3, 10 e 17 de diferenciação. **(B)** Imagens de adipócitos com 17 dias de diferenciação em cada condição.

#### 4.5. Leptina modula a produção de eicosanóides durante a adipogênese

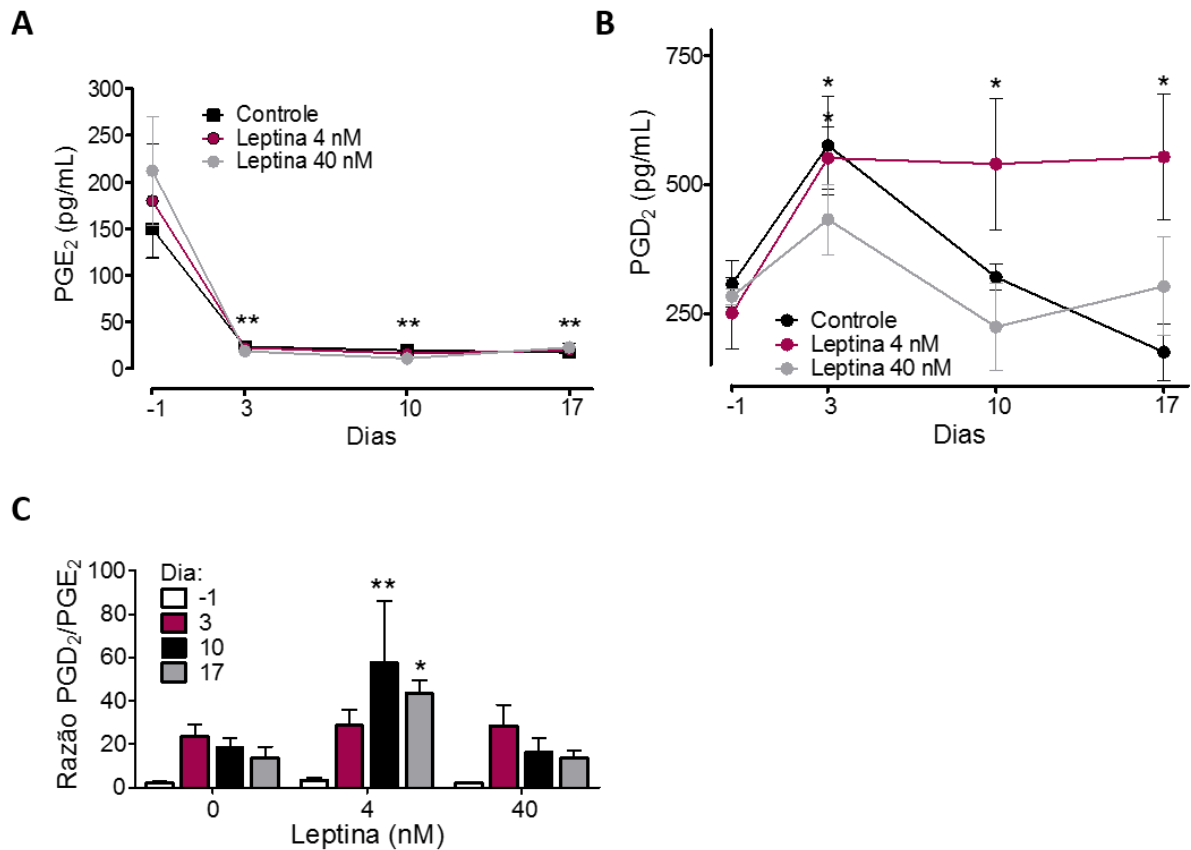
Ciclooxigenases são enzimas presentes na via do ácido araquidônico. Ambas as isoformas (COX-1 e -2) produzem prostaglandinas, sendo COX-1 constitutivamente expressa e COX-2 geralmente induzida em situações patogênicas ou metabólicas que exijam um aumento na produção de mediadores lipídicos (Yan et al. 2003; Chan et al. 2016). Visto que a expressão de COXs e a formação de alguns de seus produtos já foram relacionados à regulação da adipogênese (Yan et al. 2003; Chu et al. 2009; Chu et al. 2010), nós investigamos a expressão das duas isoformas de COX durante a diferenciação de células 3T3-L1. Nós observamos que, durante a diferenciação na ausência de leptina, tanto COX-1 quanto COX-2 tiveram sua expressão aumentada logo após a indução da diferenciação (dia 3) e progressivamente reduzida ao longo do amadurecimento das células (dias 10 e 17) (**Figura 4.7 A e B e Anexos VIII - X**). Quando as células foram diferenciadas na presença de leptina na dose de 4 nM, a expressão de COX-2 foi reduzida em todas as fases da adipogênese (**Figura 4.7 B e Anexos VIII e IX**). Em relação à COX-1, o tratamento contínuo com leptina foi capaz de aumentar sua expressão em pré-adipócitos (dia -1) e em adipócitos na fase inicial da diferenciação (dia 3) e reduzi-la em adipócitos maduros (dias 10 e 17) quando comparados às células controle (**Figura 4.7 A e Anexo X**). O tratamento com leptina na dose de 40 nM só induziu o aumento da expressão de COX-1 em pré-adipócitos (dia -1), reduzindo-a nas fases seguintes (dias 3, 10 e 17) (**Figura 4.7 A e Anexo X**). A redução na expressão de COX é associada na literatura à indução da adipogênese (Chu et al. 2009; Chu et al. 2010), e a antecipação dessa redução por leptina corrobora com o papel pró-adipogênico desta adipocina demonstrado neste trabalho.



**Figura 4.7. Leptina reduz expressão de COX-1 e COX-2.** Pré-adipócitos (dia -1) e adipócitos (dias 3, 10 e 17) foram diferenciados na presença ou ausência de 4 ou 40 nM de leptina e a expressão de COX-1 (**A**) e COX-2 (**B**) foi avaliada por *Western blot* nos dias -1, 3, 10 e 17. Blots representativos de, no mínimo, 3 experimentos independentes.

Os efeitos da  $\text{PGD}_2$  e da  $\text{PGE}_2$  têm sido bastante explorados tanto em relação à inflamação (Jandl et al. 2016; Hellmann et al. 2013; Woodward et al. 2016) quanto à adipogênese, sendo  $\text{PGD}_2$  sabidamente pró-adipogênica (Virtue et al. 2015) e  $\text{PGE}_2$  anti-adipogênica (Yan et al. 2003). Tendo em vista que estes eicosanóides constituem uma importante conexão entre inflamação e adipogênese e que os dois processos são essenciais para o desenvolvimento da obesidade, nós avaliamos os efeitos da leptina na secreção de  $\text{PGD}_2$  e  $\text{PGE}_2$  durante a diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1. Para isso, as células foram estimuladas continuamente com 4 ou 40 nM de leptina e a secreção das prostaglandinas foi avaliada por EIA nos dias -1, 3, 10 e 17. Observamos que a leptina não alterou a secreção de  $\text{PGE}_2$ , que decaiu com 3 dias de diferenciação e se manteve em níveis baixos até o dia 17 (**Figura 4.8 A**). Nas células controle, a secreção do mediador pró-adipogênico  $\text{PGD}_2$  aumentou no terceiro dia de diferenciação, e após este dia diminuiu progressivamente ao longo do amadurecimento das células (**Figura 4.8 B**). Porém, quando as células foram diferenciadas na presença de 4 nM de

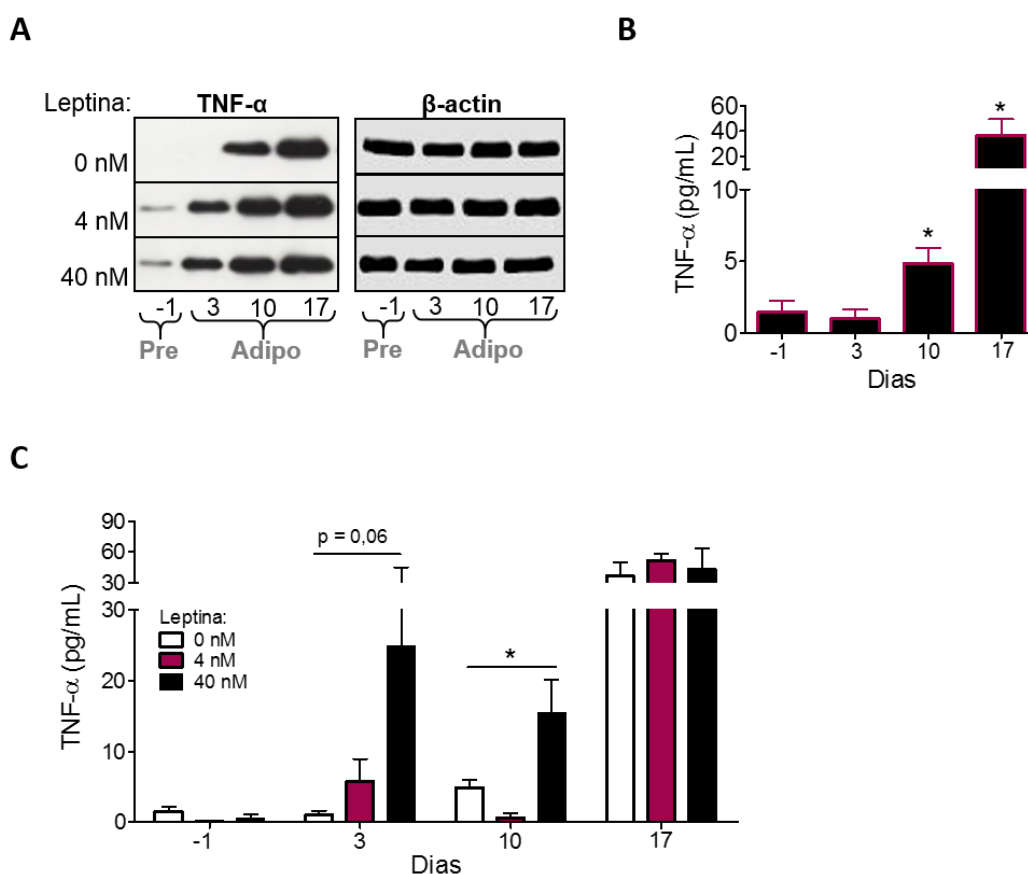
leptina, a secreção de  $\text{PGD}_2$  foi mantida em níveis altos até o final da diferenciação, o que não foi observado com a dose de 40 nM (**Figura 4.8 B**). Com isso nós concluímos que a dose de 4 nM de leptina é capaz de modificar o balanço da secreção das prostaglandinas  $\text{D}_2$  e  $\text{E}_2$  durante a diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1 (**Figura 4.8 C**), sugerindo que os efeitos pró-adipogênicos da leptina nas fases mais tardias da diferenciação podem ser, pelo menos em parte, mediados por  $\text{PGD}_2$ .



**Figura 4.8. Leptina aumenta a secreção de  $\text{PGD}_2$  durante a adipogênese.** A secreção dos eicosanóides  $\text{PGE}_2$  (**A**) e  $\text{PGD}_2$  (**B**) foi avaliada por EIA em células diferenciadas na presença de leptina nas doses de 4 e 40 nM até os dias -1, 3, 10 e 17. (**C**) Razão  $\text{PGD}_2/\text{PGE}_2$  em cada condição avaliada. Pontos e barras representam média  $\pm$  erro padrão da média de 5 experimentos independentes. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,001$  em relação ao dia -1.

#### 4.6. Leptina induz aumento da expressão e secreção de TNF- $\alpha$

Células 3T3-L1 foram estimuladas continuamente com leptina nas doses de 4 e 40 nM e a expressão e secreção da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  foi avaliada nos dias -1, 3, 10 e 17 por *Western blot* e ELISA, respectivamente. Nós observamos que as duas doses de leptina foram capazes de induzir aumento na expressão de TNF- $\alpha$  em células não-diferenciadas e com 3 dias de diferenciação (**Figura 4.9 A e Anexo X**), mostrando que a leptina administrada nas primeiras fases da adipogênese foi capaz de antecipar características de adipócitos maduros. Como esperado, a diferenciação das células não estimuladas foi acompanhada por um aumento progressivo da secreção de TNF- $\alpha$  (**Figura 4.9 B**). De forma interessante, somente a dose de 40 nM foi capaz de induzir aumento na secreção de TNF- $\alpha$  nos dias 3 e 10 (**Figura 4.9 C**), sugerindo que doses mais altas de leptina podem agir por mecanismos diferentes quando comparadas a doses mais baixas.



**Figura 4.9. Leptina induz aumento de TNF- $\alpha$  em pré-adipócitos e adipócitos.** Células 3T3-L1 foram estimuladas continuamente com leptina nas doses de 4 e 40 nM. A expressão de TNF- $\alpha$  foi avaliada nos dias -1, 3, 10 e 17 por *Western blot* (A). A secreção da citocina foi avaliada em células não estimuladas (B) e estimuladas durante o processo de adipogênese (C). Imagem representativa de 3 experimentos independentes. Barras representam média  $\pm$  erro padrão da média de, no mínimo, 5 experimentos independentes. \* p < 0,05.

## 5. Discussão

A obesidade é um quadro caracterizado por aumento da massa adiposa, síndrome metabólica e ativação inflamatória crônica (Guilherme et al. 2008). A leptina é um hormônio produzido principalmente pelo tecido adiposo que participa da modulação do balanço energético e peso corporal através de sua sinalização no hipotálamo (Kwon, Kim, and Kim 2016). Os níveis séricos de leptina se encontram elevados durante o quadro de obesidade, no entanto, pacientes obesos desenvolvem resistência à sinalização central (hipotalâmica) da leptina (Maffei et al. 1995). Além da sinalização central, efeitos periféricos da leptina foram descritos em diversos tecidos e tipos celulares, principalmente em células do sistema imune (Zhou et al. 2015; Jitprasertwong et al. 2014; Maya-Monteiro et al. 2008; Maya-Monteiro and Bozza 2008). No entanto, os efeitos da leptina no seu tecido de origem, o tecido adiposo, não foram até então investigados. Nós demonstramos pela primeira vez que a leptina é capaz de gerar sinalização em adipócitos 3T3-L1 e introduzimos esta adipocina como um importante fator pró-adipogênico.

Sabe-se que centralmente a leptina estimula lipólise no tecido adiposo tanto através da ativação hipotalâmica dos neurônios anorexigênicos e inibição dos orexigênicos quanto através da ativação de fibras simpáticas nas junções neuro-adiposas, recentemente descritas pelo grupo de Jeffrey Friedman (Zeng et al. 2015). De forma interessante, nosso trabalho demonstra que a sinalização da leptina diretamente no adipócito induz aumento das gotas lipídicas, além de antecipar características associadas à adipogênese. Consistente com esses dados, trabalhos anteriores do nosso grupo demonstram que a leptina é capaz de ativar macrófagos e células epiteliais intestinais induzindo a formação de gotas lipídicas nessas células (Maya-Monteiro et al. 2008; Fazolini et al. 2015). Na ausência da obesidade, é provável que os efeitos centrais e periféricos da leptina em relação ao tecido adiposo estejam em equilíbrio para a manutenção da homeostase. Porém na obesidade, devido à resistência central à leptina, os efeitos periféricos devem prevalecer, caso não haja resistência periférica à leptina, o que vem sendo estudado pelo nosso grupo. Dessa forma, o esclarecimento dos efeitos da leptina localmente em adipócitos é importante para compreender as ações desta adipocina no tecido adiposo na ausência do controle do sistema nervoso central.

Além do aumento do estoque de lipídios nos adipócitos, a obesidade também envolve uma maior diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos, formando novas células capazes de armazenar o excesso de calorias, processo chamado adipogênese. Foi demonstrado que no tecido adiposo branco de camundongos submetidos a dietas hipercalóricas existe uma maior proliferação de células precursoras de adipócitos e uma indução do processo adipogênico

(Jeffery et al. 2015). A importância do PPAR $\gamma$  para a indução da adipogênese e amadurecimento de adipócitos já é bem estabelecida (Lefterova et al. 2014; Fujimori 2012; Zuo, Qiang, and Farmer 2006; White and Stephens 2010; Christodoulides and Vidal-Puig 2010; Tontonoz and Spiegelman 2008; Luo and Liu 2016; Arimura et al. 2004; Kang et al. 2014). No presente trabalho nós mostramos que a leptina potencializa o aumento da expressão de PPAR $\gamma$  ao longo da adipogênese, inclusive em pré-adipócitos (**Figura 4.5 B**), indicando uma indução da adipogênese em células diferenciadas na presença de leptina já em estágios precoces da diferenciação. Outros fatores além do PPAR $\gamma$  vêm sendo descritos na indução do processo adipogênico, como o SREBP-1c. Em 1998, Kim e colaboradores mostraram que a expressão de SREBP-1 era alterada de acordo com o estado nutricional dos camundongos, aumentando logo após a alimentação. Os autores também descreveram a ativação dos genes de leptina e FAS (ácido graxo sintase) por SREBP-1. Curiosamente, a ativação de FAS foi mediada pelo elemento responsivo à insulina no promotor de SREBP-1 (Kim et al. 1998). Desde então, SREBP-1 vem sendo fortemente associado à sensibilidade à insulina, estado nutricional e adipogênese (Bizeau and MacLean 2003; Commerford et al. 2004; Eberlé et al. 2004; White and Stephens 2010; Takahashi et al. 2013). Nós observamos que a expressão de SREBP-1c é antecipada em células tratadas com leptina, com aumento evidente em pré-adipócitos e adipócitos imaturos (-1 e 3 dias de diferenciação, respectivamente) (**Figura 4.5 B**). A antecipação da expressão de SREBP-1c e o aumento da expressão de PPAR $\gamma$  em células tratadas com leptina indicam uma função local pró-adipogênica desta adipocina.

A adipogênese é caracterizada pela biogênese e hipertrofia das gotas lipídicas, o que caracteriza o amadurecimento dos adipócitos em formação, além da proliferação e migração de células precursoras de adipócitos (Jeffery et al. 2015; Spalding et al. 2008). Em pré-adipócitos e outras células que possuem essencialmente gotas lipídicas pequenas, como macrófagos, a principal proteína estrutural presente na membrana dessas gotas é a PLIN2 ou ADRP. Particularmente em adipócitos, à medida que a célula amadurece e suas gotas lipídicas aumentam, com diminuição do conteúdo de PLIN2 aumento do conteúdo de PLIN1 (Brasaemle et al. 1997; Heid et al. 2014; Wolins, Brasaemle and Bickel 2006). De modo consistente, nós observamos a redução da expressão de PLIN2 e aumento da expressão de PLIN1 à medida que as células diferenciavam (**Figura 4.1 B**). Nossos dados mostram que a leptina potencializa esse fenômeno como evidenciado pela antecipação da redução de PLIN2 e pelo aumento da expressão de PLIN1 (**Figura 4.5 A e B**), o que é consistente com o maior tamanho das gotas lipídicas em células diferenciadas na presença de leptina (**Figura 4.4**). A PLIN1 Este resultados corroboram com o papel até então desconhecido da leptina como um fator indutor da adipogênese.

As gotas lipídicas (também chamadas de corpúsculos lipídicos) vêm sendo cada vez mais consolidadas, inclusive pelo nosso grupo, como organelas essenciais para processos como produção de eicosanóides, ativação celular e resposta a infecções (Mattos et al. 2010; Silva et al. 2009; Feingold et al. 2010; Toledo et al. 2016; Araújo-Santos et al. 2010; Accioly et al. 2008). Nosso grupo mostrou que a via do metabolismo do ácido araquidônico, via de síntese de eicosanóides, está compartimentalizada também nas gotas lipídicas (Mattos et al. 2010; Silva et al. 2009; Toledo et al. 2016; Araújo-Santos et al. 2010; Accioly et al. 2008). Dentre as proteínas essenciais para esta via estão as ciclooxigenases COX-1 e COX-2. A COX-1 é conhecida por ser constitutivamente expressa, enquanto a COX-2 é ativada frente a alguns estímulos metabólicos ou inflamatórios. Na literatura, alguns trabalhos associam a redução da expressão de COX-2 à melhora nas condições de resistência à insulina e inflamação associadas à obesidade (Gartung et al. 2016; Chan et al. 2016). A redução da expressão de COX-1 e COX-2 também é bastante correlacionada à indução da adipogênese, como demonstrado pelo silenciamento dos respectivos genes ou pelo tratamento com inibidores específicos (Chu et al. 2010; Fajas et al. 2003; Adi et al. 2015; Rahman et al. 2013; Chu et al. 2009). Nossos resultados demonstram a modulação por leptina das duas isoformas de COXs ao longo da diferenciação das células 3T3-L1. Nós observamos um aumento das COXs na fase inicial da diferenciação (3 dias), seguida por uma redução paralela ao amadurecimento dos adipócitos. Por sua vez, a leptina agiu potencializando os efeitos da diferenciação na expressão de COX-1 e COX-2 (**Figura 4.7**). A redução da expressão de ambas as isoformas da enzima nas células diferenciadas na presença de leptina corrobora com o papel pró-adipogênico desta adipocina. De forma interessante, a leptina também foi capaz de reduzir a expressão de COX-2 em pré-adipócitos e adipócitos com somente 4 h de estímulo (**Anexo IX**). Da mesma forma, os produtos de COX, principalmente as prostaglandinas, são também descritos por seus papéis na regulação da adipogênese. As prostaglandinas são mediadores lipídicos que agem através de receptores específicos. A maioria dos efeitos pró- ou anti-adipogênicos das prostaglandinas são mediados pela modulação da expressão de PPAR $\gamma$  (Fujimori 2012). Além disso, a 15-Deoxi- $\Delta^{12,14}$ -PGJ<sub>2</sub> (15d-PGJ<sub>2</sub>), um metabólito não enzimático de PGD<sub>2</sub> e um prostanóide também pró-adipogênico, é capaz de se ligar diretamente ao PPAR $\gamma$  (Fujimori 2012). Sabidamente, PGD<sub>2</sub> é um mediador pró-adipogênico e PGE<sub>2</sub>, anti-adipogênico (Hu et al. 2016; Fujimori 2012; Lefterova et al. 2014; Christodoulides and Vidal-Puig 2010). De acordo com essa informação, nossos resultados demonstram que há uma redução de PGE<sub>2</sub> a partir do terceiro dia de diferenciação e que a leptina não influencia nos níveis de secreção deste mediador (**Figura 4.8 A**). Em relação aos níveis de secreção de PGD<sub>2</sub>, no entanto, existe um aumento a partir do terceiro dia de diferenciação que decai ao longo da diferenciação nas células controle. Porém,



nas células diferenciadas na presença de 4 nM de leptina a secreção de PGD<sub>2</sub> é mantida em níveis altos até o 17º dia de diferenciação (**Figura 4.8 B**). Portanto, nós mostramos que o tratamento contínuo das células com leptina na dose de 4 nM é capaz de alterar o balanço da secreção de eicosanóides, favorecendo um perfil pró-adipogênico (**Figura 4.8 C**). Com base nisso, nós pretendemos avaliar a participação de PGD<sub>2</sub> nas respostas adipogênicas mediadas por leptina utilizando um inibidor de seus receptores (DP), principalmente nas fases tardias da diferenciação. O mecanismo envolvido no aumento da secreção de um prostanóide (PGD<sub>2</sub>) apesar da diminuição da expressão de COX ainda precisa ser investigado. Possíveis explicações para este fenômeno seriam o aumento da atividade de COX, o aumento da expressão da PGD<sub>2</sub> sintase (PGDS) e/ou do acoplamento entre as duas enzimas.

A questão da leptina como fator pró- ou anti-adipogênico é pouco explorada, com alguns estudos favorecendo a hipótese de que a leptina inibe a adipogênese (Ambati et al. 2010; Thomas et al. 1999) e outros, que induz o processo em células tronco mesenquimais (Holloway et al. 2002; Scheller et al. 2010). Em 1999, Thomas e colaboradores demonstraram que células estromais mesenquimais (ou células tronco mesenquimais) humanas de medula (hMSCs), com capacidade de diferenciação osteogênica e adipogênica, eram preferencialmente diferenciadas em osteoblastos na presença de leptina (Thomas et al. 1999). Contudo, um dos pontos questionáveis do trabalho de Thomas e cols. é a utilização de células hMSCs imortalizadas condicionalmente: eles inseriram nas células um gene mutante sensível à temperatura. Desta forma, quando as células eram mantidas em determinada temperatura, permaneciam em seu estágio indiferenciado. Não é possível avaliar se a modificação genética destas células pode ter influenciado outros genes e a capacidade de diferenciação uma vez que os autores não fazem controles com células não modificadas. Outra diferença importante em relação a este trabalho é a utilização de doses extremamente altas de leptina: os autores chegam a ver efeitos com 160 nM de leptina. Esta dose corresponde a 2400 ng/mL, cerca de 24 vezes a concentração geralmente observada no plasma de pacientes obesos (Maffei et al. 1995). Em vários dos ensaios realizados no trabalho de Thomas e cols, a dose administrada foi a de 40 nM. Apesar de utilizarmos um modelo diferente dos autores (3T3-L1 *versus* hMSCs), as doses usadas por Thomas e cols podem realmente ser muito altas para influenciar de forma importante a adipogênese de acordo com os nossos resultados, uma vez que já vemos sinalização de leptina e efeitos nos adipócitos com doses correspondentes a 0,1% da dose utilizada pelos autores na maioria dos ensaios (0,64 *versus* 600 ng/mL). De forma interessante, nós observamos que os efeitos do tratamento com a dose de 40 nM de leptina foi semelhante aos controles em diversos aspectos, como na expressão de PLIN1 e COX-2 e na indução da secreção de PGD<sub>2</sub>. A supressão dos efeitos da leptina com doses altas de leptina pode ser correlacionado a um

aumento da expressão de proteínas responsáveis por controlar sua sinalização. Duas dessas proteínas são a SOCS3 e a PTP-1B. A SOCS3 pode reduzir a sinalização de leptina em vários níveis, incluindo a inibição de quinases, bloqueio do acesso de STAT3 aos sítios do receptor e indução da ubiquitinação de proteínas da via (Howard et al. 2004). A PTP-1B é uma fosfatase cuja expressão é induzida pela sinalização de leptina e insulina e sua atividade é importante para o controle de ambas. Ela desfosforila proteínas importantes das vias, como IRS1/2 e JAK2 (Berthou et al. 2011). Portanto, será interessante avaliar a expressão/atividade dessas proteínas para determinar se elas fazem parte dos efeitos observados no nosso trabalho com a dose de 40 nM de leptina. Nós observamos efeitos da leptina em doses muito baixas, como as doses de 0,04 e 0,4 nM, correspondentes a 0,64 e 6,4 ng/mL, respectivamente. Tais efeitos foram verificados em relação à expressão de proteínas de gotas lipídicas PLIN1, PLIN2 e CAV-1 (dados mostrados para PLIN2 na **Figura 4.5 A**) bem como na fosforilação de proteínas das vias de leptina (**Figura 4.3**). Além de ter sido a dose que modulou o maior número de parâmetros avaliados, a dose ótima escolhida (4 nM) corresponde a 300 vezes os níveis de leptina secretados pelas células 3T3-L1 diferenciadas. Desta forma, podemos excluir a possível interferência da leptina endógena nos resultados obtidos. Cada vez mais estudos vêm corroborando nossos resultados e mostrando a leptina como fator pró-adipogênico em células precursoras. Por exemplo, os grupos de Geoffrey Nicholson e Paul Krebsbach mostraram a inibição da osteogênese e indução da adipogênese por leptina (Holloway et al. 2002; Scheller et al. 2010). Em 2016, Yue e colaboradores elegantemente demonstraram, através da deleção condicional do gene *Lepr* (receptor de leptina) em MSCs de medula, que a leptina endógena agia induzindo a adipogênese em detrimento da osteogênese *in vivo*. Os autores também correlacionam a diferenciação adipocítica das células à dieta, demonstrando que uma dieta hipercalórica reduzia o volume ósseo e aumentava o número de adipócitos na medula óssea e que isso era, ao menos em parte, mediado pela sinalização através de LepR (Yue et al. 2016).

Para confirmar os efeitos da leptina nos adipócitos através de seu receptor LepRb, nós avaliamos a fosforilação de proteínas classicamente ativadas por leptina: JAK2, AKT e S6K. JAK2 é a primeira proteína fosforilada depois do receptor na via JAK2/STAT3 ativada por leptina. Nós observamos que adipócitos maduros estimulados por 20 mins com leptina em todas as doses avaliadas (0,4, 4 e 40 nM) têm aumento da fosforilação de JAK2. Além disso, também avaliamos AKT e S6K, proteínas ativadas por leptina através da via de PI3K. Novamente, o estímulo agudo com todas as doses avaliadas de leptina induziu um aumento da fosforilação das duas proteínas em adipócitos maduros. Nós não observamos aumento da fosforilação de JAK2 quando os adipócitos foram estimulados por 20 mins com leptina na presença do antagonista do receptor de leptina (LTM), o que reforça que a leptina está sinalizando através

de seu receptor LepRb em adipócitos (**Figura 4.3**). Curiosamente, nós não identificamos fosforilação de JAK2 e AKT em pré-adipócitos estimulados por 20 mins (**Figura 4.3 A**). Apesar disto, o tratamento destas células com leptina induz modificações evidentes, o que sugere que a leptina deve ativar proteínas de outras vias em pré-adipócitos, ou ainda, com outros tempos de estímulo. Uma possibilidade é de que as ações da leptina em pré-adipócitos sejam mediadas pela via de mTOR, que ainda deve ser investigada.

A via de mTOR é importante para processos de síntese proteica e proliferação celular (Fazolini et al. 2015; Haissaguerre, Saucisse, and Cota 2014). mTOR é uma proteína sensível a nutrientes e, portanto, é ativada quando os níveis energéticos da célula encontram-se altos. De acordo com isso, a ativação da mTOR hipotalâmica é sabidamente importante para a regulação da ingesta alimentar e gasto energético (Haissaguerre, Saucisse, and Cota 2014; Cota et al. 2006; Lopez et al. 2013). Já foi demonstrado que a ativação de mTOR está envolvida também com a indução da adipogênese (Shan et al. 2016; Wu et al. 2016). Nossos dados demonstraram que a leptina, além de pró-adipogênica, foi capaz de ativar a via de mTOR em adipócitos maduros. Com a inibição da via de mTOR por rapamicina, será possível avaliar se os efeitos pró-adipogênicos da leptina em pré-adipócitos são dependentes desta via periféricamente. De forma importante, a sinalização da leptina via mTOR foi associada pelo nosso grupo com a ativação de macrófagos e indução de gotas lipídicas em macrófagos e em células epiteliais intestinais (Maya-Monteiro et al. 2008; Fazolini et al. 2015). Além disso, o estímulo da via de PI3K/AKT/mTOR por leptina é fortemente relacionado à progressão de tumores, uma vez que induz proliferação, migração e sobrevivência das células (Lopez et al. 2013; L. Wang et al. 2015). Estes dados mostram que mTOR é uma proteína essencial para a regulação de vários processos metabólicos e um importante alvo para os estudos dos efeitos da leptina.

Semelhante à leptina, a insulina também é capaz de ativar JAK2 e PI3K/AKT/mTOR (Gual et al. 1998; Varela and Horvath 2012). Em nossos ensaios para avaliar a ativação de vias de sinalização sob o estímulo agudo com leptina, a insulina estava sempre presente no meio de cultura. Será interessante avaliar se a fosforilação das proteínas em questão é diminuída na ausência de insulina e se a leptina é capaz de recuperar total ou parcialmente a ativação destas proteínas. De acordo com nossos dados, a leptina foi capaz de recuperar a adipogênese em células cultivadas na ausência de insulina. Como demonstrado anteriormente, a ativação da via de mTOR por leptina sugere que esta via pode também estar envolvida na substituição de insulina por leptina. De forma semelhante, nosso grupo demonstrou que a leptina era capaz de substituir a insulina em células de epitélio intestinal de ratos (IEC-6), que também necessitam de insulina para sua manutenção e proliferação normais (Fazolini et al. 2015).

A regulação do metabolismo é altamente dependente do tecido adiposo. O excesso ou a falta de massa adiposa decorrentes da obesidade ou lipodistrofia, respectivamente, levam a defeitos no controle do balanço energético, resistência à insulina, intolerância à glicose, dentre outros (Rosen and Spiegelman 2006; Luo and Liu 2016). Em grande parte dos casos, a obesidade é acompanhada por diabetes do tipo 2, de forma que a hiperleptinemia e a hiperinsulinemia acontecem simultaneamente, com consequente perda da sensibilidade à insulina e captação de glicose nos músculos e tecido adiposo (Paniagua 2016; Tian et al. 2014). A relação entre leptina e insulina vem sendo bastante explorada nas últimas décadas. Os dois hormônios participam de processos de indução do metabolismo de glicose e inibição da ingesta alimentar através da regulação do mesmo grupo de neurônios no núcleo ARC do hipotálamo (Varela and Horvath 2012). Além disso, como mencionado anteriormente, os dois hormônios compartilham algumas vias de sinalização. Uma vez que as células 3T3-L1 precisam de insulina para diferenciar, nós avaliamos se a leptina seria capaz de substituir a insulina neste processo. Nós observamos que na ausência dos dois hormônios há uma drástica diminuição da adipogênese, consistente com o modelo *in vivo* de lipodistrofia causada pela deleção do receptor de insulina no tecido adiposo branco (Boucher et al. 2016). Utilizando um modelo semelhante, recentemente o grupo de Ronald Kahn demonstrou que camundongos com silenciamento condicional de IR e IGF1R (receptor de fator de crescimento semelhante à insulina) nos adipócitos desenvolviam lipodistrofia com redução dos níveis de leptina, resistência à insulina, hiperglicemia e hiperinsulinemia. Os autores mostraram ainda que a administração de leptina a estes camundongos foi capaz de reverter toda a síndrome metabólica associada à redução da sinalização de insulina (Sakaguchi et al. 2017), evidenciando uma forte correspondência entre as sinalizações de insulina e leptina *in vivo*. De fato, nós observamos que quando as células são tratadas somente com leptina, a diferenciação é retomada e prossegue normalmente mesmo na ausência de insulina, o que sugere que os efeitos da leptina em pré-adipócitos e adipócitos mimetizam os efeitos lipogênicos da insulina no tecido adiposo. No entanto, esses dados devem ser confirmados inclusive em adipócitos diferenciados a partir de células primárias do tecido adiposo de camundongos e pacientes obesos. Além disso, a aplicação desta abordagem em células primárias obtidas de pacientes obesos com ou sem diabetes tipo 2, pode contribuir para a caracterização de uma possível função compensatória da leptina na indução da adipogênese em indivíduos com resistência à insulina.

Uma das alterações observadas durante a obesidade e diabetes do tipo 2 é a redução da expressão de GLUT4 (E Carvalho et al. 2001; Shepherd and Kahn 1999) – transportador de glicose cuja translocação para a membrana celular é dependente de insulina. Em 2001, o grupo de Barbara Kahn mostrou que o silenciamento do transportador de glicose GLUT4

especificamente no tecido adiposo gerava camundongos resistentes à insulina, hiperinsulinêmicos e intolerantes à glicose. Curiosamente, estes animais expressavam GLUT4 em níveis normais no músculo, mas a deleção da proteína no tecido adiposo foi suficiente para gerar resistência muscular e hepática à insulina (Abel et al. 2001). Além disso, o mesmo grupo mostrou que a resistência à insulina e diabetes decorrentes da ausência de GLUT4 no músculo (Zisman et al. 2000; J. K. Kim et al. 2001) eram revertidas quando a proteína era superexpressa no tecido adiposo destes animais (Eugenia Carvalho et al. 2005). Isto indica que o tecido adiposo é essencial para o controle da sensibilidade à insulina e utilização da glicose. No nosso modelo, nós observamos papéis convergentes de leptina e insulina na diferenciação de pré-adipócitos. Será interessante avaliar em células MSCs do tecido adiposo se a translocação ou expressão de GLUT4 e a expressão/fosforilação de IRS e IR, são modificadas na presença ou ausência de leptina e insulina. Desta forma será possível avaliar a influência de leptina na captação de glicose e na sinalização de insulina durante toda a adipogênese.

Além das suas funções no metabolismo, a leptina tem papéis importantes em relação ao sistema imune. A ativação de macrófagos (Maya-Monteiro et al. 2008) e o recrutamento de neutrófilos (Souza-Almeida e cols, manuscrito em preparação) mediados por leptina já foram mostrados pelo nosso grupo. Além disso, outros aspectos da interação entre obesidade e sistema imune vêm sendo explorados (Moraes-Vieira et al. 2014; Jitprasertwong et al. 2014; Y.-T. Wang et al. 2016; Ray, Mahata, and De 2016). De forma interessante, no presente trabalho nós mostramos que a leptina também é capaz de induzir um perfil pró-inflamatório em pré-adipócitos e adipócitos, como demonstrado pelo aumento da expressão e secreção de TNF- $\alpha$  nas fases iniciais da adipogênese (**Figura 4.9**). Apesar de TNF- $\alpha$  ser um potente indutor de lipólise e inibidor de PPAR $\gamma$  (Tesz et al. 2007; Luo and Liu 2016; Guilherme et al. 2008), a indução da adipogênese por leptina supera os efeitos lipolíticos de TNF- $\alpha$  em células 3T3-L1. Isto fica evidenciado pelo aumento da expressão de PPAR $\gamma$  e da diferenciação como um todo na presença da leptina. O aumento de TNF- $\alpha$  induzido por leptina pode constituir um mecanismo de regulação da adipogênese e indução da resposta inflamatória mediada por adipócitos. De forma consistente, já foi demonstrado que TNF- $\alpha$  é capaz de reduzir a expressão de PLIN1 e que a superexpressão de PLIN1 em adipócitos foi suficiente para bloquear a lipólise induzida por TNF- $\alpha$  (Greenberg et al. 2011), indicando que a interação entre as duas proteínas é importante para a modulação da lipólise. Para investigar o papel de TNF- $\alpha$  na diferenciação de pré-adipócitos e sua influência na sinalização de leptina, o bloqueio desta citocina ou de seus receptores com o uso de anticorpos se faz necessário.

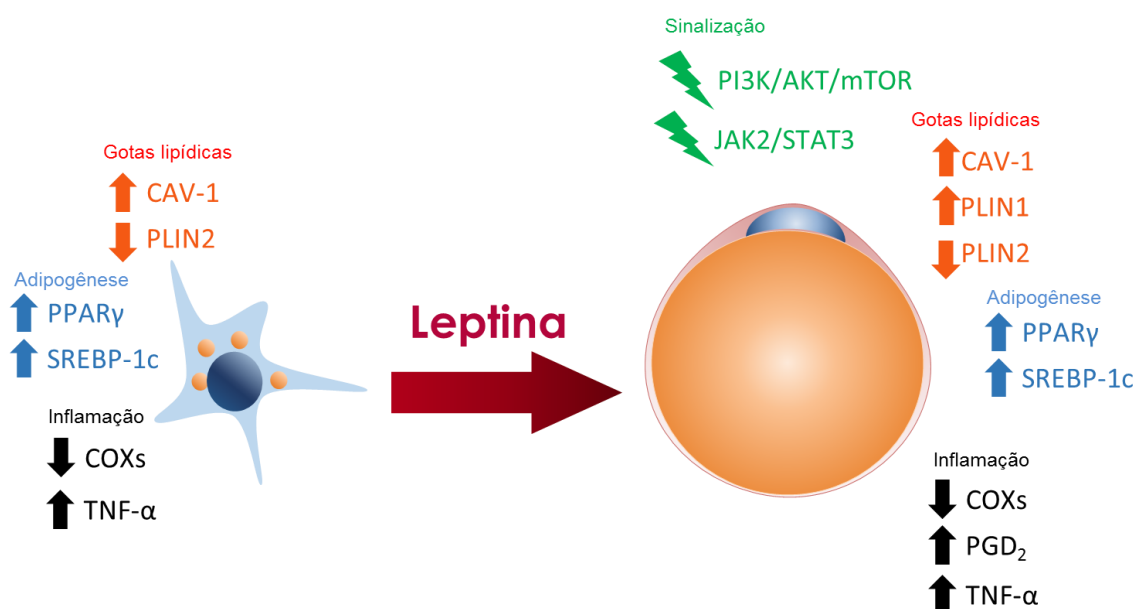
Os dados apresentados nesse trabalho foram obtidos a partir da diferenciação da linhagem murina de pré-adipócitos, a 3T3-L1. É sabido que linhagens celulares apresentam modificações

decorrentes da imortalização e manutenção em cultura, de forma que a confirmação dos principais resultados em células primárias será importante para a compreensão dos efeitos pró-adipogênicos da leptina. O uso da linhagem de pré-adipócitos 3T3-L1 como modelo *in vitro* para estudos sobre tecido adiposo/obesidade é bem estabelecido e amplamente utilizado. Uma das vantagens da linhagem em questão é a menor produção de leptina pelos adipócitos. Desta forma, tornam-se ainda mais evidentes os efeitos da leptina exógena observados. Contudo, na maioria dos trabalhos, as células são diferenciadas por cerca de 8 a 10 dias (Yuan et al. 2016; Y.-T. Wang et al. 2016). Nós mostramos que adipócitos 3T3-L1 diferenciados por 17 dias apresentaram diferenças significativas em relação às células diferenciadas por 10 dias, como evidenciado em todos os parâmetros analisados. Desta forma, a utilização de células em estágios mais tardios do processo de diferenciação parece caracterizar melhor a associação destas células com os adipócitos maduros do tecido.

Em resumo, nossos dados demonstram uma função pró-adipogênica da leptina, pouco explorada na literatura. Embora a função da leptina em relação à adipogênese em células tronco mesenquimais tenha sido estudada por alguns grupos (Ambati et al. 2010; Thomas et al. 1999; Scheller et al. 2010; Holloway et al. 2002), os efeitos da leptina diretamente em pré-adipócitos e adipócitos e sua influência na adipogênese ainda não foram explorados. Nós demonstramos uma função pró-adipogênica da leptina, evidenciada pelo aumento na expressão de proteínas relacionadas a gotas lipídicas e síntese lipídica, além da diminuição de COX-1 e -2 e aumento da secreção de PGD<sub>2</sub>, importante eicosanóide pró-adipogênico. Durante a diferenciação das células 3T3-L1, o tratamento com leptina antecipou várias características que só seriam observadas em estágios mais avançados da diferenciação em células controle. Nós acreditamos que em situações normais, os efeitos da leptina na indução da lipólise via sinalização central estão em equilíbrio com seus efeitos periféricos de indução da adipogênese. Porém, durante a obesidade e síndrome metabólica, devido ao desenvolvimento de resistência central à leptina, é provável que os efeitos periféricos desta adipocina prevaleçam. Portanto, é de extrema importância determinar se a sinalização de leptina em pré-adipócitos e adipócitos continua ocorrendo durante a síndrome metabólica. Nossa observação de que a leptina pode agir substituindo a insulina na indução da adipogênese contribui de forma importante para o entendimento dos mecanismos periféricos que ocorrem na presença da obesidade e diabetes do tipo 2. De modo interessante, nós demonstramos que a leptina também é capaz de induzir um perfil pró-inflamatório em pré-adipócitos e adipócitos através do aumento da expressão e secreção de TNF- $\alpha$ . Estudos envolvendo a diferenciação de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo de pacientes obesos e diabéticos na presença ou ausência de leptina poderão esclarecer o papel fisiológico da leptina localmente em adipócitos.

## 6. Conclusões

O tratamento com leptina no decorrer da diferenciação de células 3T3-L1 levou ao aumento e/ou antecipação de fatores pró-adipogênicos importantes como o PPAR $\gamma$  e o SREBP-1c. De modo consistente, a diferenciação na presença de leptina induziu um aumento das gotas lipídicas em paralelo à antecipação da redução de PLIN2 e ao aumento de PLIN1 e CAV-1. Além disso, o tratamento com leptina modulou a expressão e a atividade de enzimas associadas à produção de eicosanóides, reduzindo a expressão de COX-1 e -2 e aumentando a síntese do mediador pró-adipogênico PGD<sub>2</sub> ao longo da diferenciação. Em adipócitos maduros, a leptina sinaliza via JAK2/STAT3 e PI3K/AKT/mTOR. De modo importante, a leptina parece recuperar a progressão da adipogênese em células diferenciadas na ausência de insulina. Finalmente, a diferenciação na presença de leptina promoveu uma antecipação da síntese e secreção da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$ . Fica evidente que, em células 3T3-L1, o tratamento com leptina antecipa várias características que só seriam observadas em estágios mais diferenciados em células controle. Nossos dados introduzem a leptina como um importante fator pró-adipogênico.



**Figura 6.1. Efeitos pró-adipogênicos da leptina.** A leptina antecipa a adipogênese quando pré-adipócitos 3T3-L1 são diferenciados na presença desta adipocina. A leptina antecipa e/ou aumenta fatores relacionados à adipogênese, como PPAR $\gamma$  e SREBP-1c. Além disso, a leptina modula proteínas relacionadas a gotas lipídicas, antecipando a redução de PLIN2 e o aumento PLIN1 e CAV-1. A expressão de COXs foi reduzida por leptina, apesar do aumento da secreção de PGD<sub>2</sub> nas células tratadas. TNF- $\alpha$ , importante citocina pró-inflamatória, também teve sua expressão e secreção antecipadas pelo tratamento com leptina. Em adipócitos maduros, a leptina foi capaz de ativar seu receptor LepRb e ativar as vias de PI3K/AKT/mTOR e JAK2/STAT3.

## REFERÊNCIAS

- Abel, E D, O Peroni, J K Kim, Y B Kim, O Boss, E Hadro, T Minnemann, G I Shulman, and B B Kahn. 2001. “Adipose-Selective Targeting of the GLUT4 Gene Impairs Insulin Action in Muscle and Liver.” *Nature* 409 (6821): 729–33. doi:10.1038/35055575.
- Accioly, Maria T., Patricia Pacheco, Clarissa M. Maya-Monteiro, Nina Carrossini, Bruno K. Robbs, Silvia S. Oliveira, Cristiane Kaufmann, José A. Morgado-Diaz, Patricia T. Bozza, and João P B Viola. 2008. “Lipid Bodies Are Reservoirs of Cyclooxygenase-2 and Sites of Prostaglandin-E2 Synthesis in Colon Cancer Cells.” *Cancer Research* 68 (6): 1732–40. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-1999.
- Adi, Nikhil, Curtis Perriotte-Olson, Cyrus V. Desouza, Ramesh Ramalingam, and Viswanathan Saraswathi. 2015. “Hematopoietic Cyclooxygenase-2 Deficiency Increases Adipose Tissue Inflammation and Adiposity in Obesity.” *Obesity* 23 (10): 2037–45. doi:10.1002/oby.21184.
- Ambati, Suresh, Qiang Li, Srujana Rayalam, Diane L. Hartzell, Mary Anne Della-Fera, Mark W. Hamrick, and Clifton A. Baile. 2010. “Central Leptin versus Ghrelin: Effects on Bone Marrow Adiposity and Gene Expression.” *Endocrine* 37 (1): 115–23. doi:10.1007/s12020-009-9274-z.
- Amitani, Marie, Akihiro Asakawa, Haruka Amitani, and Akio Inui. 2013. “The Role of Leptin in the Control of Insulin-Glucose Axis.” *Frontiers in Neuroscience* 7 (7 APR): 1–12. doi:10.3389/fnins.2013.00051.
- Araújo-Santos, Théo, Deboraci Brito Prates, Bruno Bezerril Andrade, Danielle Oliveira Nascimento, Jorge Clarêncio, Petter F. Entringer, Alan B. Carneiro, et al. 2010. “Lutzomyia Longipalpis Saliva Triggers Lipid Body Formation and Prostaglandin E2 Production in Murine Macrophages.” *PLoS Neglected Tropical Diseases* 4 (11): 1–9. doi:10.1371/journal.pntd.0000873.
- Arimura, Naoto, Taro Horiba, Masayoshi Imagawa, Makoto Shimizu, and Ryuichiro Sato. 2004. “The Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Regulates Expression of the Perilipin Gene in Adipocytes.” *The Journal of Biological Chemistry* 279 (11): 10070–76. doi:10.1074/jbc.M308522200.
- Bartz, René, John K. Zehmer, Meifang Zhu, Yue Chen, Ginette Serrero, Yingming Zhao, and Pingsheng Liu. 2007. “Dynamic Activity of Lipid Droplets: Protein Phosphorylation and GTP-Mediated Protein Translocation.” *Journal of Proteome Research* 6 (8): 3256–65. doi:10.1021/pr070158j.
- Bell, Andrea, Laura Grunder, and Alexander Sorisky. 2000. “Rapamycin Inhibits Human



- Adipocyte Differentiation in Primary Culture.” *Obesity Research* 8 (3): 249–54.  
doi:10.1038/oby.2000.29.
- Berthou, Flavien, Claude Rouch, Arieh Gertler, Kyriaki Gerozissis, and Mohammed Taouis. 2011. “Chronic Central Leptin Infusion Differently Modulates Brain and Liver Insulin Signaling.” *Molecular and Cellular Endocrinology* 337 (1–2). Elsevier Ireland Ltd: 89–95. doi:10.1016/j.mce.2011.02.005.
- Bickel, Perry E., John T. Tansey, and Michael A Welte. 2009. “PAT Proteins, an Ancient Family of Lipid Droplet Proteins That Regulate Cellular Lipid Stores.” *Biochimica et Biophysica Acta* 1791 (6): 419–40. doi:10.3816/CLM.2009.n.003.Novel.
- Bizeau, ME, and PS MacLean. 2003. “Skeletal Muscle Sterol Regulatory Element Binding Protein-1c Decreases with Food Deprivation and Increases with Feeding in Rats.” *The Journal of Nutrition* 133 (January): 1787–92.  
<http://nutrition.highwire.org/content/133/6/1787.short>.
- Bjorbaek, Christian. 2009. “Central Leptin Receptor Action and Resistance in Obesity.” *J Investig Med* 57 (7): 789–94. doi:10.231/JIM.0b013e3181bb0d49.Central.
- Bjørnbæk, Christian, Shigeo Uotani, Barbara Da Silva, and Jeffrey S. Flier. 1997. “Divergent Signaling Capacities of the Long and Short Isoforms of the Leptin Receptor.” *Journal of Biological Chemistry* 272 (51): 32686–95. doi:10.1074/jbc.272.51.32686.
- Blanquer-Rosselló, M. Mar, Francisca M. Santandreu, Jordi Oliver, Pilar Roca, and Adamo Valle. 2015. “Leptin Modulates Mitochondrial Function, Dynamics and Biogenesis in MCF-7 Cells.” *Journal of Cellular Biochemistry* 116 (9): 2039–48.  
doi:10.1002/jcb.25158.
- Boden, Guenther, Carol Homko, Maria Mozzoli, Louise C. Showe, Calen Nichols, and Peter Cheung. 2005. “Thiazolidinediones Upregulate Fatty Acid Uptake and Oxidation in Adipose Tissue of Diabetic Patients.” *Diabetes* 54 (3): 880–85.  
doi:10.2337/diabetes.54.3.880.
- Boucher, Jeremie, Samir Softic, Abdelfattah El Ouaamari, Megan T. Krumpoch, Andre Kleinridders, Rohit N. Kulkarni, Brian T. O’Neill, and C. Ronald Kahn. 2016. “Differential Roles of Insulin and IGF-1 Receptors in Adipose Tissue Development and Function.” *Diabetes* 65 (8): 2201–13. doi:10.2337/db16-0212.
- Bouzakri, Karim, and Juleen R. Zierath. 2007. “MAP4K4 Gene Silencing in Human Skeletal Muscle Prevents Tumor Necrosis Factor-Alpha-Induced Insulin Resistance.” *Journal of Biological Chemistry* 282 (11): 7783–89. doi:10.1074/jbc.M608602200.
- Brasaemle, D L, T Barber, N E Wolins, G Serrero, E J Blanchette-Mackie, and C Londos. 1997. “Adipose Differentiation-Related Protein Is an Ubiquitously Expressed Lipid

- Storage Droplet-Associated Protein.” *Journal of Lipid Research* 38 (11): 2249–63.
- Brasaemle, Dawn L. 2007. “The Perilipin Family of Structural Lipid Droplet Proteins: Stabilization of Lipid Droplets and Control of Lipolysis.” *Journal of Lipid Research* 48 (12): 2547–59. doi:10.1194/jlr.R700014-JLR200.
- Bullwinkle, Erica M., Melissa D. Parker, Nicole F. Bonan, Lauren G. Falkenberg, Steven P. Davison, and Kathleen L. DeCicco-Skinner. 2016. “Adipocytes Contribute to the Growth and Progression of Multiple Myeloma: Unraveling Obesity Related Differences in Adipocyte Signaling.” *Cancer Letters* 380 (1). Elsevier Ireland Ltd: 114–21. doi:10.1016/j.canlet.2016.06.010.
- Carvalho, E, P A Jansson, I Nagaev, A M Wentzel, and U Smith. 2001. “Insulin Resistance with Low Cellular IRS-1 Expression Is Also Associated with Low GLUT4 Expression and Impaired Insulin-Stimulated Glucose Transport.” *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15 (6): 1101–3. doi:10.1096/fj.00-0435fje.
- Carvalho, Eugenia, Ko Kotani, Odile D Peroni, and Barbara B Kahn. 2005. “Adipose-Specific Overexpression of GLUT4 Reverses Insulin Resistance and Diabetes in Mice Lacking GLUT4 Selectively in Muscle.” *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 289 (4): E551–61. doi:10.1152/ajpendo.00116.2005.
- Chan, Pei Chi, Fone Ching Hsiao, Hao Ming Chang, Martin Wabitsch, and Po Shiuan Hsieh. 2016. “Importance of Adipocyte Cyclooxygenase-2 and Prostaglandin E2-Prostaglandin E Receptor 3 Signaling in the Development of Obesity-Induced Adipose Tissue Inflammation and Insulin Resistance.” *FASEB Journal* 30 (6): 2282–97. doi:10.1096/fj.201500127.
- Chen, Shu Fen, Jun Yang Liou, Tai Yu Huang, Yu Sin Lin, Ai Ling Yeh, Kabik Tam, Tsung Huang Tsai, Kenneth K. Wu, and Song Kun Shyue. 2010. “Caveolin-1 Facilitates Cyclooxygenase-2 Protein Degradation.” *Journal of Cellular Biochemistry* 109 (2): 356–62. doi:10.1002/jcb.22407.
- Christodoulides, Constantinos, and Antonio Vidal-Puig. 2010. “PPARs and Adipocyte Function.” *Molecular and Cellular Endocrinology* 318 (1–2): 61–68. doi:10.1016/j.mce.2009.09.014.
- Chu, Xiaoqing, Kohji Nishimura, Mitsuo Jisaka, Tsutomu Nagaya, Fumiaki Shono, and Kazushige Yokota. 2010. “Up-Regulation of Adipogenesis in Adipocytes Expressing Stably Cyclooxygenase-2 in the Antisense Direction.” *Prostaglandins and Other Lipid Mediators* 91 (1–2): 1–9. doi:10.1016/j.prostaglandins.2009.10.002.
- Chu, Xiaoqing, Li Xu, Kohji Nishimura, Mitsuo Jisaka, Tsutomu Nagaya, Fumiaki Shono,

- and Kazushige Yokota. 2009. "Suppression of Adipogenesis Program in Cultured Preadipocytes Transfected Stably with Cyclooxygenase Isoforms." *Biochimica et Biophysica Acta* 1791 (4). Elsevier B.V.: 273–80. doi:10.1016/j.bbali.2009.01.022.
- Codenotti, Silvia, Marika Vezzoli, Pietro Luigi Poliani, Manuela Cominelli, Federica Bono, Hadi Kabbout, Fiorella Faggi, et al. 2016. "Caveolin-1, Caveolin-2 and Cavin-1 Are Strong Predictors of Adipogenic Differentiation in Human Tumors and Cell Lines of Liposarcoma." *European Journal of Cell Biology* 95 (8). Elsevier GmbH.: 252–64. doi:10.1016/j.ejcb.2016.04.005.
- Cohen, AW Alex W AW, Babak Razani, Xiao Bo Wang, Terry P Combs, Terence M Williams, Philipp E Scherer, and Michael P Lisanti. 2003. "Caveolin-1-Deficient Mice Show Insulin Resistance and Defective Insulin Receptor Protein Expression in Adipose Tissue." *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 285 (1): C222-35. doi:10.1152/ajpcell.00006.2003.
- Coleman, D L. 1978. "Obese and Diabetes: Two Mutant Genes Causing Diabetes-Obesity Syndromes in Mice." *Diabetologia* 14 (3): 141–48. doi:10.1007/BF00429772.
- Commerford, S Renee, Li Peng, John J Dube, Robert M O Doherty, S Renee, Li Peng, John J Dube, and M Robert. 2004. "In Vivo Regulation of SREBP-1c in Skeletal Muscle : Effects of Nutritional Status , Glucose , Insulin , and Leptin" 15261: 218–27.
- Coope, Andressa, Marciane Milanski, Eliana P. Araújo, Marcos Tambascia, Mário J A Saad, Bruno Geloneze, and Lício A. Velloso. 2008. "AdipoR1 Mediates the Anorexigenic and Insulin/leptin-like Actions of Adiponectin in the Hypothalamus." *FEBS Letters* 582 (10): 1471–76. doi:10.1016/j.febslet.2008.03.037.
- Cota, Daniela, Karine Proulx, Kathi A. Blake Smith, Sara C. Kozma, George Thomas, Stephen C. Woods, and Randy J. Seeley. 2006. "Hypothalamic mTOR Signaling Regulates Food Intake." *Science* 312 (5775): 927–30. doi:10.1002/9780470114735.hawley00624.
- Dalen, K T, K Schoonjans, S M Ulven, M S Weedon-Fekjaer, T G Bentzen, H Koutnikova, J Auwerx, and H I Nebb. 2004. "Adipose Tissue Expression of the Lipid Droplet Associating Proteins S3-12 and Perilipin Is Controlled by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma." *Diabetes* 53 (4): 1243–52. doi:10.2337/diabetes.53.5.1243.
- Denroche, Heather C., Maria M. Glavas, Eva Tudur??, Subashini Karunakaran, Whitney L. Quong, Marion Philippe, Heidi M. Britton, Susanne M. Clee, and Timothy J. Kieffer. 2016. "Disrupted Leptin Signaling in the Lateral Hypothalamus and Ventral Premammillary Nucleus Alters Insulin and Glucagon Secretion and Protects against Diet-Induced Obesity." *Endocrinology* 157 (7): 2671–85. doi:10.1210/en.2015-1998.

- Eberlé, Delphine, Bronwyn Hegarty, Pascale Bossard, Pascal Ferré, and Fabienne Fougère. 2004. "SREBP Transcription Factors: Master Regulators of Lipid Homeostasis." *Biochimie* 86 (11): 839–48. doi:10.1016/j.biochi.2004.09.018.
- Egans, J, Andrew S Greenberg, Min-Kun Chang, and Constantine Londos. 1990. "Control of Endogenous Phosphorylation Protein Kinase Substrate in Adipocytes Stimulation of the Major CAMP-Dependent by Insulin and." *The Journal of Biological Chemistry* 265 (31): 18769–75.
- El-Masry, Omar, Kaltoom Al-Sakkaf, Barry Brown, and Pauline Dobson. 2015. "Differential Crosstalk between the AMPK and PI3K/Akt Pathways in Breast Cancer Cells of Differing Genotypes: Leptin Inhibits the Effectiveness of AMPK Activation." *Oncology Reports*, no. 17: 1675–80. doi:10.3892/or.2015.4198.
- Enriori, Pablo J., Anne E. Evans, Puspha Sinnayah, Erin E. Jobst, Luciana Tonelli-Lemos, Sonja K. Billes, Maria M. Glavas, et al. 2007. "Diet-Induced Obesity Causes Severe but Reversible Leptin Resistance in Arcuate Melanocortin Neurons." *Cell Metabolism* 5 (3): 181–94. doi:10.1016/j.cmet.2007.02.004.
- Fajas, Lluís, Stephanie Miard, Michael R Briggs, and Johan Auwerx. 2003. "Selective Cyclo-Oxygenase-2 Inhibitors Impair Adipocyte Differentiation through Inhibition of the Clonal Expansion Phase." *Journal of Lipid Research* 44 (9): 1652–59. doi:10.1194/jlr.M300248-JLR200.
- Fazolini, Narayana P B, André L S Cruz, Miriam B F Werneck, João P B Viol, Clarissa M. Maya-Monteiro, and Patrícia T. Bozza. 2015. "Leptin Activation of mTOR Pathway in Intestinal Epithelial Cell Triggers Lipid Droplet Formation, Cytokine Production and Increased Cell Proliferation." *Cell Cycle* 14 (16): 2667–76. doi:10.1080/15384101.2015.1041684.
- Feingold, Kenneth R., Mahmood R. Kazemi, Amy L. Magra, Carol M. McDonald, Lisa G. Chui, Judy K. Shigenaga, Sophie M. Patzek, Zoe W. Chan, Constantine Londos, and Carl Grunfeld. 2010. "ADRP/ADFP and Mall Expression Are Increased in Macrophages Treated with TLR Agonists." *Atherosclerosis* 209 (1): 81–88. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2009.08.042.
- Fujimori, Ko. 2012. "Prostaglandins as PPAR $\gamma$  Modulators in Adipogenesis." *PPAR Research* 2012 (January): 527607. doi:10.1155/2012/527607.
- Fujitani, Yasushi, Kosuke Aritake, Yoshihide Kanaoka, Tsuyoshi Goto, Nobuyuki Takahashi, Ko Fujimori, and Teruo Kawada. 2010. "Pronounced Adipogenesis and Increased Insulin Sensitivity Caused by Overproduction of Prostaglandin D<sub>2</sub> in Vivo." *FEBS Journal* 277 (6): 1410–19. doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07565.x.

- Gamber, Kevin M., Lihong Huo, Sangdeuk Ha, Joyce E. Hairston, Sarah Greeley, and Christian Bjørnbæk. 2012. "Over-Expression of Leptin Receptors in Hypothalamic POMC Neurons Increases Susceptibility to Diet-Induced Obesity." *PLoS ONE* 7 (1): 1–14. doi:10.1371/journal.pone.0030485.
- Gartung, Allison, Jiawei Zhao, Simon Chen, Emilio Mottillo, Garrett C. VanHecke, Young Hoon Ahn, Krishna Rao Maddipati, Andrey Sorokin, James Granneman, and Menq Jer Lee. 2016. "Characterization of Eicosanoids Produced by Adipocyte Lipolysis: Implication of Cyclooxygenase-2 in Adipose Inflammation." *Journal of Biological Chemistry* 291 (31): 16001–10. doi:10.1074/jbc.M116.725937.
- Gonçalves, Gabriel H M, Wenjing Li, Adriana V Garcia, Mariana S Figueiredo, and Christian Bjorbaek. 2014. "Hypothalamic AgRP Neurons and the Central Melanocortin System Are Crucial Mediators of Leptin's Anti-Diabetic Actions." *Cell Reports* 7 (4): 1093–1103. doi:10.1001/jamasurg.2014.1086.Feasibility.
- Greenberg, Andrew S., John J. Egan, Sheree A. Wek, Nira B. Garty, E. Joan Blanchette-Mackie, and Constantine Londos. 1991. "Perilipin, a Major Hormonally Regulated Adipocyte-Specific Phosphoprotein Associated with the Periphery of Lipid Storage Droplets." *Journal of Biological Chemistry* 266 (17): 11341–46.
- Greenberg, Andrew S, Rosalind A Coleman, Fredric B Kraemer, James L Mcmanaman, Martin S Obin, Vishwajeet Puri, Qing-wu Yan, Hideaki Miyoshi, and Douglas G Mashek. 2011. "The Role of Lipid Droplets in Metabolic Disease in Rodents and Humans." *The Journal of Clinical Investigation* 121 (6): 2102–10. doi:10.1172/JCI46069.2102.
- Gual, Philippe, Véronique Baron, Valérie Lequoy, and Emmanuel Van Obberghen. 1998. "Interaction of Janus Kinases JAK-1 and JAK-2 with the Insulin Receptor and the Insulin-like Growth Factor-1 Receptor." *Endocrinology* 139 (3): 884–93. doi:10.1210/en.139.3.884.
- Guilherme, Adilson, Joseph V Virbasius, Puri Vishwajeet, and Michael P Czech. 2008. "Adipocyte Dysfunctions Linking Obesity to Insulin Resistance and Type 2 Diabetes." *Nature Reviews Molecular ...* 9 (5): 367–77. doi:10.1038/nrm2391.Adipocyte.
- Haissaguerre, Magalie, Nicolas Saucisse, and Daniela Cota. 2014. "Influence of mTOR in Energy and Metabolic Homeostasis." *Molecular and Cellular Endocrinology* 397 (1–2). Elsevier Ireland Ltd: 67–77. doi:10.1016/j.mce.2014.07.015.
- Heid, Hans, Steffen Rickelt, Ralf Zimbelmann, Stefanie Winter, Heiderose Schumacher, Yvette Dörflinger, Caecilia Kuhn, and Werner W. Franke. 2014. "On the Formation of Lipid Droplets in Human Adipocytes: The Organization of the Perilipin-Vimentin

- Cortex.” *PLoS ONE* 9 (2). doi:10.1371/journal.pone.0090386.
- Hellmann, J., M. J. Zhang, Y. Tang, M. Rane, A. Bhatnagar, and M. Spite. 2013. “Increased Saturated Fatty Acids in Obesity Alter Resolution of Inflammation in Part by Stimulating Prostaglandin Production.” *The Journal of Immunology* 191 (3): 1383–92. doi:10.4049/jimmunol.1203369.
- Hetherington, AW, and SW Ranson. 1940. “Hypothalamic Lesions and Adiposity in the Rat.” *The Anatomical Record* 78 (2): 149–72. doi:10.1002/ar.1090780203.
- Holloway, Wayne R, Fiona McL Collier, Cathy J Aitken, Damian E Myers, Jason M Hodge, Mary Malakellis, Tamara J Gough, Gregory R Collier, and Geoffrey C Nicholson. 2002. “Leptin Inhibits Osteoclast Generation.” *Journal of Bone and Mineral Research*. 17 (2): 200–209. doi:10.1359/jbmr.2002.17.2.200.
- Hotamisligil, Gokhan S. 2006. “Inflammation and Metabolic Disorders.” *Nature* 444 (7121): 860–67. doi:10.1038/nature05485.
- Howard, Jane K, Belinda J Cave, Laura J Oksanen, Iphigenia Tzamelis, Christian Bjørnbæk, and Jeffrey S Flier. 2004. “Enhanced Leptin Sensitivity and Attenuation of Diet-Induced Obesity in Mice with Haploinsufficiency of Socs3.” *Nature Medicine* 10 (7): 734–38. doi:10.1038/nm1072.
- Hu, Xiaoqian, Vincenza Cifarelli, Shishuo Sun, Ondrej Kuda, Nada A. Abumrad, and Xiong Su. 2016. “Major Role of Adipocyte Prostaglandin E<sub>2</sub> in Lipolysis-Induced Macrophage Recruitment.” *Journal of Lipid Research* 57 (4): 663–73. doi:10.1194/jlr.M066530.
- Hummel, K. P., M. M. Dickie, and D. L. Coleman. 1966. “Diabetes, a New Mutation in the Mouse.” *Science* 153 (3740): 1127–28. doi:10.1126/science.153.3740.1127.
- Ingalls, A. M., M. M. Dickie, and G. D. Snell. 1950. “Obese, a New Mutation in the House Mouse.” *The Journal of Heredity* 41: 317–18.
- Jandl, Katharina, Elvira Stacher, Zoltán Bálint, Eva Maria Sturm, Jovana Maric, Miriam Peinhaupt, Petra Luschnig, et al. 2016. “Activated Prostaglandin D2 Receptors on Macrophages Enhance Neutrophil Recruitment into the Lung.” *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 137 (3): 833–43. doi:10.1016/j.jaci.2015.11.012.
- Jasmin, Jean-François François, Isabelle Mercier, Federica Sotgia, and Michael P. Lisanti. 2006. “SOCS Proteins and Caveolin-1 as Negative Regulators of Endocrine Signaling.” *Trends in Endocrinology and Metabolism* 17 (4): 150–58. doi:10.1016/j.tem.2006.03.007.
- Jeffery, Elise, Christopher D Church, Brandon Holtrup, Laura Colman, and Matthew S Rodeheffer. 2015. “Rapid Depot-Specific Activation of Adipocyte Precursor Cells at the Onset of Obesity.” *Nature Cell Biology* 17 (4): 376–85. doi:10.1038/ncb3122.

- Jitprasertwong, Paiboon, Katrin M. Jaedicke, Christopher J. Nile, Philip M. Preshaw, and John J. Taylor. 2014. "Leptin Enhances the Secretion of Interleukin (IL)-18, but Not IL-1 $\beta$ , from Human Monocytes via Activation of Caspase-1." *Cytokine* 65 (2). Elsevier Ltd: 222–30. doi:10.1016/j.cyto.2013.10.008.
- Kang, Yu, Shi Hengbo, Luo Jun, Li Jun, Zhao Wangsheng, Tian Huibin, and Shi Huaiping. 2014. "PPARG Modulated Lipid Accumulation in Dairy GMEC via Regulation of ADRP Gene." *Journal of Cellular Biochemistry*, no. August 2014 (August). doi:10.1002/jcb.24958.
- Kennedy, G C. 1953. "The Role of Depot Fat in the Hypothalamic Control of Food Intake in the Rat." *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 140 (901): 578–92. doi:10.1098/rspb.1953.0009.
- Khan, Ferdous, Pinky Karim Syeda, Michael Nii N. Nartey, Mohammad Shahidur Rahman, Mohammad Safiqul Islam, Kohji Nishimura, Mitsuo Jisaka, Fumiaki Shono, and Kazushige Yokota. 2016. "Stimulation of Fat Storage by Prostacyclin and Selective Agonists of Prostanoid IP Receptor during the Maturation Phase of Cultured Adipocytes." *Cytotechnology* 68 (6). Springer Netherlands: 2417–29. doi:10.1007/s10616-016-9960-7.
- Kim, J. K., A. Zisman, J. J. Fillmore, O. D. Peroni, K. Kotani, P. Perret, H. Zong, et al. 2001. "Glucose Toxicity and the Development of Diabetes in Mice with Muscle-Specific Inactivation of glut4." *Journal of Clinical Investigation* 108 (1): 153–60. doi:10.1172/JCI200110294.
- Kim, J B, P Sarraf, M Wright, K M Yao, E Mueller, G Solanes, B B Lowell, and B M Spiegelman. 1998. "Nutritional and Insulin Regulation of Fatty Acid Synthetase and Leptin Gene Expression through ADD1/SREBP1." *The Journal of Clinical Investigation* 101 (1): 1–9. doi:10.1172/JCI1411.
- Kimmel, Alan R, Dawn L Brasaemle, Monica McAndrews-Hill, Carole Sztalryd, and Constantine Londos. 2010. "Adoption of PERILIPIN as a Unifying Nomenclature for the Mammalian PAT-Family of Intracellular Lipid Storage Droplet Proteins." *Journal of Lipid Research* 51 (3): 468–71. doi:10.1194/jlr.R000034.
- Koch, Christiane E., Chrishanthi Lowe, Karen Legler, Jonas Benzler, Alisa Boucsein, Gregor Böttiger, David R. Grattan, Lynda M. Williams, and Alexander Tups. 2014. "Central Adiponectin Acutely Improves Glucose Tolerance in Male Mice." *Endocrinology* 155 (5): 1806–16. doi:10.1210/en.2013-1734.
- Kwon, Obin, Ki Woo Kim, and Min Seon Kim. 2016. "Leptin Signalling Pathways in Hypothalamic Neurons." *Cellular and Molecular Life Sciences* 73 (7). Springer

- International Publishing: 1457–77. doi:10.1007/s00018-016-2133-1.
- Lefterova, Martina I., Anders K. Haakonsson, Mitchell A. Lazar, and Susanne Mandrup. 2014. “PPAR $\gamma$  and the Global Map of Adipogenesis and beyond.” *Trends in Endocrinology and Metabolism* 25 (6): 293–302. doi:10.1016/j.tem.2014.04.001.
- Lopez, Rebecca, Arunkumar Arumugam, Riya Joseph, Kanika Monga, Thiyagarajan Boopalan, Pamela Agullo, Christina Gutierrez, et al. 2013. “Hyperglycemia Enhances the Proliferation of Non-Tumorigenic and Malignant Mammary Epithelial Cells through Increased leptin/IGF1R Signaling and Activation of AKT/mTOR.” *PLoS ONE* 8 (11). doi:10.1371/journal.pone.0079708.
- Luo, Liping, and Meilian Liu. 2016. “Adipose Tissue in Control of Metabolism.” *Journal of Endocrinology* 231 (3): R77–99. doi:10.1530/JOE-16-0211.
- Maffei, M, J Halaas, E Ravussin, R E Pratley, G H Lee, Y Zhang, H Fei, S Kim, R Lallone, and S Ranganathan. 1995. “Leptin Levels in Human and Rodent: Measurement of Plasma Leptin and Ob RNA in Obese and Weight-Reduced Subjects.” *Nature Medicine* 1 (11): 1155–61. doi:10.1038/nm1195-1155.
- Mattos, Katherine A, Heloisa D ’avila, Luciana S Rodrigues, Viviane G C Oliveira, Euzenir N Sarno, Georgia C Atella, Geraldo M Pereira, Patricia T Bozza, Maria Cristina, and V Pessolani. 2010. “Lipid Droplet Formation in Leprosy: Toll-like Receptor-Regulated Organelles Involved in Eicosanoid Formation and Mycobacterium Leprae Pathogenesis.” *J. Leukoc. Biol* 87 (March): 371–84. doi:10.1189/jlb.0609433.
- Maury, E., and S. M. Brichard. 2010. “Adipokine Dysregulation, Adipose Tissue Inflammation and Metabolic Syndrome.” *Molecular and Cellular Endocrinology* 314 (1): 1–16. doi:10.1016/j.mce.2009.07.031.
- Maya-Monteiro, Clarissa M., Patricia E. Almeida, Heloisa D’Avila, Aline S. Martins, Ana Paula Rezende, Hugo Castro-Faria-Neto, Patricia T. Bozza, et al. 2008. “Leptin Induces Macrophage Lipid Body Formation by a Phosphatidylinositol 3-Kinase- and Mammalian Target of Rapamycin-Dependent Mechanism.” *Journal of Biological Chemistry* 283 (4): 2203–10. doi:10.1074/jbc.M706706200.
- Maya-Monteiro, Clarissa M., and Patricia T. Bozza. 2008. “Leptin and mTOR: Partners in Metabolism and Inflammation.” *Cell Cycle* 7 (12): 1713–17. doi:10.4161/cc.7.12.6157.
- McManaman, James L, Elise S Bales, David J Orlicky, Matthew Jackman, Paul S MacLean, Shannon Cain, Amanda E Crunk, et al. 2013. “Perilipin-2-Null Mice Are Protected against Diet-Induced Obesity, Adipose Inflammation, and Fatty Liver Disease.” *Journal of Lipid Research* 54 (5): 1346–59. doi:10.1194/jlr.M035063.
- Ministério da Saúde. 2015. “Vigilância de Fatores de Risco E Proteção Para Doenças



- Crônicas Por Inquérito Telefônico (VIGITEL) Brasil 2014.”  
<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/abril/15/PPT-Vigitel-2014-.pdf>.
- Moraes-Vieira, Pedro M M, Rafael A Larocca, Enio J Bassi, Jean Pierre S Peron, Vinícius Andrade-Oliveira, Frederick Wasinski, Ronaldo Araujo, et al. 2014. “Leptin Deficiency Impairs Maturation of Dendritic Cells and Enhances Induction of Regulatory T and Th17 Cells.” *Eur J Immunol* 44 (3): 794–806. doi:10.1002/eji.201343592.Leptin.
- Münzberg, Heike, Jeffrey S. Flier, and Christian Bjørnbæk. 2004. “Region-Specific Leptin Resistance within the Hypothalamus of Diet-Induced Obese Mice.” *Endocrinology* 145 (11): 4880–89. doi:10.1210/en.2004-0726.
- Nawrocki, Andrea R., Michael W. Rajala, Eva Tomas, Utpal B. Pajvani, Asish K. Saha, Myrna E. Trumbauer, Zhen Pang, et al. 2006. “Mice Lacking Adiponectin Show Decreased Hepatic Insulin Sensitivity and Reduced Responsiveness to Peroxisome Proliferator-Activated Receptor ?? Agonists.” *Journal of Biological Chemistry* 281 (5): 2654–60. doi:10.1074/jbc.M505311200.
- Niwa, Yasuharu, Hiroaki Kanda, Yuko Shikauchi, Akio Saiura, Kenichi Matsubara, Tomoyuki Kitagawa, Junji Yamamoto, Takahiko Kubo, and Hirohide Yoshikawa. 2005. “Methylation Silencing of SOCS-3 Promotes Cell Growth and Migration by Enhancing JAK/STAT and FAK Signalings in Human Hepatocellular Carcinoma.” *Oncogene* 24 (42): 6406–17. doi:10.1038/sj.onc.1208788.
- Odegaard, Ji, Rr Ricardo-Gonzalez, Matthew H. Goforth, Christine R. Morel, Vidya Subramanian, Lata Mukundan, Alex Red Eagle, et al. 2007. “Macrophage-Specific PPAR $\gamma$  Controls Alternative Activation and Improves Insulin Resistance.” *Nature* 447 (7148): 1116–20. doi:10.1038/nature05894.Macrophage-specific.
- OMS. 2016. “Obesity and Overweight.”  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>.
- Paniagua, Juan Antonio. 2016. “Nutrition, Insulin Resistance and Dysfunctional Adipose Tissue Determine the Different Components of Metabolic Syndrome.” *World Journal of Diabetes* 7 (19): 483–514. doi:10.4239/wjd.v7.i19.483.
- Park, David S, Hyangkyu Lee, Philippe G Frank, Babak Razani, Andrew V Nguyen, Albert F Parlow, Robert G Russell, James Hulit, Richard G Pestell, and Michael P Lisanti. 2002. “Caveolin-1-Deficient Mice Show Accelerated Mammary Gland Development During Pregnancy, Premature Lactation, and Hyperactivation of the Jak-2/STAT5a Signaling Cascade.” *Mol Biol Cell* 13 (8): 3416–30. doi:10.1091/mbc.02.
- Pilch, Paul F., and Libin Liu. 2011. “Fat Caves: Caveolae, Lipid Trafficking and Lipid Metabolism in Adipocytes.” *Trends in Endocrinology and Metabolism* 22 (8). Elsevier

Ltd: 318–24. doi:10.1016/j.tem.2011.04.001.

- Pol, Albert, Sally Martin, Manuel A Fernandez, Charles Ferguson, Amanda Carozzi, Robert Luetterforst, Carlos Enrich, Robert G Parton, and Parto. 2004. “Dynamic and Regulated Association of Caveolin with Lipid Bodies: Modulation of Lipid Body Motility and Function by a Dominant Negative Mutant.” *Molecular Biology of the Cell* 15 (April): 99–110. doi:10.1091/mbc.E03.
- Rahman, Mohammad Sharifur, Pinky Karim Syeda, Ferdous Khan, Kohji Nishimura, Mitsuo Jisaka, Tsutomu Nagaya, Fumiaki Shono, and Kazushige Yokota. 2013. “Cultured Preadipocytes Undergoing Stable Transfection with Cyclooxygenase-1 in the Antisense Direction Accelerate Adipogenesis during the Maturation Phase of Adipocytes.” *Applied Biochemistry and Biotechnology* 171 (1): 128–44. doi:10.1007/s12010-013-0347-3.
- Ray, Indrani, Sushil K. Mahata, and Rajat K. De. 2016. “Obesity: An Immunometabolic Perspective.” *Frontiers in Endocrinology* 7 (December): 1–9. doi:10.3389/fendo.2016.00157.
- Razani, B, J A Engelman, X B Wang, W Schubert, X L Zhang, C B Marks, F Macaluso, et al. 2001. “Caveolin-1 Null Mice Are Viable, but Show Evidence of Hyper- Proliferative and Vascular Abnormalities.” *J Biol Chem* 16 (718): 16. doi:10.1074/jbc.M105408200.
- Razani, B, a Schlegel, J Liu, and M P Lisanti. 2001. “Caveolin-1, a Putative Tumour Suppressor Gene.” *Biochemical Society Transactions* 29 (Pt 4): 494–99. doi:10.1042/BST0290494.
- Rosen, Evan D, and Bruce M Spiegelman. 2006. “Adipocytes as Regulators of Energy Balance and Glucose Homeostasis.” *Nature* 444 (7121): 847–53. doi:10.1038/nature05483.
- Sakaguchi, Masaji, Shiho Fujisaka, Weikang Cai, Jonathon N. Winnay, Masahiro Konishi, Brian T. O’Neill, Mengyao Li, et al. 2017. “Adipocyte Dynamics and Reversible Metabolic Syndrome in Mice with an Inducible Adipocyte-Specific Deletion of the Insulin Receptor.” *Cell Metabolism* 25: 1–15. doi:10.1016/j.cmet.2016.12.008.
- Scheller, Erica L., Junhui Song, Michael I. Dishowitz, Fabiana Naomi Soki, Kurt D. Hankenson, and Paul H. Krebsbach. 2010. “Leptin Functions Peripherally to Regulate Differentiation of Mesenchymal Progenitor Cells.” *Stem Cells* 28 (6): 1071–80. doi:10.1002/stem.432.
- Shan, Tizhong, Pengpeng Zhang, Qinyang Jiang, Yan Xiong, Yizhen Wang, and Shihuan Kuang. 2016. “Adipocyte-Specific Deletion of mTOR Inhibits Adipose Tissue Development and Causes Insulin Resistance in Mice.” *Diabetologia* 59 (9). Diabetologia: 1995–2004. doi:10.1007/s00125-016-4006-4.

- Shepherd, Peter R, and Barbara B Kahn. 1999. "Glucose Transporters and Insulin Action - Implications for Insulin Resistance and Diabetes Mellitus." *New England Journal of Medicine* 341 (4): 248–57. doi:10.1056/NEJM199907223410406.
- Siersbaek, M. S., A. Loft, M. M. Aagaard, R. Nielsen, S. F. Schmidt, N. Petrovic, J. Nedergaard, and S. Mandrup. 2012. "Genome-Wide Profiling of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor in Primary Epididymal, Inguinal, and Brown Adipocytes Reveals Depot-Selective Binding Correlated with Gene Expression." *Molecular and Cellular Biology* 32 (17): 3452–63. doi:10.1128/MCB.00526-12.
- Silva, Adriana R., Patricia Pacheco, Adriana Vieira-de-Abreu, Clarissa M. Maya-Monteiro, Barbara D'Alegria, Kelly G. Magalhães, Edson F. de Assis, Christianne Bandeira-Melo, Hugo C. Castro-Faria-Neto, and Patricia T. Bozza. 2009. "Lipid Bodies in Oxidized LDL-Induced Foam Cells Are Leukotriene-Synthesizing Organelles: A MCP-1/CCL2 Regulated Phenomenon." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1791 (11). Elsevier B.V.: 1066–75. doi:10.1016/j.bbailip.2009.06.004.
- Spalding, Kirsty L, Erik Arner, Pål O Westermark, Samuel Bernard, Bruce A Buchholz, Olaf Bergmann, Lennart Blomqvist, et al. 2008. "Dynamics of Fat Cell Turnover in Humans." *Nature* 453 (7196): 783–87. doi:10.1038/nature06902.
- Stewart, William C, Ron F Morrison, Sherry L Young, and Jacqueline M Stephens. 1999. "Regulation of Signal Transducers and Activators of Transcription ( STATs ) by Effectors of Adipogenesis: Coordinate Regulation of STATs 1 , 5A , and 5B with Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Q and C / AAAT Enhancer Binding Protein-K." *Life Sciences* 1452: 188–96.
- Sutherland, Kate D, Geoffrey J Lindeman, David Y H Choong, Sergio Wittlin, Luci Brentzell, Wayne Phillips, Ian G Campbell, and Jane E Visvader. 2004. "Differential Hypermethylation of SOCS Genes in Ovarian and Breast Carcinomas." *Oncogene* 23 (46): 7726–33. doi:10.1038/sj.onc.1207787.
- Takahashi, Yu, Akihiro Shinoda, Norihiko Furuya, Eri Harada, Naoto Arimura, Ikuyo Ichi, Yoko Fujiwara, Jun Inoue, and Ryuichiro Sato. 2013. "Perilipin-Mediated Lipid Droplet Formation in Adipocytes Promotes Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1 Processing and Triacylglyceride Accumulation." *PloS One* 8 (5): e64605. doi:10.1371/journal.pone.0064605.
- Tanaka, T, N Yoshida, T Kishimoto, and S Akira. 1997. "Defective Adipocyte Differentiation in Mice Lacking the C/EBPbeta And/or C/EBPdelta Gene." *The EMBO Journal* 16 (24): 7432–43. doi:10.1093/emboj/16.24.7432.
- Tang, Xiaoqing, Adilson Guilherme, Abhijit Chakladar, Aimee M Powelka, Silvana Konda,

- Joseph V Virbasius, Sarah M C Nicoloso, Juerg Straubhaar, and Michael P Czech. 2006. “An RNA Interference-Based Screen Identifies MAP4K4/NIK as a Negative Regulator of PPARgamma, Adipogenesis, and Insulin-Responsive Hexose Transport.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (7): 2087–92. doi:10.1073/pnas.0507660103.
- Tesz, Gregory J, Adilson Guilherme, Kalyani V P Guntur, Andrea C Hubbard, Xiaoqing Tang, Anil Chawla, and Michael P Czech. 2007. “Tumor Necrosis Factor-Alpha (TNF-Alpha) Stimulates Map4k4 Expression through TNF-Alpha Receptor 1 Signaling to c-Jun and Activating Transcription Factor 2.” *The Journal of Biological Chemistry* 282 (27): 19302–12. doi:10.1074/jbc.M700665200.
- Thomas, Thierry, Francesca Gori, Sundeep Khosla, Michael D. Jensen, Bartolome Burguera, and B. Lawrence Riggs. 1999. “Leptin Acts on Human Marrow Stromal Cells to Enhance Differentiation to Osteoblasts and to Inhibit Differentiation to Adipocytes.” *Endocrinology* 140 (4): 1630–38. doi:10.1210/endo.140.4.6637.
- Tian, Yu Feng, Wei Chen Chang, Ching Hui Loh, and Po Shiuan Hsieh. 2014. “Leptin-Mediated Inflammatory Signaling Crucially Links Visceral Fat Inflammation to Obesity-Associated  $\beta$ -Cell Dysfunction.” *Life Sciences* 116 (1). Elsevier Inc.: 51–58. doi:10.1016/j.lfs.2014.07.039.
- Toledo, Daniel A M, Natália R. Roque, Lúcia Teixeira, Erix A. Miln-Garcés, Alan B. Carneiro, Mariana R. Almeida, Gustavo F S Andrade, et al. 2016. “Lipid Body Organelles within the Parasite Trypanosoma Cruzi: A Role for Intracellular Arachidonic Acid Metabolism.” *PLoS ONE* 11 (8): 1–22. doi:10.1371/journal.pone.0160433.
- Tomas, Eva, Tsu-Shuen Tsao, Asish K Saha, Heather E Murrey, Cheng Cheng Zhang Cc, Samar I Itani, Harvey F Lodish, and Neil B Ruderman. 2002. “Enhanced Muscle Fat Oxidation and Glucose Transport by ACRP30 Globular Domain: Acetyl-CoA Carboxylase Inhibition and AMP-Activated Protein Kinase Activation.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (25): 16309–13. doi:10.1073/pnas.222657499.
- Tontonoz, Peter, and Bruce M Spiegelman. 2008. “Fat and beyond: The Diverse Biology of PPARgamma.” *Annual Review of Biochemistry* 77: 289–312. doi:10.1146/annurev.biochem.77.061307.091829.
- Varela, Luis, and Tamas L Horvath. 2012. “Leptin and Insulin Pathways in POMC and AgRP Neurons That Modulate Energy Balance and Glucose Homeostasis.” *EMBO Reports* 13 (12). Nature Publishing Group: 1079–86. doi:10.1038/embor.2012.174.
- Virtue, S, M Masoodi, B a M de Weijer, M van Eijk, C Y L Mok, M Eiden, M Dale, et al.

2015. “Prostaglandin Profiling Reveals a Role for Haematopoietic Prostaglandin D Synthase in Adipose Tissue Macrophage Polarisation in Mice and Humans.” *International Journal of Obesity (2005)* 39 (7): 1151–60. doi:10.1038/ijo.2015.34.
- Wang, Lin, Cuiping Tang, Hong Cao, Kuangfa Li, Xueli Pang, Liang Zhong, Weiqi Dang, et al. 2015. “Activation of IL-8 via PI3K/Akt-Dependent Pathway Is Involved in Leptin-Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition in Human Breast Cancer Cells.” *Cancer Biology & Therapy* 16 (8): 1220–30. doi:10.1080/15384047.2015.1056409.
- Wang, Yi-Ting, Hou-Hsien Chiang, Ying-Shing Huang, Chia-Lang Hsu, Po-Jen Yang, Hsueh-Fen Juan, and Wei-Shiung Yang. 2016. “A Link between Adipogenesis and Innate Immunity: RNase-L Promotes 3T3-L1 Adipogenesis by Destabilizing Pref-1 mRNA.” *Cell Death and Disease* 7 (11). Nature Publishing Group: e2458. doi:10.1038/cddis.2016.323.
- Weber, Anette, Ulrich R Hengge, Walter Bardenheuer, Iris Tischoff, Florian Sommerer, Annett Markwarth, Andreas Dietz, Christian Wittekind, and Andrea Tannapfel. 2005. “SOCS-3 Is Frequently Methylated in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma and Its Precursor Lesions and Causes Growth Inhibition.” *Oncogene* 24 (44): 6699–6708. doi:10.1038/sj.onc.1208818.
- Wei, Lan, Kuangfa Li, Xueli Pang, Bianqin Guo, Min Su, Yunxiu Huang, Nian Wang, et al. 2016. “Leptin Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition of Breast Cancer via the Upregulation of Pyruvate Kinase M2.” *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 35 (1). Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: 166. doi:10.1186/s13046-016-0446-4.
- White, Ursula A., and Jacqueline M. Stephens. 2010. “Transcriptional Factors That Promote Formation of White Adipose Tissue.” *Molecular and Cellular Endocrinology* 318 (1–2): 10–14. doi:10.1016/j.mce.2009.08.023.
- Wolins, Nathan E., Dawn L. Brasaemle, and Perry E. Bickel. 2006. “A Proposed Model of Fat Packaging by Exchangeable Lipid Droplet Proteins.” *FEBS Letters* 580 (23): 5484–91. doi:10.1016/j.febslet.2006.08.040.
- Wolins, Nathan E., Benjamin K. Quaynor, James R. Skinner, Anatoly Tzekov, Michelle A. Croce, Matthew C. Gropler, Vijayalakshmi Varma, et al. 2006. “OXPAT/PAT-1 Is a PPAR-Induced Lipid Droplet Protein That Promotes Fatty Acid Utilization.” *Diabetes* 55 (12): 3418–28. doi:10.2337/db06-0399.
- Woodward, David F, Jenny W Wang, Ming Ni, Alex Bauer, Jose L Martos, Robert W Carling, and Neil J Poloso. 2016. “In Vivo Studies Validating Multitargeting of Prostanoid Receptors for Achieving Superior Anti-Inflammatory Effects.” *FASEB*

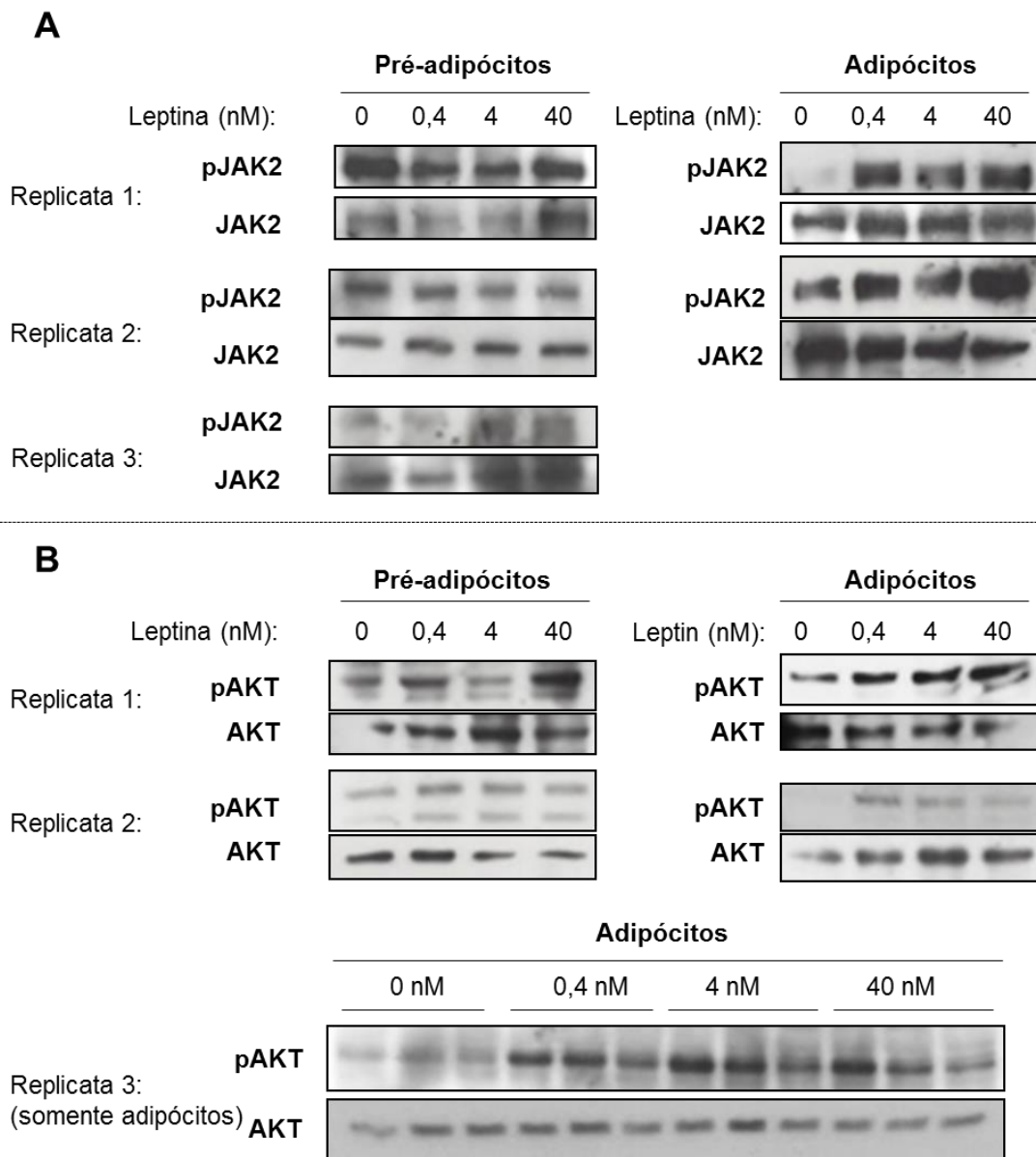
*Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, no. 1. doi:10.1096/fj.201600604R.

- Wu, Xuanye, Nils Schneider, Alina Platen, Indranil Mitra, Matthias Blazek, and Matthias Meier. 2016. "In Situ Characterization of the mTORC1 during Adipogenesis of Human Adult Stem Cells on Chip." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 4143–50. doi:10.1073/pnas.1601207113.
- Yamaguchi, Tomohiro, Naoto Omatsu, Asami Omukae, and Takashi Osumi. 2006. "Analysis of Interaction Partners for Perilipin and ADRP on Lipid Droplets." *Molecular and Cellular Biochemistry* 284 (1–2): 167–73. doi:10.1007/s11010-005-9045-y.
- Yamamoto, Manabu, Yoshiyuki Toya, Michael P Lisanti, G Martin, Yoshihiro Ishikawa, Carsten Schwencke, and Martin G Myers. 1998. "Caveolin Is an Activator of Insulin Receptor Signaling Caveolin Is an Activator of Insulin Receptor Signaling." *Journal of Biological Chemistry* 273 (41): 26962–68.
- Yan, Hongyun, Abdenaim Kermouni, Mohammed Abdel-Hafez, and David C W Lau. 2003. "Role of Cyclooxygenases COX-1 and COX-2 in Modulating Adipogenesis in 3T3-L1 Cells." *Journal of Lipid Research* 44 (2): 424–29. doi:10.1194/jlr.M200357-JLR200.
- Yuan, Yanyan, Yang Xi, Jiayi Chen, Pan Zhu, Jinyu Kang, Zuquan Zou, Fuyan Wang, and Shizhong Bu. 2016. "STAT3 Stimulates Adipogenic Stem Cell Proliferation and Cooperates with HMGA2 during the Early Stage of Differentiation to Promote Adipogenesis." *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.bbrc.2016.12.042.
- Yue, Rui, Bo O. Zhou, Issei S. Shimada, Zhiyu Zhao, and Sean J. Morrison. 2016. "Leptin Receptor Promotes Adipogenesis and Reduces Osteogenesis by Regulating Mesenchymal Stromal Cells in Adult Bone Marrow." *Cell Stem Cell* 18 (6). Elsevier Inc.: 782–96. doi:10.1016/j.stem.2016.02.015.
- Zeng, Wenwen, Roksana M. Pirzgalska, Mafalda M A Pereira, Nadiya Kubasova, Andreia Barateiro, Elsa Seixas, Yi Hsueh Lu, et al. 2015. "Sympathetic Neuro-Adipose Connections Mediate Leptin-Driven Lipolysis." *Cell* 163 (1). Elsevier Inc.: 84–94. doi:10.1016/j.cell.2015.08.055.
- Zhang, Yiyang, Ricardo Proenca, Margherita Maffei, Marisa Barone, Lori Leopold, and Jeffrey M Friedman. 1994. "Positional Cloning of the Mouse Obese Gene and Its Human Homologue." *Nature* 372: 425–32.
- Zhou, Yi, Xueqing Yu, Huimei Chen, Sara Sjöberg, Joséphine Roux, Lijun Zhang, Al Habib Ivoulsou, et al. 2015. "Leptin Deficiency Shifts Mast Cells toward Anti-Inflammatory Actions and Protects Mice from Obesity and Diabetes by Polarizing M2 Macrophages."

*Cell Metabolism* 22 (6): 1045–58. doi:10.1016/j.cmet.2015.09.013.

- Zisman, A, O D Peroni, E D Abel, M D Michael, F Mauvais-Jarvis, B B Lowell, J F Wojtaszewski, et al. 2000. “Targeted Disruption of the Glucose Transporter 4 Selectively in Muscle Causes Insulin Resistance and Glucose Intolerance.” *Nature Medicine* 6 (8): 924–28. doi:10.1038/78693.
- Zuo, Ying, Li Qiang, and Stephen R. Farmer. 2006. “Activation of CCAAT/enhancer-Binding Protein (C/EBP) Alpha Expression by C/EBP Beta during Adipogenesis Requires a Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma-Associated Repression of HDAC1 at the C/ebp?? Gene Promoter.” *Journal of Biological Chemistry* 281 (12): 7960–67. doi:10.1074/jbc.M510682200.

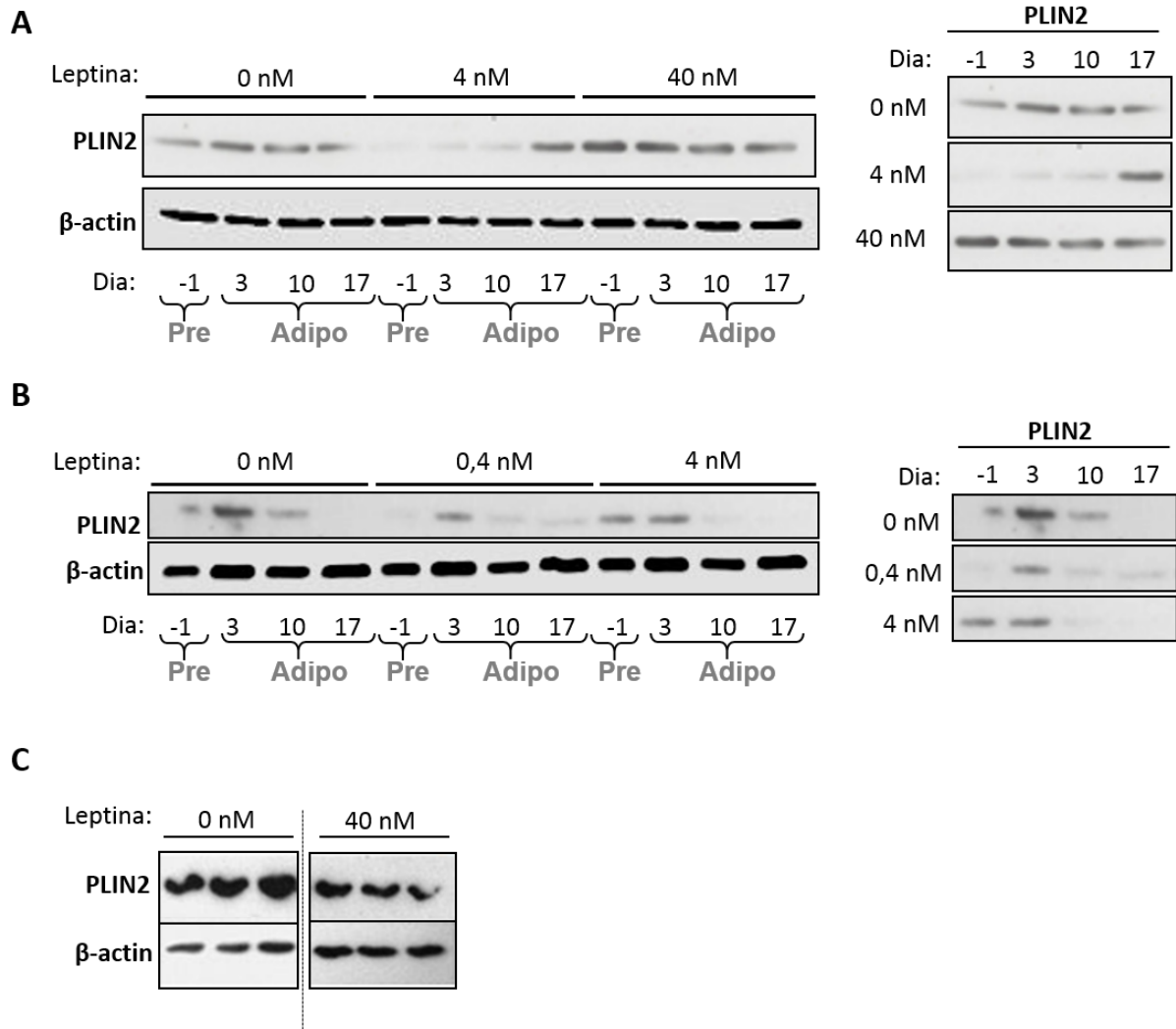
## ANEXO I



**Anexo I. Leptina ativa JAK2 e AKT em adipócitos.** Células 3T3-L1 com -1 (pré-adipócitos) e 17 (adipócitos) dias de diferenciação foram estimuladas por 20 mins com leptina nas doses de 0,4; 4 e 40 nM e a fosforilação de JAK2 (**A**) e AKT (**B**) foi avaliada por *Western blot*. Replicatas representam experimentos independentes.



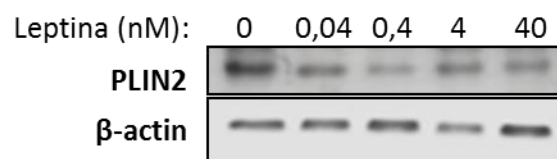
## ANEXO II



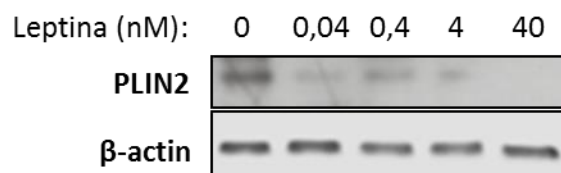
**Anexo II. Redução de PLIN2 por leptina ao longo da adipogênese.** As células 3T3-L1 foram diferenciadas por -1, 3, 10 e 17 dias com as doses de 0,4; 4 ou 40 nM e a expressão de PLIN2 foi avaliada (A) e (B). Os painéis da direita nas figuras (A) e (B) representam recortes dos respectivos painéis da esquerda. A figura (B) representa as mesmas amostras aplicadas no gel da **Figura 4.5 A**, porém com orientação diferente e somente com as doses de 0,4 e 4 nM. A figura (C) mostra a expressão de PLIN2 em adipócitos maduros em triplicata, frente à diferenciação com leptina na dose de 40 nM. As seis bandas não são contínuas, porém estão presentes no mesmo gel. As figuras representam experimentos independentes.

### ANEXO III

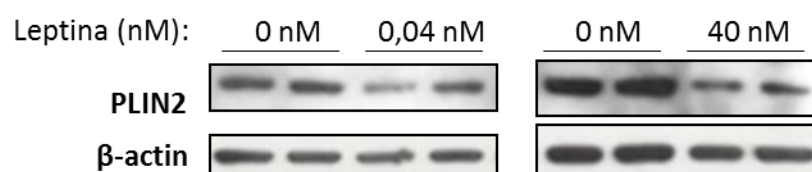
**A**



**B**

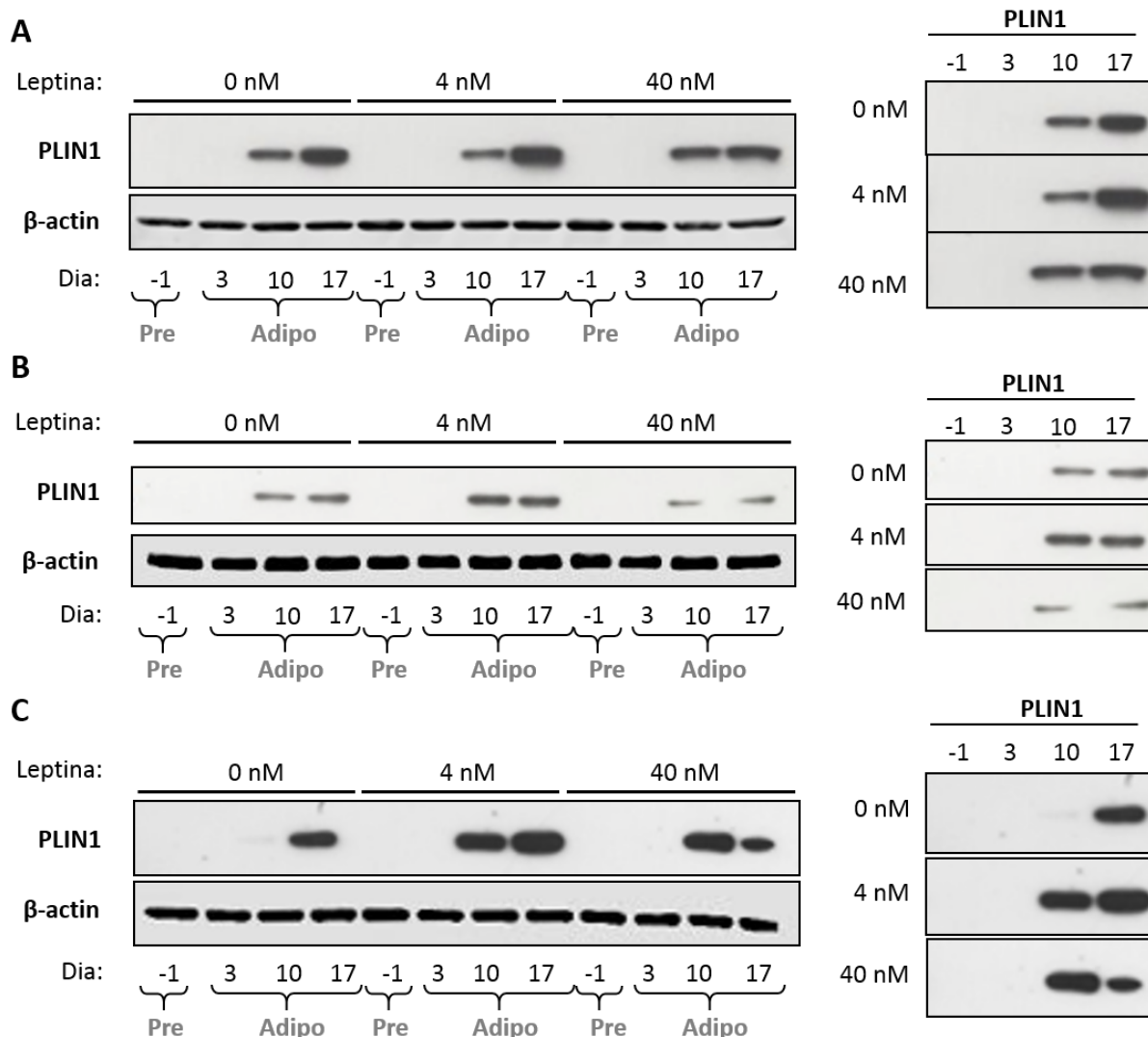


**C**



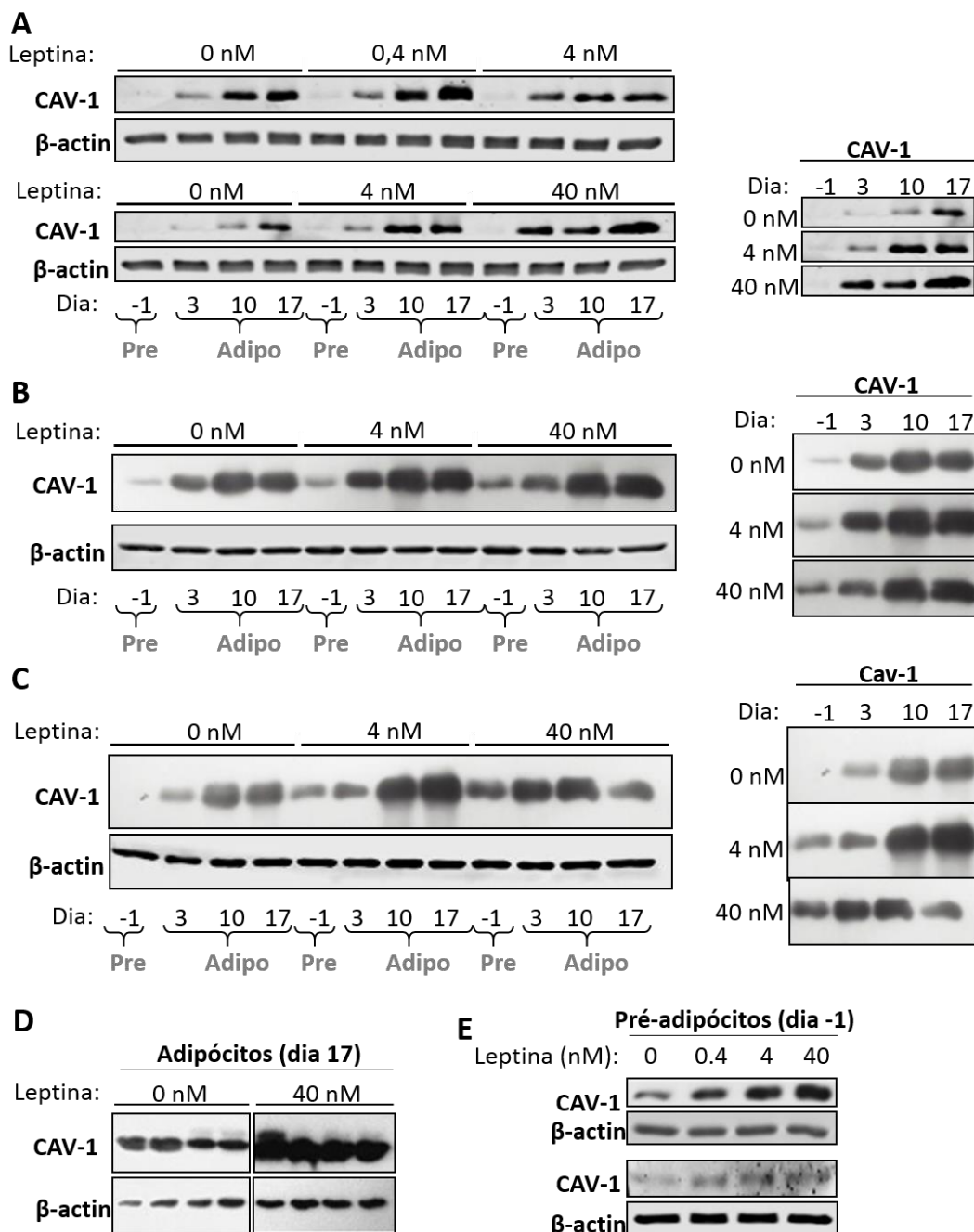
**Anexo III. Leptina diminui expressão de PLIN2 em pré-adipócitos. (A – C)** Análise por *Western blot* da expressão de PLIN2 em pré-adipócitos (dia -1) tratados por 48 h com leptina nas doses de 0,04; 0,4; 4 e 40 nM. Cada painel representa um experimento independente.

## ANEXO IV



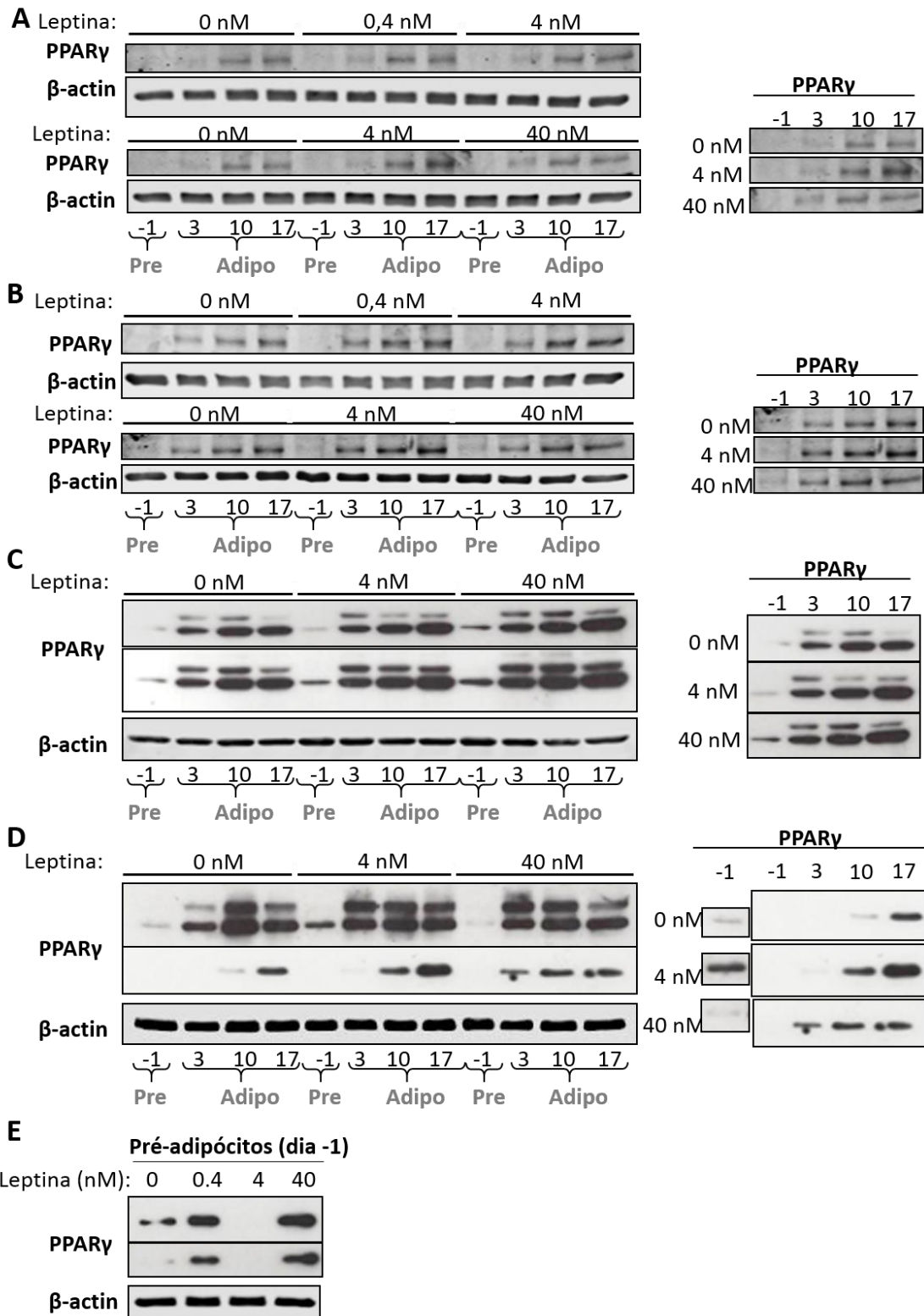
**Anexo IV. Leptina aumenta a expressão de PLIN1 em fases tardias da adipogênese.** Análise por *Western blot* da expressão de PLIN1 ao longo da diferenciação em células 3T3-L1 diferenciadas na presença de leptina nas doses de 4 e 40 nM por -1, 3, 10 e 17 dias. Cada painel representa um experimento independente.

## ANEXO V



**Anexo V. Leptina aumenta caveolina-1 em pré-adipócitos e adipócitos.** Análises de *Western blot* para CAV-1 de células diferenciadas na presença de leptina nas doses de 0; 0,4 e 40 nM por -1, 3, 10 e 17 dias (A – C). O painel D representa um experimento em quadruplicata no qual a expressão de CAV-1 foi avaliada quando adipócitos maduros (17 dias) foram diferenciados na presença de leptina na dose de 40 nM. As oito bandas não são contínuas, porém estão presentes no mesmo gel. Cada painel representa um experimento independente. O painel E mostra a expressão de CAV-1 em 2 experimentos independentes quando pré-adipócitos (dia -1) foram tratados por 48 h com leptina nas doses de 0,4; 4 e 40 nM.

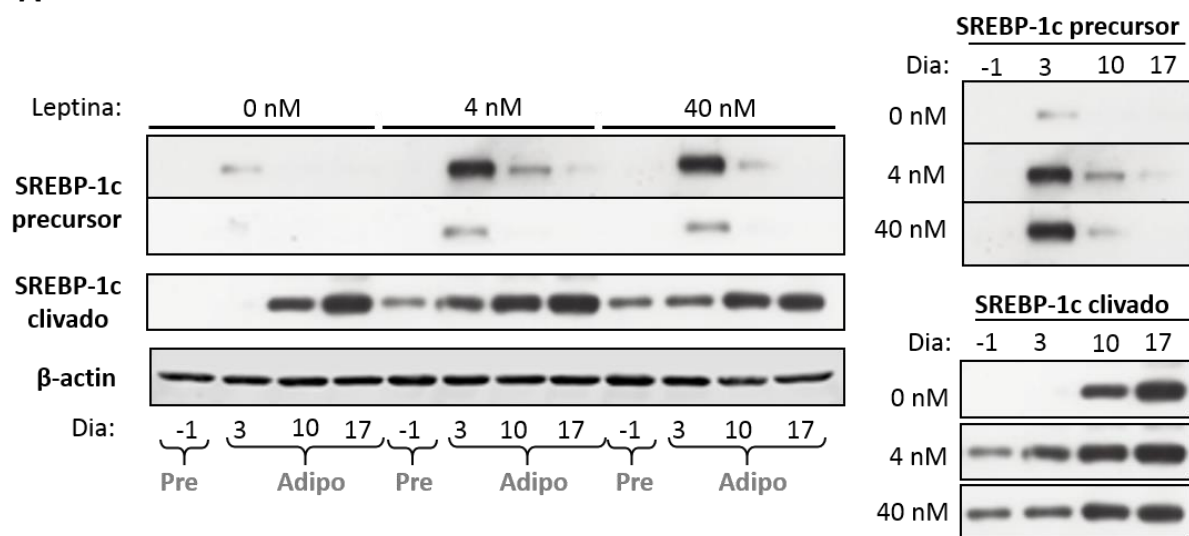
## ANEXO VI



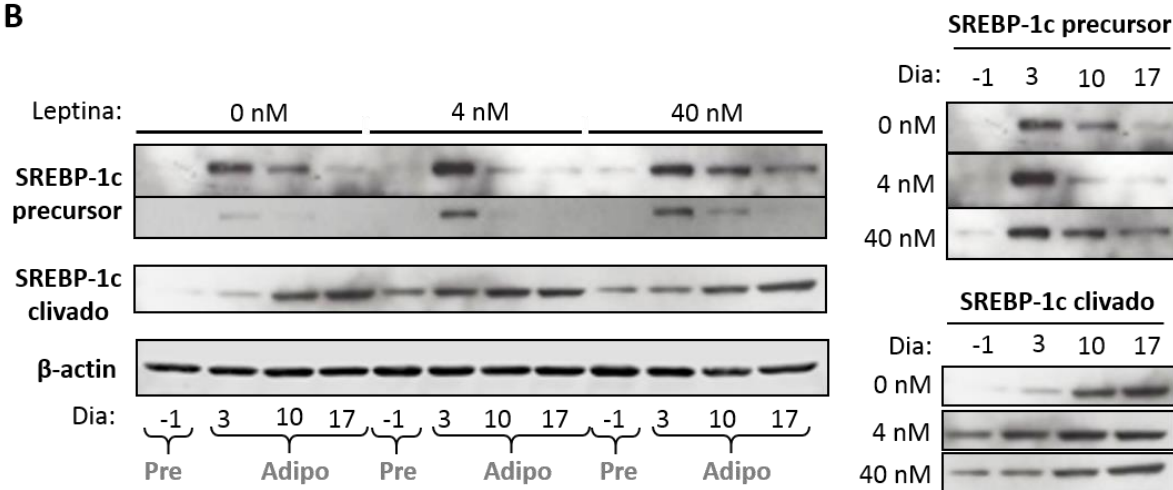
**Anexo VI. Leptina aumenta PPAR $\gamma$  em pré-adipócitos e adipócitos.** Análises de *Western blot* para PPAR $\gamma$  de células diferenciadas na presença de leptina nas doses de 0,4; 4 e 40 nM por -1, 3, 10 e 17 dias (A – D). O painel E mostra a expressão de PPAR $\gamma$  avaliada quando pré-adipócitos (dia -1) foram tratados com leptina nas doses de 0,4; 4 e 40 nM. Cada painel representa um experimento independente.

## ANEXO VII

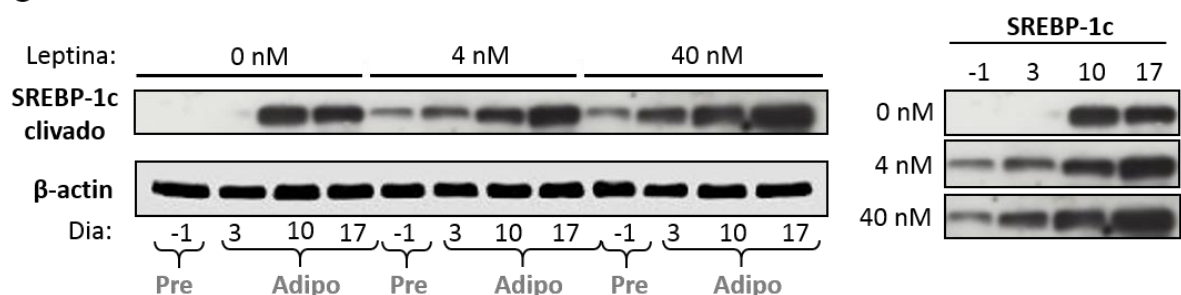
**A**



**B**

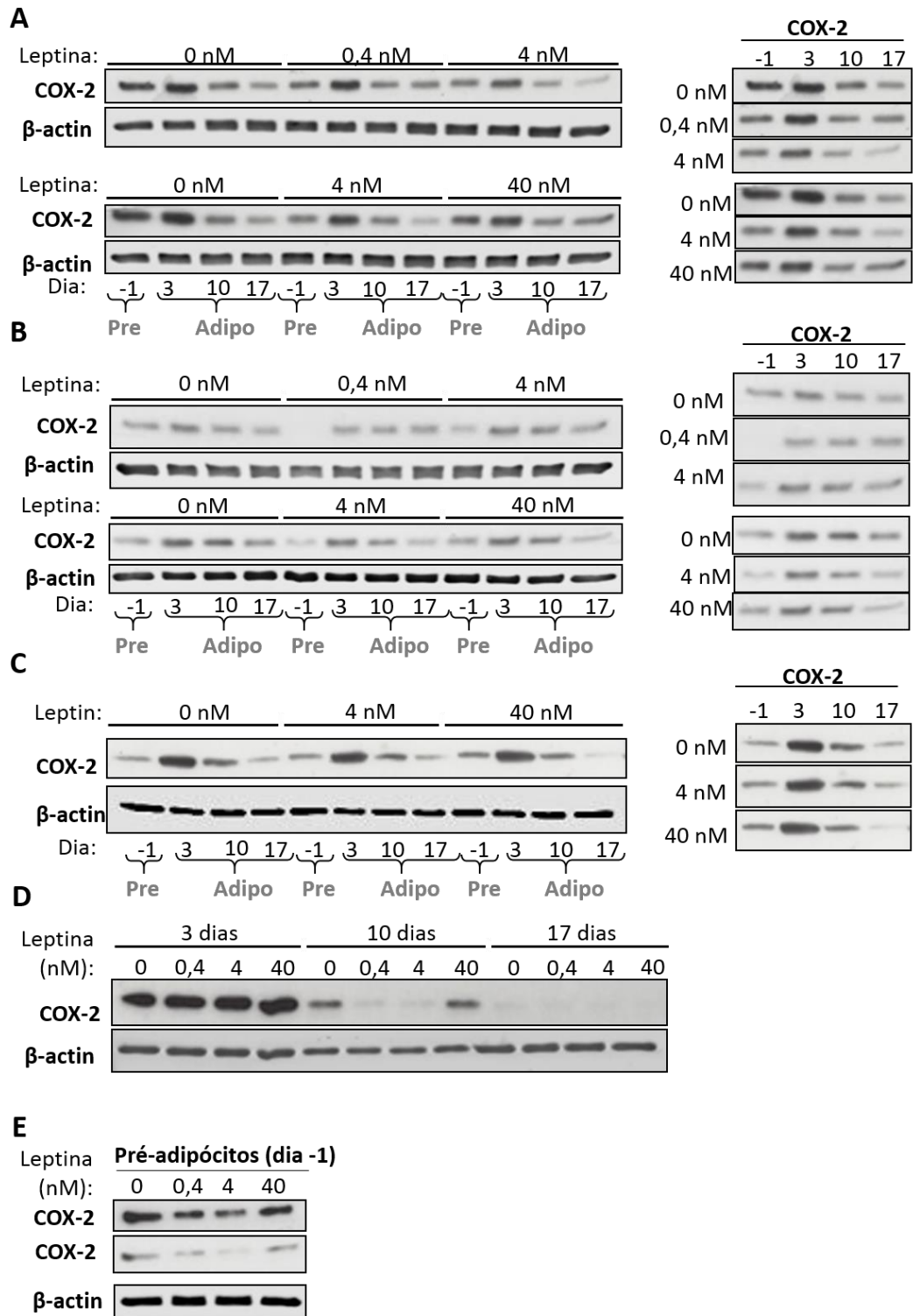


**C**



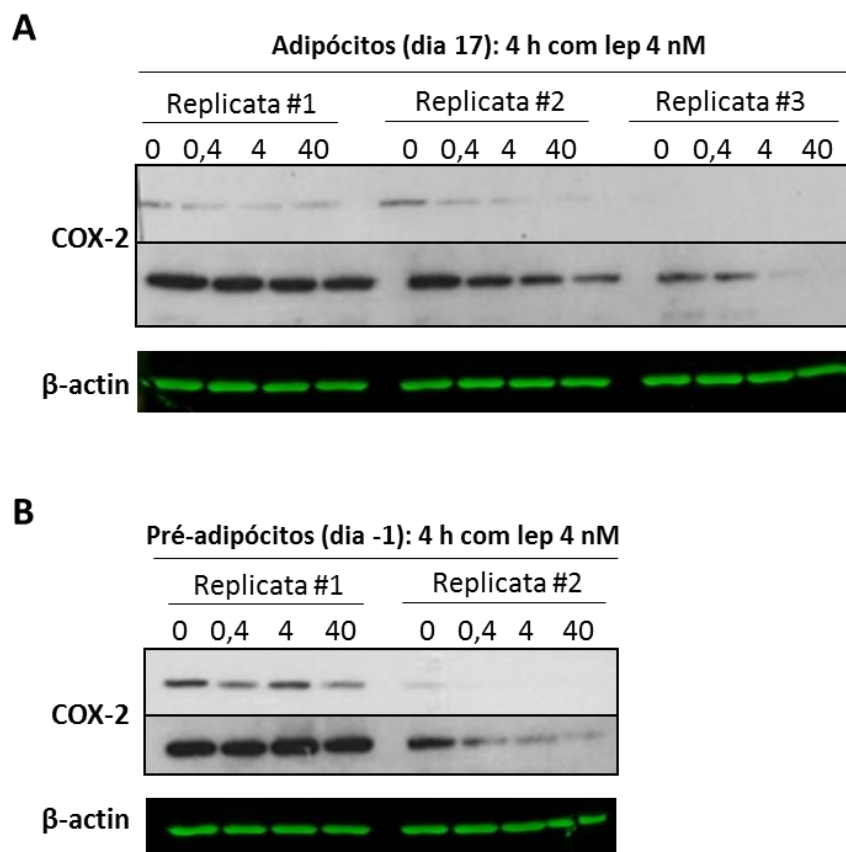
**Anexo VII. Leptina aumenta SREBP-1c em pré-adipócitos e adipócitos.** Análises de *Western blot* para SREBP-1c de células diferenciadas na presença de leptina nas doses de 4 e 40 nM por -1, 3, 10 e 17 dias (A – C). Cada painel representa um experimento independente.

## ANEXO VIII



**Anexo VIII. Leptina diminui a expressão de COX-2 em pré-adipócitos e adipócitos.** Análises de *Western blot* para PPAR $\gamma$  de células diferenciadas na presença de leptina nas doses de 0,4; 4 e 40 nM por -1, 3, 10 e 17 dias (A – D). A figura (E) mostra a expressão de COX-2 avaliada quando pré-adipócitos (dia -1) foram tratados com leptina nas doses de 0,4; 4 e 40 nM. Cada painel representa um experimento independente.

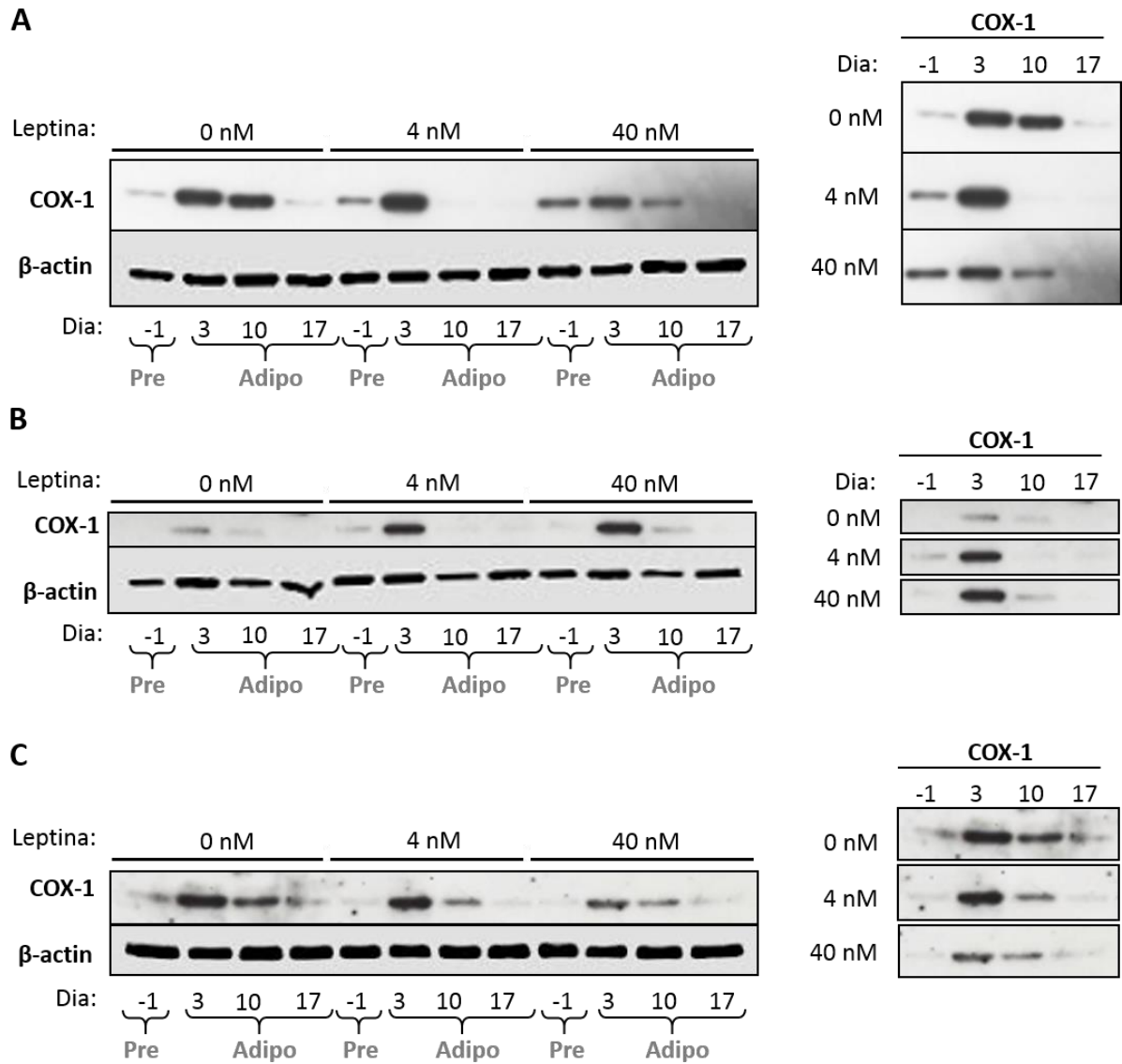
## ANEXO IX



**Anexo IX. Leptina diminui agudamente expressão de COX-2 em pré-adipócitos e adipócitos.** Análises de *Western blot* para COX-2 de adipócitos (dia 17) (**A**) e pré-adipócitos (dia -1) (**B**) tratados por 4 h com leptina nas doses de 0,4; 4 e 40 nM. Cada replicata representa um experimento independente.



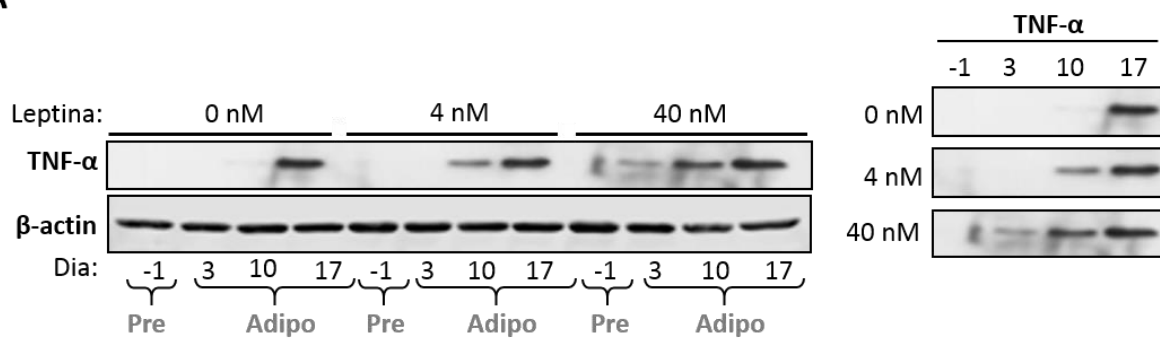
## ANEXO X



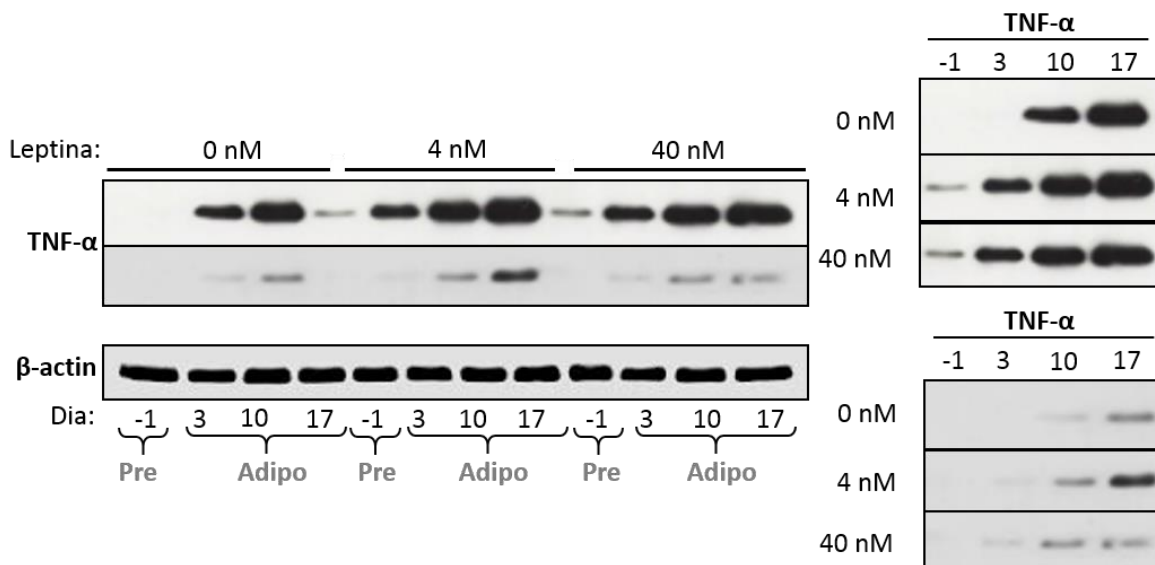
**Anexo X. Leptina diminui a expressão de COX-1 em pré-adipócitos e adipócitos.** Análises de *Western blot* para COX-1 de células diferenciadas na presença de leptina nas doses de 4 e 40 nM por -1, 3, 10 e 17 dias (A – C). Cada painel representa um experimento independente.

## ANEXO XI

**A**



**B**



**Anexo XI. Leptina aumenta TNF- $\alpha$  em pré-adipócitos e adipócitos.** Análises de *Western blot* para TNF- $\alpha$  de células diferenciadas na presença de leptina nas doses de 4 e 40 nM por -1, 3, 10 e 17 dias (A e B). A figura (B) mostra duas exposições diferentes da mesma membrana. Cada painel representa um experimento independente.