

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

PARTICIPAÇÃO DA OSTEOPROTEGERINA NOS EFEITOS DO ESTRADIOL NA  
HOMEOSTASE ENERGÉTICA

**Marina Saavedra Azzem**

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

RIBEIRÃO PRETO - SP

2018

**Marina Saavedra Azzem**

**PARTICIPAÇÃO DA OSTEOPROTEGERINA NOS EFEITOS DO ESTRADIOL NA  
HOMEOSTASE ENERGÉTICA**

Orientadora: **Profa. Dra. Lucila Leico  
Kagohara Elias**

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

RIBEIRÃO PRETO - SP

2018

## DEDICATÓRIA

“Dedico este trabalho à minha mãe, Fernanda, aos meus pais, Alfredo e Alexandre, à minha irmã, Júlia, e aos meus avós, minha base, desde sempre.”

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Lucila Leico Kagohara Elias, pela enorme oportunidade de estudar sob sua orientação, por ter me auxiliado a alcançar um maior crescimento pessoal e pela confiança depositada em mim. Agradeço também pelas broncas dadas, permitindo o meu amadurecimento profissional, e pelo apoio e acolhimento incomparáveis dados em diversos momentos. Espero conseguir ser um terço do que ela é como profissional e pessoa. À senhora, a minha eterna gratidão por tudo!

À minha co-orientadora, Mariana Kiomy Osako, por todas as histórias vividas e compartilhadas, por todos os momentos de risada e descontração. Por estar sempre disposta a me ajudar, tanto no âmbito acadêmico, quanto no pessoal. Por todos os ensinamentos dados e por mostrar que a luta pela ciência é árdua, porém o caminho mais belo de se perseverar.

Aos meus colegas de laboratório por todas as risadas e momentos de acolhimento compartilhados. Às técnicas, Valci e Milene, pelas ajudas diárias e momentos de descontração. Ao professor José Antunes Rodrigues, por ser uma inspiração única do ato de fazer ciência em nosso país. Ao pessoal do RANKLab por me auxiliarem e não medirem esforços quanto a isso, e por trazerem calma em momentos de desespero.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro e institucional, assim como a Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realização deste projeto e continuidade no curso desejado.

Aos coordenadores e todos os professores que participaram e participam arduamente e ativamente na formulação e manutenção do curso de Ciências Biomédicas. Tenho todos como inspiração de comprometimento com a docência e com os desafios proporcionados por ela. Agradecimento especial à Nadine, por toda a ajuda oferecida, por todas as conversas compartilhadas e por ter me mostrado luz, quando não mais a enxergava.

Agradeço aos meus pais, Fernanda, Alfredo e Alexandre, não só pelo apoio financeiro, mas por se fazerem presentes diariamente durante toda essa caminhada, mesmo distantes. Pela confiança e expectativa depositadas em mim e por incentivarem, desde sempre, o meu crescimento pessoal e profissional a todo e

qualquer custo. Não seria metade do que sou hoje sem o apoio emocional e todo amor dado por vocês! À minha mãe, principalmente, por acreditar fielmente em mim e por ser a mulher na qual me inspiro e espelho todos os dias. Tenho muito orgulho do momento que passamos e por tratar recomeços como oportunidades de mudanças e não como fracassos. Espero um dia me tornar metade da mulher que você é e compartilhar sempre do maior amor do mundo que já me foi dado.

À minha irmã Júlia, pelo apoio e vivências compartilhadas desde pequenas. Por me oferecer conselhos valiosos, por me compreender nos momentos de dificuldade e por ser inspiração de calma e equilíbrio sempre. Obrigada por ter sido abrigo e proteção sempre que precisei. Você é meu bem mais precioso!

Aos meus avós por me incentivarem e mostrarem que a educação é o único meio de nos libertar. Em especial ao meu avô Marco, meu anjinho, por ter sido a pessoa que mais vibrou com o meu ingresso na Universidade e que, com certeza, acompanhou toda a minha trajetória e está vibrando com mais essa conquista.

Aos meus melhores amigos, minha segunda família em Ribeirão Preto, da qual tenho muito orgulho em fazer parte. As melhores pessoas que eu poderia conhecer e desejar compartilhar todas as conquistas e derrotas, crescimentos, vivências e risadas. Sou eternamente grata por ter vocês, Maycon, Ana, Thaís e Viviana, em minha vida e por me aceitarem do jeitinho que sou!

Aos meus amigos de Ribeirão Preto, Rodrigo, Glaucia, Daniela, Marlon, Hadder, Julia e Yasmin, e de Araraquara, Ana, Patrícia, Izabella, Júlia e Viviane, por todo o apoio oferecido durante esses quatro anos e por compartilharem comigo as melhores histórias que eu poderia ter como recordação.

## EPÍGRAFE

*“Quando o cansaço era rio  
e rio qualquer dava pé.”*

## RESUMO

A homeostase energética é regulada por neurônios hipotalâmicos sensíveis a fatores circulantes, como hormônios e nutrientes. O estrógeno é responsável por alterações no metabolismo de adipócitos e no gasto energético, além de desempenhar papel fundamental no remodelamento ósseo. A redução da expressão de mRNA OPG em células osteoblásticas, observada em ratas ovariectomizadas, sugere um efeito protetor do estradiol no tecido ósseo. Além disso, também foi demonstrada a expressão de receptores de estradiol no tecido adiposo, assim como a expressão de OPG em células adiposas. Portanto, o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito do estradiol na expressão de RANKL/OPG em células 3T3-L1 e cultura primária, e o efeito da deleção de osteoprotegerina no peso corporal e na ingestão alimentar em camundongos machos e fêmeas. Para isso, foram utilizados camundongos knockout machos e fêmeas, heterozigotos e homozigotos selvagens para o gene *Tnfrsf11b* que codifica a osteoprotegerina. A ingestão alimentar e o peso corporal destes animais foram mensurados semanalmente após o desmame por 20 semanas. As linhagens celulares 3T3-L1 e células de cultura primária foram estimuladas com diferentes concentrações de  $17\beta$ -estradiol (0nM, 1nM, 10nM, 100nM e 1000nM) juntamente ao coquetel de diferenciação. Após estimulação, os padrões de expressão gênica de *Tnfrsf11b*, *Tnfs11*, *Ucp1*, *Adipoq*, *Ppargc1a* e *Prdm16* foram obtidos por RT-PCR, e as concentrações de OPG e RANKL no sobrenadante foram analisadas por ELISA. Houve uma redução do peso corporal entre camundongos selvagens e nocautes, bem como uma tendência à menor ingestão alimentar por esses animais. Entretanto, não houve diferença de peso corporal entre controles e heterozigotos, indicando que a deleção parcial de *Tnfrsf11b* não é capaz de causar alterações no peso corporal. Observou-se também que adipócitos submetidos a estímulos de diferentes concentrações de  $17\beta$ -estradiol apresentaram um aumento na expressão e produção de RANKL em adipócitos, bem como de marcadores de *browning* como *Ucp1* e *Ppargc1a*, associando o aumento do processo de *browning* em tecidos adiposos brancos, quando submetidos ao tratamento com estrógeno, com um possível papel protetivo de RANKL nestes tecidos.

**Palavras-chave:** 1.Estradiol, 2.OPG, 3.Tecido Adiposo, 4.Homeostase energética.

## ABSTRACT

Energy homeostasis is regulated by hypothalamic neurons sensitive to circulating factors such as hormones and nutrients. Estrogen is responsible for changes in adipocyte metabolism and energy expenditure, and also plays a key role in bone remodeling. Reduction of OPG mRNA expression in osteoblastic cells, observed in ovariectomized rats, suggests a protective effect of estradiol on bone tissue. In addition, expression of estradiol receptors in adipose tissue has also been demonstrated, as well as the expression of OPG in adipose cells. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of estradiol on RANKL/OPG expression in 3T3-L1 cells and primary culture, and the effect of osteoprotegerin deletion on body weight and food intake in male and female mice. For this, male and female knockout mice for *Tnfrsf11b* gene, encoding osteoprotegerin, heterozygotes and homozygotes were used. Food intake and body weight were measured weekly after weaning for 20 weeks. The 3T3-L1 and primary culture cells were stimulated with different concentrations of 17 $\beta$ -estradiol (0nM, 1nM, 10nM, 100nM and 1000nM) among with the differentiation cocktail. After stimulation, the gene expression patterns of *Tnfrsf11b*, *Tnfs11*, *Ucp1*, *Adipoq*, *Ppargc1a* and *Prdm16* were obtained by RT-PCR, and the concentrations of OPG and RANKL in the supernatant were analyzed by ELISA. There was a decrease in body weight between wild type mice and knockouts, as well as a tendency to lower food intake by these animals. However, there was no difference in body weight between controls and heterozygous, indicating that partial deletion of *Tnfrsf11b* is not able to cause changes in body weight and food intake. It was also observed that adipocytes submitted to stimuli of different concentrations of 17 $\beta$ -estradiol showed an increase in the expression and production of RANKL in adipocytes, as well as *browning* markers like *Ucp1* and *Ppargc1a*, associating the increase of the browning process in white adipose tissues, when submitted to estrogen treatment, with a possible protective role of RANKL in these tissues.

**Keywords:** 1.Estradiol, 2.OPG, 3.Adipose tissue, 4.Energy Homeostasis.



## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>11</b>
<hr/>	
1.1. TECIDO ADIPOSEO E A HOMEOSTASE ENERGÉTICA	11
1.2. HORMÔNIOS SEXUAIS E A HOMEOSTASE ENERGÉTICA	15
1.3. HORMÔNIOS SEXUAIS E O REMODELAMENTO ÓSSEO	18
1.4. OSTEOPROTEGERINA E O TECIDO ADIPOSEO	19
1.5. ESTRADIOL E OSTEOPROTEGERINA NO TECIDO ADIPOSEO	20
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>22</b>
<hr/>	
2.1. GERAL	22
2.2. ESPECÍFICOS	22
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>23</b>
<hr/>	
<b>3.1. ESTUDO IN VITRO</b>	<b>23</b>
3.1.1. EFEITO DO ESTRADIOL NA PRODUÇÃO DE OPG E RANKL EM ADIPÓCITOS 3T3-L1	23
3.1.2. EFEITO DO ESTRADIOL NA PRODUÇÃO DE OPG E RANKL EM CULTURA PRIMÁRIA DE ADIPÓCITOS	24
3.1.3. DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MRNA PARA OS GENES DA OSTEOPROTEGERINA (OPG), DO RECEPTOR ATIVADOR DO FATOR NUCLEAR KAPPA B (RANKL), DA ADIPONECTINA (ADIPOQ), DA PROTEÍNA DESACOPLADORA 1 (UCP-1), DA PROTEÍNA 16 CONTENDO O DOMÍNIO PR (PRDM16) NO PROTOCOLO DE CULTURA CELULAR	25
<b>3.2. ESTUDO <i>In Vivo</i></b>	<b>27</b>
3.2.1. GENOTIPAGEM	27
3.2.2. AVALIAÇÃO DA INGESTÃO ALIMENTAR E DO PESO CORPORAL	28
3.2.3. COLETA DE SANGUE E TECIDOS	28
3.2.4. DOSAGEM DE PARÂMETROS HORMONAIS	28
3.2.5. DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MRNA PARA OS GENES DA OSTEOPROTEGERINA (OPG), DO RECEPTOR ATIVADOR DO FATOR NUCLEAR KAPPA B (RANKL), DA ADIPONECTINA (ADIPOQ), DA PROTEÍNA DESACOPLADORA 1 (UCP-1), DA PROTEÍNA 16 COM DOMÍNIO PR NOS TECIDOS ADIPOSEOS BRANCO E MARROM	29
<b>3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA</b>	<b>29</b>
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>30</b>
<hr/>	
4.1. GENOTIPAGEM E AVALIAÇÃO DE INGESTÃO ALIMENTAR E PESO CORPORAL SOB DIETA REGULAR:	30
4.2. CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE OPG E RANKL EM CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS OPG <sup>+/+</sup> E OPG <sup>-/-</sup>	34
4.3. EFEITO DO ESTRADIOL NA PRODUÇÃO DE OPG E RANKL EM ADIPÓCITOS 3T3-L1	35

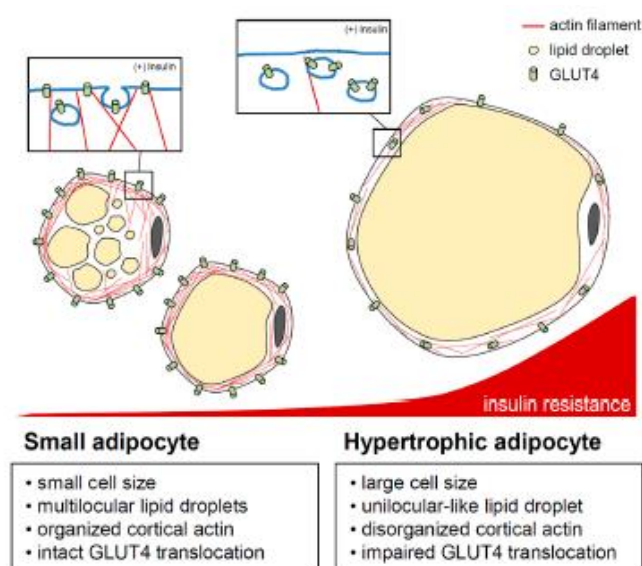
<b>4.4. EFEITO DO ESTRADIOL NA PRODUÇÃO DE OPG E RANKL EM CULTURA PRIMÁRIA DE ADIPÓCITOS</b>	<b>38</b>
<b><u>5. DISCUSSÃO</u></b>	<b><u>40</u></b>
<b><u>6. CONCLUSÕES</u></b>	<b><u>43</u></b>
<b>6.1. CONCLUSÕES</b>	<b>43</b>
<b><u>7. REFERÊNCIAS</u></b>	<b><u>44</u></b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Tecido adiposo e a Homeostase Energética

Em indivíduos saudáveis, o peso corporal e o conteúdo de tecido adiposo corporal são estáveis ao longo do tempo devido a um processo biológico denominado homeostase energética, que combina a ingestão alimentar com o gasto energético (CHOE et al., 2016). O hipotálamo tem papel fundamental na integração da resposta homeostática que regula a ingestão alimentar e o gasto energético (KELLY; RONNEKLEIV, 2015; BOU KHALIL; SOUAIBY; FARÈS, 2017). Os neurônios hipotalâmicos que expressam proopiomelanocortina (POMC) ou neuropeptídeo Y/peptídeo relacionado a agouti (NPY/AgRP), localizados no núcleo arqueado, compõem uma via crítica para a regulação da homeostase energética, uma vez que a estimulação de neurônios NPY/AgRP determinam a ingestão alimentar, enquanto os neurônios POMC apresentam ações opostas (APONTE; ATASOY; STERNSON, 2011; KELLY; RONNEKLEIV, 2015; SUYAMA et al., 2017). Estes neurônios são sensíveis a níveis circulantes de hormônios, metabólitos e nutrientes, regulando a liberação de neurotransmissores peptídicos para neurônios alvos no núcleo paraventricular, assim como em outros núcleos hipotalâmicos (KELLY; RONNEKLEIV, 2015). A leptina, peptídeo derivado de adipócito, é liberada no plasma em níveis proporcionais ao tecido adiposo corporal total, além de ser induzida pela insulina e possuir um importante papel na regulação central da ingestão alimentar e da homeostase energética (TIMPER; BRÜNING, 2017). O aumento nos níveis séricos de leptina promove a ativação de neurônios POMC, cuja clivagem deriva o  $\alpha$ -MSH, além de inibir neurônios NPY/AgRP, suprimindo, concomitantemente, a produção e secreção de NPY e AgRP (GAUTRON; ELMQUIST; WILLIAMS, 2015).

O tecido adiposo também exerce um importante papel na homeostase energética, atuando como reservatório energético (CHOE et al., 2016) e o excesso de tecido adiposo, ocasionado por uma interação complexa entre fatores genéticos, hormonais, comportamentais e ambientais, caracteriza a obesidade (PALLOTTINI et al., 2008). Trata-se, portanto, de um tecido dinâmico, passível de processos de remodelamento por meio de mudanças no número e/ou tamanho de adipócitos e de células vasculares quando submetido a alterações no status energético, conforme observado na figura 1(CHOE et al., 2016).



**Figura 1-** Caracterização de adipócitos durante a sua hipertrofia. Adaptado de: *CHOE, S. S., HUH, J. Y., HWANG, I. J., KIM, J. B. Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. Front Endocrinol (Lausanne). 7: 30 p. 2016.*

Também se encontra distribuído pelo corpo, sendo capaz de expandir a fim de acomodar o excesso de energia na forma de lipídeos. O tecido adiposo pode ser dividido em dois tipos de tecidos, tecido adiposo branco e tecido adiposo marrom (BJÖRNTORP, 1997). O tecido adiposo branco é o principal reservatório de energia, responsável por secretar um grande número de hormônios e citocinas que regulam o metabolismo (GÓMEZ-HERNÁNDEZ et al., 2016), e compreende dois depósitos teciduais conhecidos como subcutâneo e visceral, sendo este último mais concentrado na cavidade abdominal e observado em excesso em casos de obesidade (MAUVAIS-JARVIS; CLEGG; HEVENER, 2013; CHOE et al., 2016). O tecido adiposo abdominal, também conhecido como tecido adiposo branco visceral, é a região de maior depósito deste tecido no corpo e está intrinsecamente relacionado a distúrbios metabólicos, como a obesidade (CHOE et al., 2016). O tecido adiposo marrom (BAT), ao contrário do tecido adiposo branco, tem a função de dissipar energia na forma de calor, contribuindo para a manutenção da temperatura corporal. O tecido adiposo marrom “clássico” é encontrado de maneira expressiva na vida perinatal e é caracterizado pela expressão da proteína desacopladora 1 (UCP-1), proteína responsável pelo desacoplamento da oxidação de ácidos graxos da produção de ATP, levando à geração de calor (ROSEN; SPIEGELMAN, 2013). Inicialmente, acreditava-

se que o tecido adiposo marrom em humanos estava presente apenas no neonato, no entanto, atualmente, sabe-se que indivíduos adultos também apresentam tecido com características de tecido adiposo marrom que expressa UCP-1 e que contribui para a manutenção da homeostase energética (FAIN et al., 2010; SEALE, 2010). Em roedores, tecido adiposo semelhante ao BAT pode ser encontrado entremeado no tecido adiposo branco, sendo denominado de tecido adiposo bege, e sua atividade está relacionada ao aumento de gasto energético (SEALE, 2010; KAJIMURA; SPIEGELMAN; SEALE, 2015). O desenvolvimento deste tecido está relacionado à adaptação ao frio ou em resposta ao tratamento com agonistas seletivos  $\beta$ 3-adrenérgicos, sendo sua ocorrência mais proeminente em depósitos de tecido adiposo inguinal (SEALE, 2010; KAJIMURA; SPIEGELMAN; SEALE, 2015). PRDM16, proteína 16 contendo o domínio PR, é um coregulador transcricional responsável pelo controle do desenvolvimento de adipócitos marrons em depósitos clássicos de WAT (SEALE, 2010; CHONDRONIKOLA; SIDOSSIS, 2018). Seale *et al.*, em seu estudo, mostraram que PRDM16 se encontra altamente expresso no tecido adiposo branco inguinal e a sua expressão neste tecido acarretou na transformação fenotípica deste em tecido adiposo marrom (SEALE, 2010). Assim, PRDM16 atua como fator determinante em adipócitos inguinais para estabelecimento de um programa genético sob condições basais que pode permitir a ativação da termogênese em resposta ao frio ou superalimentação, servindo também como um marcador de *browning* em tecidos adiposos branco.

Estudos recentes mostraram que a obesidade está associada a um alto grau de inflamação no tecido adiposo, ressaltando a relação entre adipócitos e sistema imune, assim como a capacidade destas células em sintetizar e secretar diversos fatores conhecidos por adipocinas, dentre elas adiponectina e leptina (BASTARD et al., 2006), que estão sendo intensamente investigadas devido suas atuações no controle da homeostase energética (CHOE et al., 2016). O processo inflamatório é caracterizado como uma resposta biológica frente a um estímulo nocivo, como, por exemplo, a invasão de um patógeno ou o dano celular (CHOE et al., 2016). A resposta inflamatória aguda envolve a presença de componentes plasmáticos, como leucócitos, no sítio de infecção ou dano, a ativação de receptores da resposta imune inata, como receptores do tipo Toll (TLRs) e receptores do tipo NOD (NLRs), e a produção de mediadores inflamatórios por macrófagos e mastócitos (BARTON, 2008). Porém, esse

processo inflamatório persiste e passa a adquirir novas características, apresentando no local do infiltrado neutrofílico, macrófagos e células T, e, quando prolongada, origina a resposta inflamatória crônica com a formação de granulomas (MEDZHITOV, 2008). A resposta inflamatória desencadeada pela obesidade envolve diversos componentes da resposta inflamatória e é caracterizada pelo aumento na circulação sistêmica de citocinas, pelo decréscimo de fatores protetores e pela comunicação entre células responsáveis pelas respostas inflamatórias e metabólicas (LUMENG; SALTIEL, 2011).

A polarização de macrófagos envolve duas vias determinadas pelas respostas ocasionadas às citocinas inflamatórias liberadas. Em resposta às citocinas IFN $\gamma$  e TNF, os macrófagos apresentam o fenótipo M1 com a produção de níveis altos de IL-12 e baixos níveis de IL-10. Macrófagos M2 são estimulados por citocinas Th2, caracterizados por altos níveis de IL-10 e TGF- $\beta$  e baixa produção de IL-12 (BOLEGO et al., 2013). Sinais parácrinos de macrófagos M1 classicamente ativados podem prejudicar a sinalização da insulina e da adipogênese nos adipócitos, enquanto macrófagos M2 não estimulados ou ativados alternativamente não geram esses efeitos (LUMENG et al., 2008), assim como efeitos semelhantes na inflamação de adipócitos são gerados por sinais de células T ativadas, como, por exemplo, o IFN- $\gamma$  (FEUERER et al., 2009), exemplificando a comunicação entre células inflamatórias e metabólicas mencionada acima. O tecido adiposo também atua na produção de mediadores pró- e anti-inflamatórios que influenciam nas inflamações sistêmica e local (MANCUSO, 2016). O tecido adiposo branco, além de reservatório energético, também é um órgão secretor de moléculas que possuem ações endócrinas, parácrinas e autócrinas, envolvidas na regulação do peso corporal (leptina, adiponectina), na inflamação observada na obesidade (IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ), na função vascular, entre outras funções (GÓMEZ-HERNÁNDEZ et al., 2016). A expressão da citocina inflamatória TNF $\alpha$  se encontra aumentada em tecido adiposo de obesos, além de outras citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$ , IL-6 e MCP-1 (HOTAMISLIGIL et al., 1995; GREGOR; HOTAMISLIGIL, 2011; CHOE et al., 2016). Além disso, os adipócitos também sintetizam e secretam adipocinas, cuja produção se encontra alterada na obesidade, no DM2 e na síndrome metabólica (BASTARD et al., 2006). A leptina, codificada pelo gene *Lep* em camundongos, é um hormônio secretado por estas células e possui um importante papel na regulação do peso corporal através de seus

efeitos centrais sobre o apetite e na regulação do gasto energético (BASTARD et al., 2006). Em pacientes obesos, a leptina encontra-se em altas concentrações, dependendo do grau de adiposidade, e está associada à resistência às suas ações (GÓMEZ-HERNÁNDEZ et al., 2016). Outro hormônio que participa na homeostase energética é a adiponectina, cujo gene que a codifica em camundongos é o *Adipoq*, e que se encontra em baixos níveis em indivíduos obesos, além de possuir um papel protetor contra aterosclerose e resistência à insulina (BASTARD et al., 2006). A adiponectina também pode ter um papel protetor na parede vascular ao atuar inicialmente em diversas etapas da aterogênese como, por exemplo, na modulação de moléculas de adesão endotelial, além de reduzir a secreção de TNF- $\alpha$  por macrófagos (BASTARD et al., 2006).

## 1.2. Hormônios sexuais e a Homeostase Energética

Hormônios sexuais também influenciam na homeostase energética e participam na regulação do metabolismo de adipócitos, assim como atuam no remodelamento específico de depósitos de lipídeos (BJÖRNTORP, 1997). O estradiol modula a excitabilidade neuronal hipotalâmica responsável pela regulação da reprodução, da homeostase energética, da temperatura, do estresse e do ciclo circadiano (KELLY; RONNEKLEIV, 2015). Os efeitos hipofágicos de E2 em roedores são mediados através de sítios de ação no SNC, uma vez que estudos com aplicações diretas de estradiol nos núcleos hipotalâmicos arqueado e ventromedial mostraram a sua ação efetiva na redução da ingestão alimentar, do peso corporal e aumento da atividade física em fêmeas (COLVIN; SAWYER, 1969)(Colvin *et al.*, 1969; Butera *et al.*, 1984; Leal *et al.*, 1998).

As ações do estradiol no Sistema Nervoso Central (SNC), são mediadas por receptores de estradiol (ERs), pertencentes à família de receptores nucleares, classificados em dois tipos – receptores alfa (ER $\alpha$ ) e beta (ER $\beta$ ) (KELLY; RONNEKLEIV, 2015). Estes receptores encontram-se amplamente expressos em regiões críticas para a regulação do metabolismo energético, como os núcleos hipotalâmicos arqueado (ARC), ventromedial (VMH), paraventricular (PVH), área pré-óptica (POA) e área hipotalâmica lateral (LHA) (FRANK; BROWN; CLEGG, 2014). A isoforma ER $\beta$  encontra-se mais expressa nos núcleos hipotalâmicos POA e PVH, e núcleos supra-ópticos, enquanto ER $\alpha$  encontra-se expresso nos núcleos

hipotalâmicos POA, amígdala, PVH, região ventrolateral do núcleo VMH e núcleo arqueado (FRANK; BROWN; CLEGG, 2014). Foi demonstrado, em camundongos nocautes para ER $\alpha$  e ovariectomizados que a sinalização de E2 via ER $\alpha$  é um componente crítico na regulação da homeostase energética (GEARY et al., 2001).

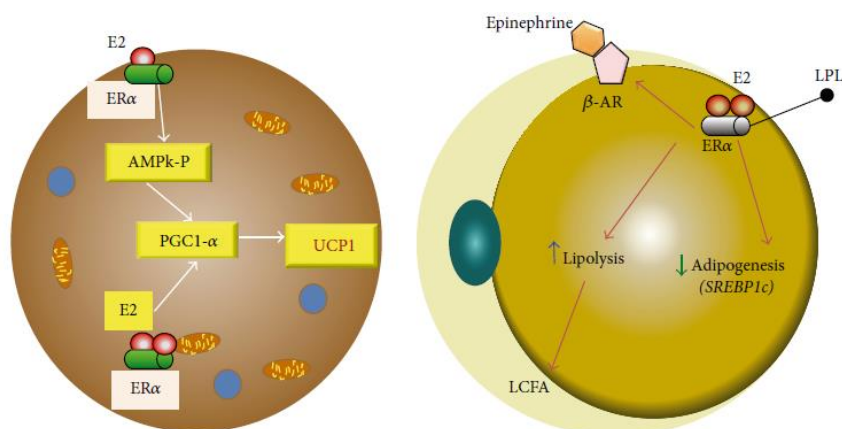
Ainda, um estudo realizado com ratas ovariectomizadas recebendo ou não tratamento com estradiol apresentou decréscimo de atividade locomotora e aumento do peso corporal, quando os níveis de estrógeno se encontravam baixos (Clegget *al.*, 2007). Enquanto que, em humanos, a perda de função de ER $\alpha$  por mutação resultou em fenótipo metabólico com expressão de diabetes do tipo 2, hiperinsulinemia e obesidade (AN et al., 2007; UGUR-ALTUN; ALTUN, 2007; XU et al., 2011)(Smith *et al.*, 1994; Musatovet *al.*, 2007; Xu *et al.*, 2011).

Além da expressão de receptores para estradiol em regiões centrais do Sistema Nervoso e tecido ósseo, tecidos adiposos subcutâneo e visceral expressam ambos receptores ER $\alpha$  e ER $\beta$  (MAUVAIS-JARVIS; CLEGG; HEVENER, 2013). O ER $\alpha$  modula o metabolismo em adipócitos, como demonstrado por estudos com deleção deste receptor em camundongos, acarretando hiperplasia e hipertrofia de adipócitos, assim como redução do gasto energético (MAYES; WATSON, 2004). Por outro lado, a administração de E2 em adipócitos subcutâneos de mulheres reduziu a expressão de LPL (lipase lipoproteica), controlando a distribuição de adiposidade corporal, apresentando um efeito inibitório sobre a atividade de LPL (PALLOTTINI et al., 2008). Outra função importante do estrógeno é a modulação do crescimento e da diferenciação de diversos tipos celulares, mecanismo avaliado pela ação de 17 $\beta$ -estradiol em precursores mesenquimais, mostrando o seu efeito positivo no potencial osteogênico destas células, bem como a melhora na diferenciação adipogênica(NIADA et al., 2016). O ER $\alpha$  participa também na distribuição do tecido adiposo, uma vez que camundongos fêmeas e machos nocautes para ER $\alpha$  apresentaram um aumento no tecido adiposo branco, principalmente tecido adiposo visceral, mas não em tecido adiposo marrom, ocasionado por hiperplasia e hipertrofia de adipócitos (HEINE et al., 2000); e o tratamento de camundongos fêmeas ovariectomizadas e nocautes para ER $\beta$  com estradiol possibilitou a redução de tecido adiposo nesses animais, diferente do observado em animais nocautes para ER $\beta$  e ER $\alpha$ , os quais não apresentaram redução, mostrando que este efeito é dependente de ER $\alpha$  (LINDBERG et al., 2002). Além disso, as diferentes concentrações de



receptores para hormônios sexuais (receptores para estrógeno e andrógeno) nos diferentes tecidos adiposos conferem dimorfismo sexual, uma vez que camundongos machos apresentam maior deposição de tecido adiposo visceral, enquanto camundongos fêmeas apresentam maior deposição de tecido adiposo subcutâneo (MAYES; WATSON, 2004; MAUVAIS-JARVIS; CLEGG; HEVENER, 2013). Por isso, a ausência de receptor ER $\alpha$  no tecido adiposo branco em camundongos machos e fêmeas é responsável por provocar distúrbios metabólicos como obesidade, resistência à insulina e diabetes, além do estradiol atuar suprimindo o acúmulo de tecido adiposo branco através da redução da síntese de triglicerídeos e ácidos graxos e da lipogênese (MAUVAIS-JARVIS; CLEGG; HEVENER, 2013).

Estudos experimentais também mostraram que estrógeno intensifica a propriedade termogênica de adipócitos marrons ao aumentar a expressão de UCP-1 nos tecidos. O aumento dessa expressão se dá por meio do aumento de Pgc-1 alpha via AMPK, mas sabe-se, também, que somente o receptor ER $\alpha$  é expresso no tecido adiposo marrom e está localizado, principalmente, em mitocôndrias atuando também como um coativador direto deste aumento de expressão, conforme demonstrado na figura 2 abaixo (LIZCANO; GUZMAN, 2014).



**Figura 2-** Estrógeno e sua atuação em adipócitos branco e marrom. Retirado de: LIZCANO, F.; GUZMAN, G. *Estrogen Deficiency and the Origin of Obesity during Menopause. Biomed Res Int.* 2014: 757461 p. 2014.

A deficiência de estrógeno eleva a predisposição ao DM2 e à síndrome metabólica e às doenças cardiovasculares em mulheres na menopausa (LIZCANO; GUZMAN, 2014; CHOE et al., 2016). Níveis reduzidos de E2 em camundongos fêmeas ovariectomizadas estão associados com hiperfagia, gasto reduzido de energia

e ganho de peso (LIZCANO; GUZMAN, 2014; CHOE et al., 2016; LÓPEZ; TENA-SEMPERE, 2016). Reposição de E2 nessas condições reverte o ganho de peso induzido por ovariectomia e o comprometimento metabólico ao elevar o gasto de energia (LÓPEZ; TENA-SEMPERE, 2016, 2017). Além disso, estradiol regula diversos aspectos metabólicos como a sensibilidade a insulina, a função da célula pancreática beta e o metabolismo lipídico (FRIAS et al., 2001; ANA ALONSO, 2012; MARTÍNEZ DE MORENTIN et al., 2014). Assim, seu efeito no tecido adiposo é relevante, atuando na regulação da sua distribuição corpórea, diferenciação, inflamação e fibrose (LÓPEZ; TENA-SEMPERE, 2016).

### **1.3. Hormônios sexuais e o remodelamento ósseo**

Com a menopausa, os níveis circulantes de estrógeno reduzem e essa situação é acompanhada por alterações na homeostase energética (MAUVAIS-JARVIS, 2011; MAUVAIS-JARVIS; CLEGG; HEVENER, 2013) e na composição óssea (LIZCANO; GUZMAN, 2014), acarretando em diversas patologias, dentre elas a osteoporose. Osteoporose é o distúrbio caracterizado pela perda da massa óssea ocasionado por diversos mecanismos patogênicos que se convergem resultando em deterioração da estrutura esquelética. Esta deterioração provocada por fragilidade esquelética origina-se a partir dos seguintes processos: produção falha de uma arquitetura esquelética com massa e força ótimas durante o crescimento; reabsorção óssea excessiva acarretando em redução da massa óssea e micro deterioração do esqueleto; e uma formação inadequada em resposta ao aumento da reabsorção durante o remodelamento ósseo (RAISZ, 2005).

O estradiol tem ações também no metabolismo ósseo, bloqueando a formação de osteoclastos que proliferam a partir da indução por citocinas e a diferenciação de precursores de monócitos, tendo como ação secundária o aumento da apoptose destas células; e, com isso, este efeito inibitório também atua impedindo a osteoclastogênese, assim como no bloqueio da apoptose de osteoblastos e osteócitos (LIZCANO; GUZMAN, 2014).

O remodelamento ósseo envolve três citocinas pertencentes à superfamília do receptor de fator de necrose tumoral (TNF), sendo elas a osteoprotegerina (OPG), cujo gene que a codifica em camundongos é *Tnfrsf11b*, o ligante do receptor ativador de NFκB (RANKL), codificado pelo gene *Tnfsf11* em camundongos, e o receptor

ativador de NFkB (RANK) (PHETFONG et al., 2016). Enquanto OPG apresenta como função a proteção óssea, RANKL estimula a reabsorção óssea a partir da diferenciação de osteoclastos e ativação de osteoclastos maduros, tendo o sistema OPG/RANK/RANKL envolvimento no balanço entre a formação e a reabsorção óssea, no qual RANK é expresso em precursores de osteoclastos, osteoclastos maduros, células dendríticas, células B e T, fibroblastos, entre outras células, enquanto OPG e RANKL encontram-se expressos em osteoblastos (PÉREZ DE CIRIZA; LAWRIE; VARO, 2015).

A osteoporose ocasionada pela deficiência de estrógeno após a menopausa, também conhecida como osteoporose pós-menopausa, pode ser mimetizada por meio de modelos animais a partir da técnica de ovariectomia (KALU, 1991). O tratamento com estrógeno possui efeitos diretos em osteócitos, osteoclastos e osteoblastos, promovendo a inibição da reabsorção óssea e a manutenção da formação óssea (BLACK; ROSEN, 2016), como mostrado por Cauley *et al.*, que observaram que o tratamento com estrógeno reduziu o índice de fraturas, e Richman *et al.*, cujo estudo demonstrou que o tratamento aumentou a densidade mineral óssea em mulheres menopausadas. Ikeda *et al.* analisaram mudanças na atividade biológica de células ósseas de ratas em diferentes tempos após a ovariectomia a partir da expressão de colágeno do tipo I em osteoblastos e expressão de osteopontina, um fator importante para o remodelamento ósseo, por osteócitos. Assim, mostrou-se um aumento na expressão de RNAm de osteopontina em osteócitos e aumento da expressão de RNAm de colágeno do tipo I, ocasionado pelo decréscimo de osso trabecular, responsável pela manutenção da força e elasticidade óssea, em ratas ovariectomizadas, sugerindo a participação destas células em sítios osteoclásticos específicos da reabsorção óssea, (IKEDA et al., 1996; IKEDA; UTSUYAMA; HIROKAWA, 2001). Em estudo posterior, Ikeda *et al.* (2001) analisaram a expressão de RNAs de RANKL, RANK e OPG em ossos de ratas sham e ovariectomizadas com idade de 8 e 10 meses, mostrando o aumento na expressão de RNAm para RANKL e a ausência de expressão de RNAm para OPG nas células osteoblásticas em ratas ovariectomizadas, sugerindo um decréscimo do volume ósseo e uma reação protetora contra o excesso de reabsorção óssea ocasionada pela ovariectomia.

#### **1.4. Osteoprotegerina e o tecido adiposo**

Pérez de Ciriza *et al.* em seu estudo mostraram, a partir da comparação entre indivíduos obesos e não obesos, o aumento nos níveis séricos de OPG em obesos, até então não apresentando estudos que identificassem a sua expressão direta no tecido adiposo (PÉREZ DE CIRIZA; LAWRIE; VARO, 2015). A expressão de OPG observada por An *et al.* a partir da diferenciação de 3T3L1 em adipócitos, mostrou o aumento da sua expressão nestas células e, também no tecido adiposo branco subcutâneo, periometral e mais abundantemente no tecido adiposo epididimal, quando analisado o mRNA total em diferentes tecidos de ratos (AN et al., 2007). Além disso, o tratamento de células 3T3-L1 com TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , citocinas responsáveis por estimular a expressão e secreção de OPG em células MG-63 (células osteoblasto-like) como mostrado por Pantouli *et al.* , também promoveu o aumento da razão OPG/RANKL (PANTOULI; BOEHM; KOKA, 2005).

A partir do estudo em camundongos tratados com dieta hiperlipídica (HFD), Bernardi *et al.* mostraram que os níveis circulantes e teciduais de OPG estavam significativamente elevados quando comparados aos animais controles, assim como os níveis das moléculas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- $\alpha$  também se encontravam aumentados (BERNARDI et al., 2014). Outro estudo responsável por mostrar a expressão de citocinas ósseas em cultura celular de tecido adiposo foi realizado por Harslof *et al.*, no qual a cultura celular de tecido adiposo subcutâneo foi submetida a tratamentos com IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , cortisol e troglitazone, droga responsável por ativar PPAR $\gamma$  (HARSLOF et al., 2011). Assim, mostrou-se o aumento de OPG sob estímulo de IL-1 $\beta$ , e, principalmente, TNF- $\alpha$ , bem como a redução de secreção de OPG sob estímulo de cortisol, demonstrando a produção de citocinas ósseas no tecido adiposo e um possível cross-talk entre tecidos ósseo e adiposo via mecanismos endócrinos.

### **1.5. Estradiol e osteoprotegerina no tecido adiposo**

Com a menopausa, há também um aumento da ativação de células T, assim como a produção de TNF e RANKL por estas células, além de ser conhecido também que as células T, pelo sistema CD40L/CD40, promovem a produção de OPG pelas células B. Com isso, a deficiência de estrógeno provocada por esta condição expande o pool de células T produtoras de TNF, uma vez que este hormônio é responsável

pela supressão da função tímica e aumento do número relativo de células T reguladoras (CENCI et al., 2000; PACIFICI, 2012).

O papel do estrógeno na inibição da adesão de monócitos ao reduzir a expressão de moléculas de adesão na superfície de células endoteliais está relacionado à expressão de receptores ER $\alpha$  tanto em monócitos, quanto macrófagos (BOLEGO et al., 2013). Além disso, hormônios ovarianos possuem grande impacto no recrutamento de macrófagos, na expressão de receptores do tipo Toll e na fagocitose. O tratamento com E2 inibe a ativação de NF- $\kappa$ B e os níveis de TNF, assim como a obesidade e HFD induzem reação inflamatória no tecido adiposo e a troca fenotípica para M1 dos macrófagos presentes no tecido adiposo (BOLEGO et al., 2013). A inibição da diferenciação de monócitos em osteoclastos é realizada por Tregs, responsáveis por suprimirem a função efetora de Th1, Th2 e Th17, através da secreção de IL-4, IL-10 e TGF $\beta$ 1 e o estrógeno parece ter grande influência ao inibir a diferenciação de monócitos, uma vez que este hormônio aumenta o número de células T reguladoras (PACIFICI, 2012).

A adiponectina, adipocina envolvida em vários processos inflamatórios, na modulação da função endotelial e na proteção contra a resistência à insulina, encontra-se inversamente associada aos níveis de estrógeno, tendo em vista a correlação negativa entre seu nível plasmático e o nível plasmático de E2 (BASTARD et al., 2006). Wang *et al* em estudo in vitro demonstraram que a adiponectina estimula a expressão de RANKL e a inibição de OPG em osteoblastos, contribuindo para a formação de osteoclastos(WANG et al., 2012). Com o intuito de analisar os efeitos de E2 na regulação da expressão OPG/RANKL induzida pela adiponectina, foi realizado um estudo in vitro em cultura primária de osteoblastos, mostrando que a indução da expressão de RANKL e inibição de OPG por adiponectina foi atenuada na presença de E2, sugerindo a supressão da ação de adiponectina pelo estradiol (WANG et al., 2012).

Diante dos estudos apresentados anteriormente, considerando 1) a presença de receptores para estrógeno em tecidos adiposos e sua atuação na homeostase energética e na modulação do metabolismo de adipócitos, 2) expressão de osteoprotegerina no tecido adiposo e 3) ação do estradiol na expressão de OPG no tecido ósseo, torna-se relevante a investigação da interação da osteoprotegerina e estradiol na homeostase energética.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Geral

Investigar a participação da osteoprotegerina nas ações do estradiol na homeostase energética.

### 2.2. Específicos

2.2.1. Avaliar, in vitro, o efeito do estradiol na expressão de RANKL e OPG em células de linhagem celular 3T3-L1;

2.2.2. Avaliar, in vitro, o efeito do estradiol na expressão de RANKL e OPG em cultura primária de adipócitos;

2.2.3. Avaliar, in vitro, o efeito do estradiol na expressão gênica de Adiponectina, UCP-1, Pgc-1 alpha e PRDM16 em adipócitos;

2.2.4. Avaliar o efeito da deleção de *Tnfrsf11b* sobre o peso corporal e ingestão alimentar em camundongos machos e fêmeas, sob dieta regular;

2.2.5. Avaliar o efeito da deleção de *Tnfrsf11b* sobre a expressão gênica de Adiponectina, UCP-1, Pgc-1 alpha e PRDM16 em tecidos adiposos branco e marrom;

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Estudo In Vitro

##### 3.1.1. Efeito do estradiol na produção de OPG e RANKL em adipócitos 3T3-L1

Para o estudo, foram utilizadas linhagens celulares 3T3-L1.

Inicialmente, estas células foram cultivadas em placas de 10cm a uma densidade de  $1 \times 10^6$  células em meio M-1, conforme especificado na tabela abaixo. As células foram mantidas por mais 2 dias em meio M-1 até que atingissem 70% de confluência. Para o dia 0 da indução à diferenciação, o meio foi trocado por M-2, conforme especificado na tabela abaixo, e as células foram cultivadas neste meio por 2 dias (dia 0 ao dia 2) em placas de seis poços, a uma densidade de  $2 \times 10^5$  células. O meio foi novamente substituído, por meio M-3, composto por M-1 acrescido de  $1,5 \mu\text{g/mL}$  de insulina, no dia 2, com a troca por meio fresco a cada 2 dias durante 6 dias (dia 2 ao dia 8).

As diferentes concentrações de  $17\beta$ -estradiol (0nM, 1nM, 10nM, 100nM e 1000nM, Sigma) foram aplicadas na cultura de pré-adipócitos após atingirem confluência (dia 0) até a sua maturação, juntamente ao coquetel de diferenciação como descrito em Pektas *et al.* (2015).

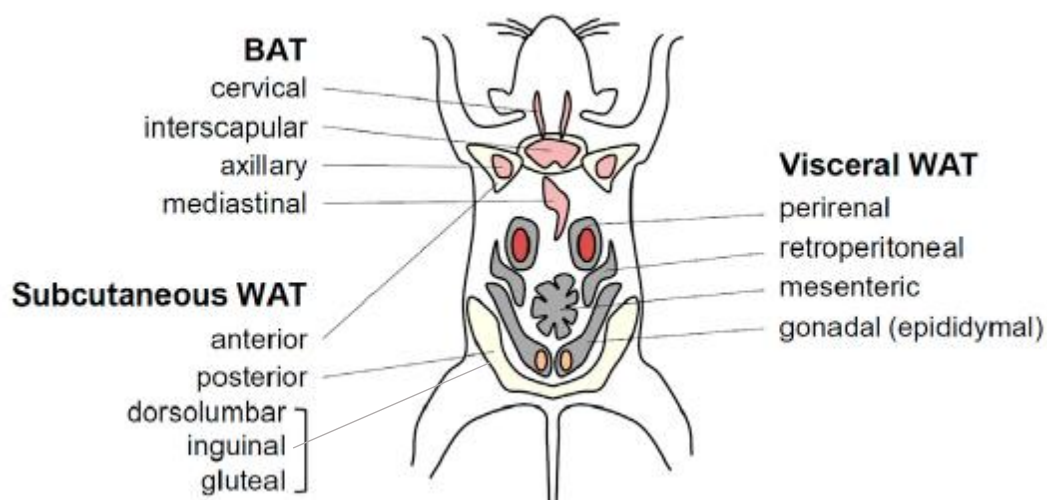
Após a estimulação, foram analisados os padrões de expressão gênica de *Tnfrsf11b* e *Tnfs11*, *Adipoq*, *UCP-1*, *Ppargc1a* e *Prdm16* por RT-PCR, e a concentração de OPG e RANKL no meio de cultura por kit ELISA (R&D Systems, Quantikine®).

M-1	M-2	M-3
DMEM 4,5 mg/mL glicose 4,0 mM glutamina 1 mM piruvato de sódio 10% soro fetal bovino 1% streptomicona/penicilina	M-1 1,5 $\mu\text{g/mL}$ insulina 0,5 mM IBMX 1,0 $\mu\text{M}$ dexametasona	M-1 1,5 $\mu\text{g/mL}$ insulina

**Tabela 1-** Meios de diferenciação para adipócitos brancos.

### 3.1.2. Efeito do estradiol na produção de OPG e RANKL em cultura primária de adipócitos

Para o estudo, foram utilizados adipócitos obtidos a partir da diferenciação de células estromais coletadas do tecido adiposo branco inguinal, conforme especificada na imagem abaixo.



**Figura 3** - Depósitos de tecidos adiposos branco e marrom em camundongos. Adaptado de: *CHOE, S. S., HUH, J. Y., HWANG, I. J., KIM, J. B. Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. Front Endocrinol (Lausanne). 7: 30 p. 2016.*

Primariamente, foi preparado o meio de digestão contendo collagenase D, dispase II, PBS e  $\text{CaCl}_2$  conforme as concentrações indicadas na tabela abaixo:

Meio de Digestão (5mL/5 animais por tecido coletado)
Collagenase D 1,5 u/mL
Dispase II 2,4 u/mL
25 mL PBS
$\text{CaCl}_2$ 10mM

**Tabela 2-** Meio de digestão para obtenção de adipócitos em cultura primária.

Após o preparo do meio, os animais foram eutanasiados e dissecados para obtenção do tecido de interesse. O tecido dissecado foi adicionado ao PBS para remoção de toda contaminação como, por exemplo, pêlo, músculo esquelético e



tecido conjuntivo. Posteriormente, o tecido foi secado em papéis de filtro autoclavados e armazenado em placa de petri. Por conseguinte, foi adicionado o meio de digestão nesta placa e o tecido foi cortado em pequenos fragmentos de forma que facilitasse a pipetagem com uma pipeta de 5mL. O tecido foi, então, transferido para tubo falcon de 50mL com o restante do meio de digestão e este foi mantido a 37°C, em agitação constante a 150 rpm, por 40-50 min, checando o processo de digestão a cada 10 minutos para evitar que o tecido fosse muito digerido.

Após 50 minutos, a digestão foi interrompida com a adição de 5 mL de meio completo (DMEM com soro e antibióticos). As células digeridas foram então centrifugadas a 700xg por 10 minutos, havendo formação de um pellet de cor marrom ao fundo do tubo, tratando-se, portanto, das células de interesse. A camada de adipócitos maduros formada ao topo e o restante do líquido de digestão foram removidos, mantendo somente o pellet, ressuspendendo-o em 10 mL de meio completo. Este processo foi repetido mais uma vez, obtendo a suspensão celular de interesse.

Em um novo tubo falcon de 50 mL, foi posicionado um filtro celular de 50-70 µm de diâmetro e a suspensão celular foi filtrada. Por fim, a suspensão celular filtrada foi plaqueada em placas de 10 cm de diâmetro. Após 24 horas do plaqueamento, aspirou-se o meio, lavou-se as placas com PBS por duas vezes e novo meio foi adicionado.

Para o processo de diferenciação e estimulação, foram utilizados os protocolos detalhados anteriormente. Após este processo, foram analisados os padrões de expressão gênica de *Tnfrsf11b* e *Tnfs11*, *Adipoq*, *Ucp1*, *Ppargc1a* e *Prdm16* por RT-PCR.

### **3.1.3. Determinação da expressão de mRNA para os genes da osteoprotegerina (OPG), do receptor ativador do fator nuclear Kappa B (RANKL), da adiponectina (Adipoq), da proteína desacopladora 1 (UCP-1), da proteína 16 contendo o domínio PR (Prdm16) no protocolo de cultura celular**

Após o tratamento das células 3T3-L1 e cultura primária detalhados acima, coletou-se os sobrenadantes e foram adicionados 500 µL de TRIzol Reagent (Invitrogen) a cada poço para lise das células, mantendo, também, a integridade do

RNA. Posteriormente, este conteúdo foi coletado em eppendorfs e armazenado no -70°C até o seu uso.

No dia do experimento, transferiu-se as amostras para o gelo a fim de descongelá-las. Adicionou-se 100µL de clorofórmio 100% e 10µL de glicogênio, e os tubos foram agitados manualmente durante 15 segundos por inversão com incubação seguinte em temperatura ambiente por 5 minutos. Então, as amostras foram centrifugadas a 1400 rpm por 15 minutos a 4°C, ocorrendo a formação de 3 fases: fase inferior com coloração rosa, fase intermediária mais fina com coloração branca e o sobrenadante incolor, no qual contém o RNA. Ao sobrenadante foi adicionado 250 µL de isopropanol com posterior agitação manual e incubação overnight no freezer -80°C.

No dia seguinte, centrifugou-se a amostra a 1400 rpm por 15 minutos a 4°C, ocorrendo a formação de um pellet. Retirou-se o sobrenadante contendo o isopropanol adicionado e adicionou-se 500 µL de etanol 70% para outro processo de centrifugação. Após a centrifugação, o etanol foi retirado por inversão e se deixou secar o pellet em temperatura ambiente juntamente com o pellet formado neste processo. Quando seco (coloração branca do pellet tornou-se transparente), ressuspendeu-se o pellet em 15 µL de água DEPC com posterior incubação em banho seco a 60°C por 10 minutos e incubação overnight no freezer -20°C.

Então, o RNA ressuspendido foi transferido para um eppendorf de 200 µL e adicionou-se 0,1 volume de DNase I buffer 10x e 1 µL de DNase. Incubou-se o eppendorf a 37°C por 30 minutos e, posteriormente, adicionou-se 2µL do reagente de inativação da DNase. Realizou-se, assim, a última incubação do protocolo por 2 minutos em temperatura ambiente e conseguinte centrifugação a 10000 xg por 1 minuto e 30 segundos e transferenciado RNA (sobrenadante) para eppendorf de 600 µL.

A fim de manter as amostras em concentração final de 1500ng em 15 µL de água, foi realizada a quantificação das amostras e posterior diluição.

Após esta etapa, foi realizada a síntese de DNA complementar (cDNA) por kit comercial High-CapacitycDNA Reverse Transcription (AppliedBiosystems) e a transcrição reversa foi realizada em termociclador (GeneAmp PCR System 9600, AppliedBiosystems), seguindo instruções do fornecedor.

Por último, foram analisados os padrões de expressão gênica de *Tnfrsf11b*, *Tnfs11* e *Adipoq*, *Ucp1*, *Ppargc1a* e *Prdm16* por RT-PCR no equipamento 7500 Real-Time PCR System (*AppliedBiosystems*<sup>â</sup>), cuja reação consistiu em 4 µL da amostra obtida e 8 µL do MIX contendo 1,6 µL de H<sub>2</sub>O, 6,25 µL de TaqMan e 0,65 µL da sonda.

A expressão relativa do gene-alvo foi calculada baseando-se no *threshold cycle* (Ct), utilizando-se a beta-actina como controle endógeno (Mn00607939\_S1 cat.4352341E, Life Technologies). Os resultados foram analisados de acordo com o método  $\Delta\Delta Ct$ .

### 3.2. Estudo *In Vivo*

Foram utilizados camundongos machos e fêmeas homocigotos (OPG<sup>+/+</sup>, OPG<sup>-/-</sup>) e heterocigotas (OPG<sup>+/-</sup>) com deleção do gene *Tnfrsf11b*, que codifica a osteoprotegerina, e homocigotos selvagem (wild type - OPG<sup>+/+</sup>), gerados a partir do cruzamento entre animais heterocigotos (OPG<sup>+/-</sup>). Os animais, obtidos em colaboração com a Profa. Mariana Kiomy Osako (FMRP-USP), foram ambientalizados e aclimatados a temperatura ambiental controlada (23±2 C), em regime de luz claro/escuro de 12h (luz 6:00 – 18:00 h). Os animais tiveram livre acesso à água e ração com dieta comum. Os animais foram submetidos a diversos procedimentos experimentais, previamente encaminhados para apreciação e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP sob protocolo nº 0104/2017.

#### 3.2.1. Genotipagem

Com 15 dias de vida, cada filhote recebeu uma marca na orelha (utilizando um furador) para sua identificação. Em seguida, foi retirado um fragmento (5mm) da cauda de cada camundongo e realizada a extração do DNA do fragmento da cauda dos camundongos, utilizando o Kit REDE-extract-N-AmpTissue PCR Kit (Sigma AldrichBiotechnology). Posteriormente, foi realizada a PCR, cuja reação consistiu de adição de 5 µl do Mix REDE-extract –N-Amp PCR, 2,5 µl de água estéril e 0,5 µl dos primers:

OPG Forward – GGTCCTCCTTGATTTTTCTATGCC

OPG Reverse - TGCCCTGACCACTCTTATACGGAC

OPG Neo–TGACCGCTTCCTCGTGCTTTAC

Tamanho das bandas:

OPG knockout: ~600 pares de bases

Heterozigoto: ~600 pares de bases e ~249 pares de bases

Wild type: 249 pares de bases

### **3.2.2. Avaliação da ingestão alimentar e do peso corporal**

Após o desmame (com 21 dias) até 20 semanas de vida, os camundongos OPG<sup>+/+</sup>, OPG<sup>+/-</sup>, OPG<sup>-/-</sup>. machos e fêmeas foram mantidos em microisoladores (3 por caixa) e foram mensuradas semanalmente a ingestão alimentar e o peso corporal dos animais.

Os animais receberam dieta controle (DC) – (Quimtia, Nuvilab<sup>®</sup>. – 3,86 Kcal/g sendo 4% lipídeos, 22% proteínas e 60% carboidratos).

### **3.2.3. Coleta de sangue e tecidos**

Após a realização da avaliação da ingestão alimentar e do peso corporal, os animais foram expostos a ambiente com 1% de isoflurano e eutanasiados por decapitação para posterior coleta de sangue e tecidos.

O sangue do tronco foi coletado em tubos contendo heparina, sob gelo. O plasma foi obtido após centrifugação por 20 minutos, 3000 rotações/min, a 4°C e posteriormente estocado a -70°C, até o momento das dosagens.

Após a decapitação, o cérebro foi removido a partir da abertura da calota craniana, utilizando-se materiais cirúrgicos esterilizados e em ambiente livre de RNase, e foi congelado imediatamente em gelo seco. Logo em seguida, o cérebro foi estocado no freezer -80°C. Foram coletados também os tecidos adiposos branco retroperitoneal e inguinal e tecido adiposo marrom da região interescapular.

### **3.2.4. Dosagem de parâmetros hormonais**

Foram realizadas dosagens de OPG e RANKL plasmáticos com Kit ELISA R&D Systems.

### **3.2.5. Determinação da expressão de mRNA para os genes da osteoprotegerina (OPG), do receptor ativador do fator nuclear Kappa B (RANKL), da adiponectina (Adipoq), da proteína desacopladora 1 (UCP-1), da proteína 16 com domínio PR nos tecidos adiposos branco e marrom**

Após a avaliação da ingestão alimentar e do peso corporal dos animais selvagens e nocautes para osteoprotegerina, os tecidos adiposos branco e marrom coletados foram macerados e lisados para posterior extração do RNA, seguindo o protocolo detalhado acima (3.1.3.).

Por conseguinte, foram analisados os padrões de expressão gênica de *Tnfrsf11b*, *Tnfs11* e *Adipoq*, *Ucp1*, *Prdm16* e *Ppargc1a* por RT-PCR no equipamento 7500 Real-Time PCR System (*Applied Biosystems*<sup>®</sup>) e a expressão relativa do gene-alvo foi calculada baseando-se no *thresholdcycle* (Ct), utilizando-se a beta-actina como controle endógeno (Mn00607939\_S1 cat.4352341E, Life Technologies). Os resultados foram analisados de acordo com o método  $\Delta\Delta C_t$ . O grupo calibrador utilizado foram células não submetidas ao estímulo de  $17\beta$ -estradiol.

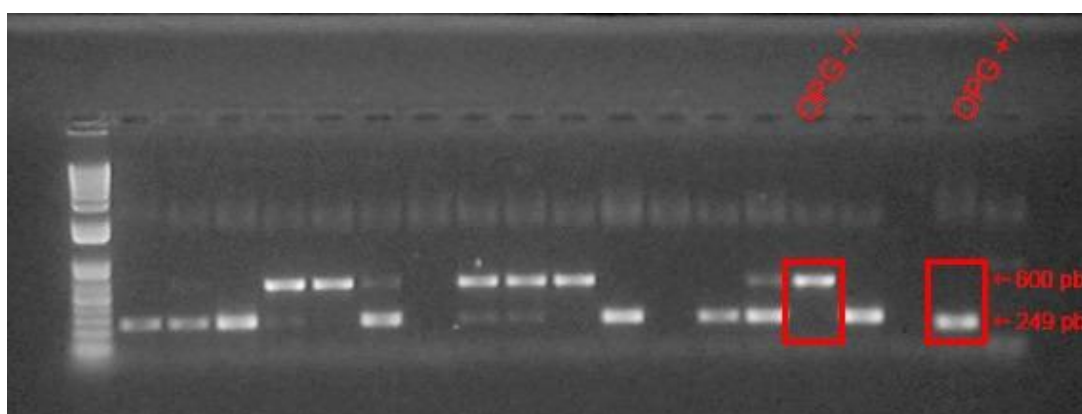
### **3.3. Análise Estatística**

Os dados foram apresentados como médias  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Para finalidade de análise estatística, os valores de OPG séricos abaixo do nível de detecção do ensaio, consideramos a metade do nível de detecção. O nível de significância adotado foi de  $p < 0,05$ . As análises foram feitas para análise de variância (ANOVA) one-way, seguida do pós-teste de Bonferroni.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Genotipagem e avaliação de Ingestão Alimentar e Peso Corporal sob dieta regular:

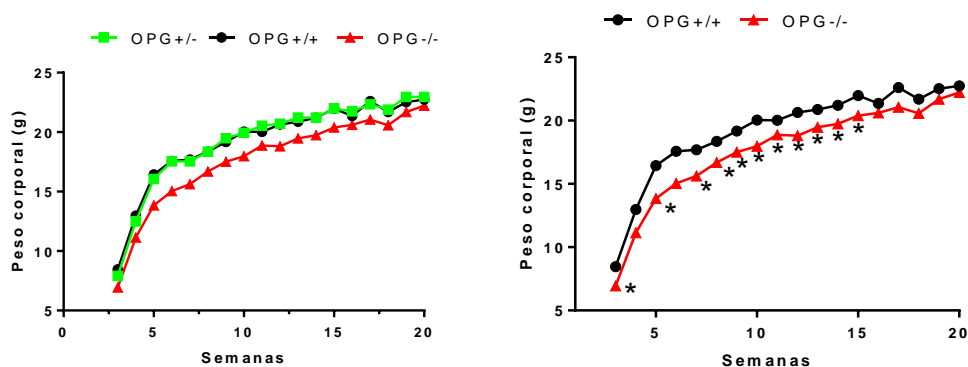
Inicialmente, foram gerados camundongos machos e fêmeas homozigotas ( $OPG^{-/-}$ ) e heterozigotas ( $OPG^{+/-}$ ) com deleção do gene *Tnfrsf11b*, que codifica a osteoprotegerina, e homozigotos selvagens (wildtype -  $OPG^{+/+}$ ), a partir do cruzamento entre animais heterozigotos ( $OPG^{+/-}$ ). O genótipo foi determinado de



acordo com o tamanho da banda conforme especificado em Materiais e Métodos. A figura 4 apresenta fotomicrografia representativa de eletroforese em gel de agarose com as bandas para cada genótipo.

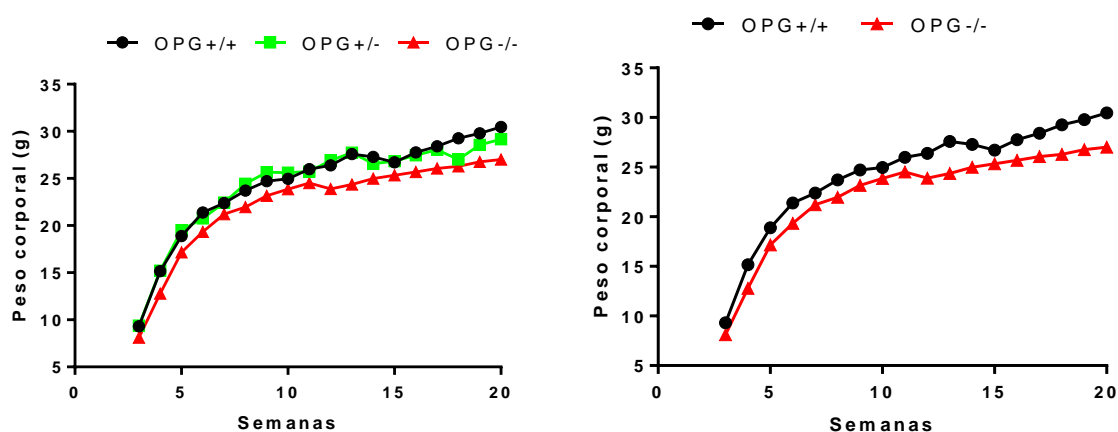
**Figura 4-** Genotipagem dos animais obtidos a partir de cruzamentos entre animais heterozigotos ( $OPG^{+/-}$ ).

A figura 5 apresenta a evolução do peso corporal dos camundongos fêmeas nocautes ( $OPG^{-/-}$ ) e selvagens ( $OPG^{+/+}$ ) semanal durante 20 semanas.



**Figura 5-**Avaliação do peso corporal de camundongos fêmeas durante 20 semanas. (\* $p < 0.05$ )

Entre as fêmeas, ao compararmos os animais selvagens com camundongos homozigotos nocautes para osteoprotegerina (OPG<sup>-/-</sup>), notou-se uma redução média de peso de 2 gramas, com diferenças de peso estatisticamente significativas, ou seja, com  $p < 0,05$ , durante as semanas 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 e 15. Observamos, também, que não houve diferença de peso entre camundongos fêmeas selvagens (OPG<sup>+/+</sup>) e heterozigotos (OPG<sup>+/-</sup>), determinando que a deleção parcial de *Tnfrsf11b* não é capaz de provocar alterações no peso corporal desses animais.

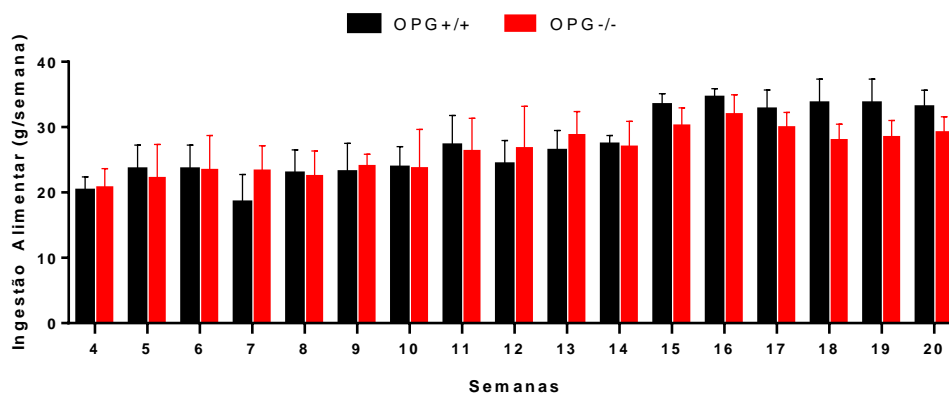


**Figura 6 -** Avaliação do peso corporal de camundongos machos durante 20 semanas.

A mesma redução de peso corporal também foi observada em camundongos machos nocautes quando comparados aos camundongos selvagens (Figura 6), porém o número de animais em cada grupo analisado até o momento é reduzido,

portanto, esse dado de peso corporal deverá ser analisado posteriormente com o aumento do tamanho amostral.

Durante este período, também foi realizada a análise da ingestão alimentar de camundongos machos e fêmeas, obtendo os gráficos abaixo (figura 7).

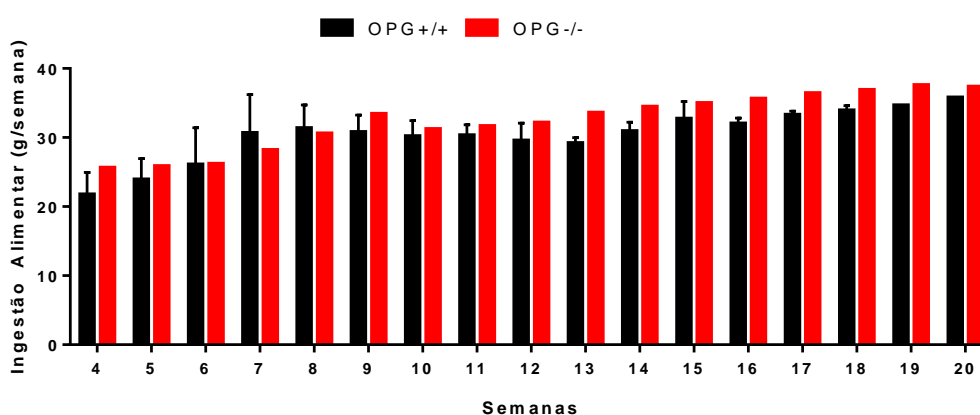


**Figura 7**–Avaliação da Ingestão Alimentar Semanal de camundongos fêmeas por 20 semanas.

Nota-se no gráfico acima (Figura 7), no qual comparou-se a ingestão alimentar semanal (g/semana) de camundongos fêmeas, um padrão de menor ingestão alimentar por camundongos fêmeas nocautes ( $OPG^{-/-}$ ) a partir da 15ª semana de vida, quando comparadas a camundongos fêmeas selvagens ( $OPG^{+/+}$ ), porém essa redução não foi estatisticamente significativa.

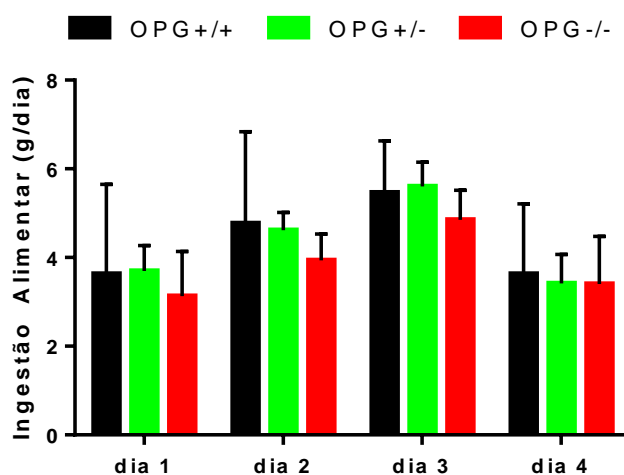
Diferentemente do observado em camundongos fêmeas, a ingestão alimentar semanal de camundongos machos nocautes ( $OPG^{-/-}$ ) foi maior que a observada nos animais controles, porém o resultado é inconclusivo devido ao n reduzido de ambos os grupos experimentais.





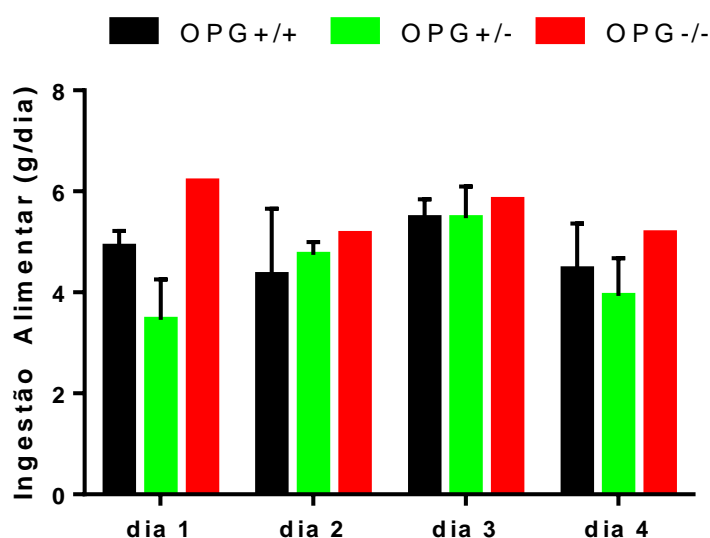
**Figura 8** - Ingestão Alimentar Semanal de camundongos machos por 20 semanas.

Também foi realizada a análise da ingestão alimentar diária individual destes mesmos animais, entre as idades de 18 e 20 semanas, obtendo o gráfico a seguir (figura 9):



**Figura 9** - Ingestão alimentar diária de camundongos fêmeas por 4 dias

Observou-se, durante a análise de ingestão alimentar diária (g/dia) individual em camundongos fêmeas (Figura 9), uma menor ingestão por animais nocautes quando comparados aos animais selvagens e heterozigotos, porém essa redução de ingestão não foi significativa.

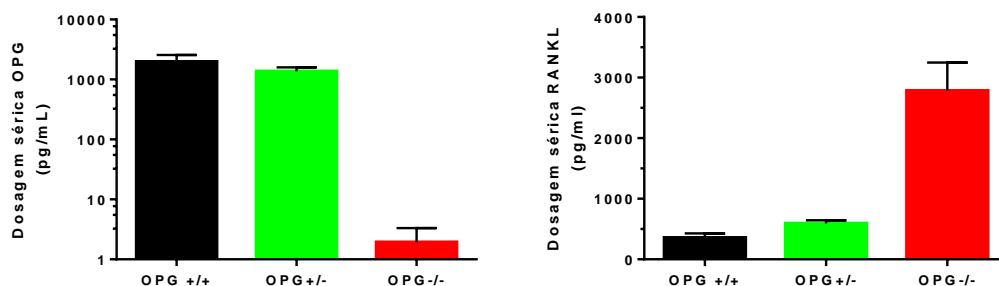


**Figura 10** - Ingestão alimentar diária de camundongos machos por 4 dias

Ao analisarmos a ingestão alimentar diária dos camundongos machos (Figura 10), observamos o mesmo padrão apresentado durante a análise da ingestão alimentar semanal, porém por apresentar um número reduzido de animais nocautes para osteoprotegerina, o resultado é inconclusivo.

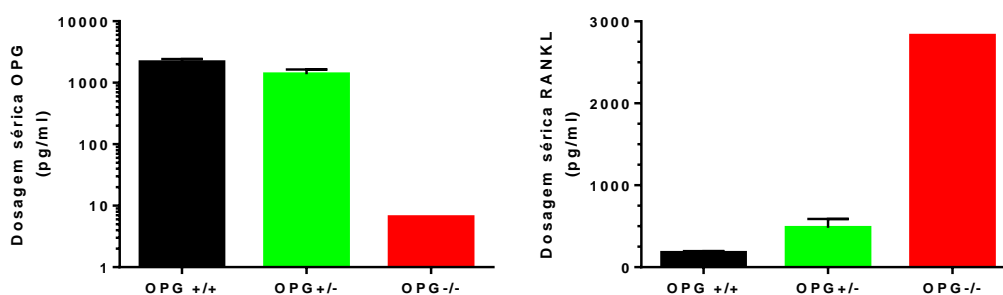
#### **4.2. Concentração plasmática de OPG e RANKL em camundongos machos e fêmeas OPG<sup>+/+</sup> e OPG<sup>-/-</sup>**

Como esperado, observamos que, em camundongos fêmeas, as concentrações séricas de OPG foram significativamente reduzidas no grupo OPG<sup>-/-</sup> ( $1,9 \pm 0,5$  pg/mL), quando comparados aos grupos controles ( $1980,0 \pm 237,8$  pg/mL) e heterozigotos ( $1365,0 \pm 86,4$  pg/mL) (Figura 11), enquanto que os níveis séricos de RANKL se encontravam elevados ( $2782,0 \pm 466,3$  pg/mL), quando comparados aos controles ( $356,3 \pm 177,9$  pg/mL) e heterozigotos ( $592,0 \pm 141,3$  pg/mL).



**Figura 11**–Concentração sérica de OPG e RANKL em camundongos fêmeas.

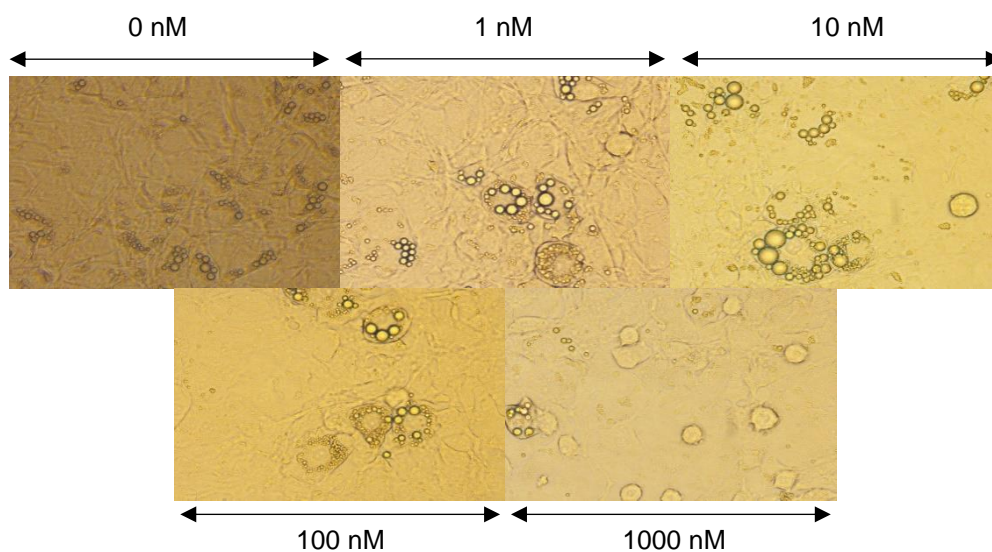
Analisando os dados iniciais obtidos de camundongos machos, observamos que os animais nocautes ( $OPG^{-/-}$ ) apresentaram concentração sérica de OPG menor (6,5 pg/mL), quando comparado aos grupos controles ( $2156 \pm 122,9$  pg/mL) e heterozigotos ( $1378 \pm 257,7$ pg/mL) (Figura 12). Observou-se que camundongos machos nocautes para osteoprotegerina apresentaram valores séricos elevados de RANKL (2827 pg/mL), quando comparados aos controles ( $176,1 \pm 9,06$  pg/mL) e heterozigotos ( $482,5 \pm 39,8$  pg/mL).



**Figura 12** - Dosagem sérica de OPG e RANKL em camundongos machos.

#### 4.3. Efeito do Estradiol na produção de OPG e RANKL em adipócitos 3T3-L1

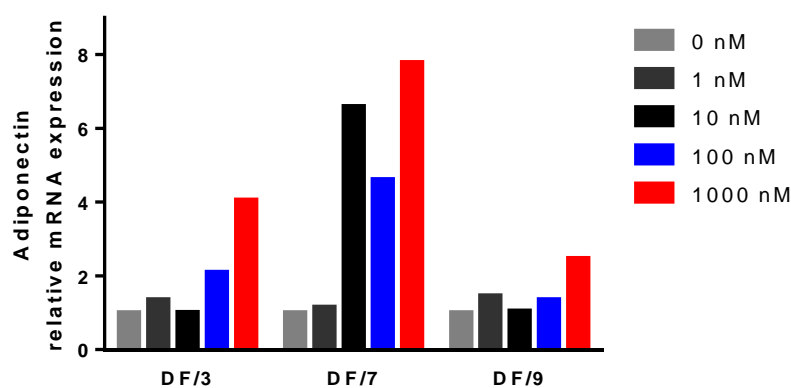
A figura 13 retrata o observado após 8 dias de diferenciação das células 3T3-L1 sob o estímulo de diferentes concentrações de  $17\beta$ -estradiol.



**Figura 13** - Células 3T3-L1 após 8 dias de diferenciação na objetiva de 40x, sob tratamento de 17β-estradiol nas concentrações 0nM, 1nM, 10nM, 100nM e 1000nM.

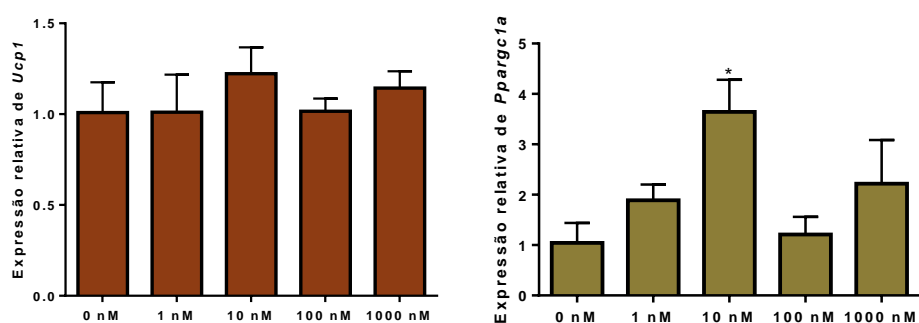
Ao realizar a análise da expressão relativa dos genes alvos, utilizando-se a beta-actina como controle endógeno, notou-se uma baixa expressão de RANKL e OPG nas amostras, uma vez que diversas amostras não atingiram o limiar de detecção.

Ao analisar o padrão de expressão de *Adipoq* nestas células, notou-se também um aumento da expressão concomitante ao aumento da concentração de estradiol, com um aumento expressivo da expressão após 7 dias de diferenciação e tratamento, conforme observado no gráfico abaixo (Figura 14).



**Figura 14** - Expressão relativa de adiponectina nas células 3T3-L1 nos dias 3, 7 e 9 de diferenciação estímulo com estradiol.

Verificou-se, também, a expressão de *Ucp1*, *Prdm16*, *Ppargc1a*, a fim de analisar o processo de *browning* nestas células. Conforme retratado na figura 15 abaixo, observamos uma tendência ao aumento da expressão de *Ppargc1a* nestas células quando estimuladas com concentrações de 1 nM, 10 nM e 1000 nM de 17 $\beta$ -estradiol, com aumento estatisticamente significativo na concentração de 10 nM. Porém, o tratamento destas células não apresentou expressão de *Prdm16* e, quando analisada a expressão relativa de *Ucp1*, notou-se uma expressão similar quando comparada ao controle, com exceção das concentrações 10nM e 1000nM que acarretaram no aumento da expressão deste gene.

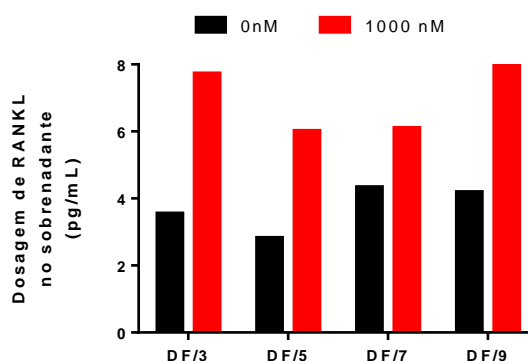


**Figura 15-** Expressão relativa de mRNA de *Ucp1* e *Ppargc1a* em células 3T3-L1 após o estímulo de 8 dias com estradiol.

Foram realizadas também dosagens de OPG e RANKL nos sobrenadantes coletados por kit ELISA R&D Systems, obtendo-se os resultados especificados na tabela e no gráfico abaixo:

	OPG (pg/mL)	RANKL (pg/mL)
D2 0nM	Indetectável	3,552
D2 1000nM	Indetectável	7,731
D4 0nM	Indetectável	2,823
D4 1000nM	Indetectável	6,02
D6 0nM	Indetectável	4,339
D6 1000nM	Indetectável	6,102
D8 0nM	Indetectável	4,189
D8 1000nM	Indetectável	8,366

**Tabela 3** -Concentração de OPG e RANKL no sobrenadante de células 3T3-L1 sob estímulo de diferentes concentrações de 17 $\beta$ -estradiol

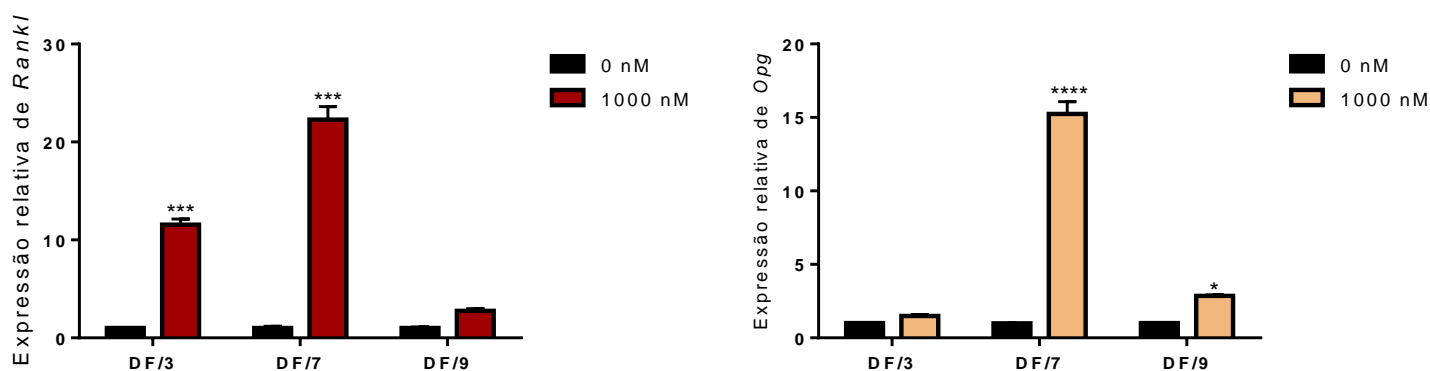


**Figura 16**- Dosagem de RANKL no sobrenadante de células 3T3-L1 durante os dias 3, 5, 7 e 9 com estímulo de estradiol.

Conforme observado acima (Tabela 3), a dosagem de osteoprotegerina foi indetectável, indicando a baixa expressão e produção desta proteína. Entretanto, observou-se a presença de RANKL no sobrenadante com maior dosagem desta proteína sob estímulo de 1000 nM de 17 $\beta$ -estradiol.

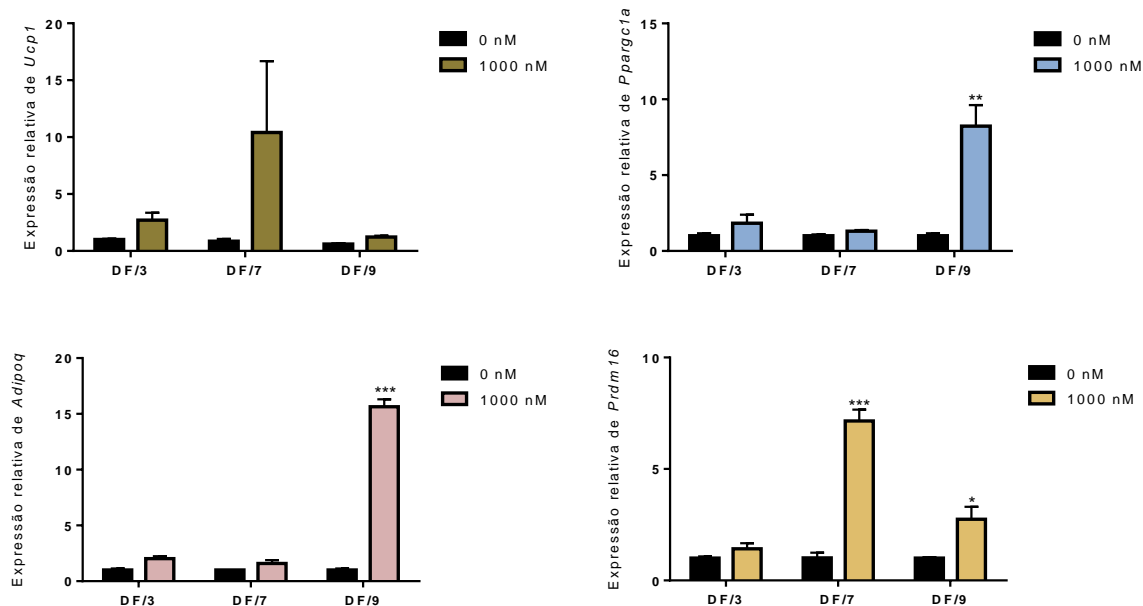
#### 4.4. Efeito do Estradiol na produção de OPG e RANKL em cultura primária de adipócitos

A análise da expressão relativa de *Opg* e *Rankl* em cultura primária de adipócitos está descrita na imagem abaixo (Figura 17).



**Figura 17**- Expressão relativa de mRNA de *Opg* e *Rankl* em adipócitos de cultura primária durante os dias 3, 7 e 9 de estímulo com estradiol.

Notou-se que o tratamento com 17 $\beta$ -estradiol na concentração de 1000 nM acarretou em aumento da expressão relativa de *Opg* e *Rankl*, com destaque para a maior expressão após sete dias de diferenciação.



**Figura 18-** Expressão relativa de mRNA de *Ucp1*, *Prdm16*, *Adipoq* e *Pparg1a* em adipócitos de cultura primária durante os dias 3, 7 e 9 de estímulo com estradiol.

Visando analisar o processo de *browning* nestas células, verificou-se, também, a expressão relativa de *Ucp1*, *Prdm16*, *Pparg1a*, observando uma tendência de aumento de expressão quando estimulados com concentração de 1000 nM de 17 $\beta$ -estradiol, com aumentos estatisticamente significativos da expressão gênica de *Adipoq*, *Pparg1a* e *Prdm16*.

## 5. DISCUSSÃO

O processo de remodelamento ósseo, conforme abordado anteriormente, envolve três citocinas pertencentes à superfamília do receptor de fator de necrose tumoral (TNF), sendo elas a osteoprotegerina (OPG), o ligante do receptor ativador de NFκB (RANKL) e o receptor ativador de NFκB (RANK) (PHETFONG et al., 2016). A proteína OPG, apresenta como função a proteção óssea, tendo o sistema OPG/RANK/RANKL envolvimento no balanço entre a formação e a reabsorção óssea. Além disso, mostrou-se também, a partir da comparação entre indivíduos obesos e não obesos, um aumento nos níveis séricos de OPG em obesos (PÉREZ DE CIRIZA; LAWRIE; VARO, 2015), além da redução de secreção desta proteína sob estímulo de citocinas pró-inflamatórias, envolvidas na obesidade, demonstrando um possível cross-talk entre tecido ósseo e adiposo através de mecanismos endócrinos. Desta forma, buscou-se avaliar, com o uso de camundongos nocautes para osteoprotegerina, a relação desta proteína com a homeostase energética. Observou-se uma redução estatisticamente significativa do peso corporal entre camundongos fêmeas selvagens (OPG<sup>+/+</sup>) e nocautes (OPG<sup>-/-</sup>), bem como uma tendência na menor ingestão alimentar desses animais, sendo necessária a realização de experimentos de gasto metabólico, a fim de determinar que esta redução no peso corporal esteja relacionada ao metabolismo energético. Além disso, podemos supor, também, que esta redução de peso corporal é determinada pela maior porosidade do tecido ósseo, principalmente da região cortical, uma vez que o espessamento do osso cortical se dá devido ao rápido remodelamento da matriz óssea neste local, conforme demonstrado por Zhang et al. (ZHANG et al., 2016).

Hormônios sexuais também apresentam enorme influência na homeostase energética e participam na regulação do metabolismo de adipócitos, bem como no remodelamento específico de depósitos lipídicos (BJÖRNTORP, 1997). O estrógeno, além de apresentar receptores no Sistema Nervoso e tecido ósseo, também apresenta expressão de seus receptores em tecidos adiposos subcutâneo e visceral (MAUVAIS-JARVIS; CLEGG; HEVENER, 2013), atuando na modulação metabólica em adipócitos, acarretando em hiperplasia e hipertrofia destas células com a deleção destes receptores em camundongos (MAYES; WATSON, 2004). Sabendo-se, também, que a osteoprotegerina é expressa nestes tecidos, tornou-se válido avaliar o efeito deste hormônio sob a expressão e produção desta proteína. A análise da



expressão relativa de *Opg* e *Rankl* em linhagens celulares de pré-adipócitos sob diferenciação mostrou uma baixa expressão destas, enquanto que, a dosagem destas proteínas no sobrenadante mostrou que o tratamento com  $17\beta$ -estradiol levou ao aumento gradativo da concentração de RANKL no sobrenadante, corroborando com a hipótese de Takeshita *et al*, que consistia na expressão e secreção de *RANKL* em células no estágio de pré-adipócitos (TAKESHITA *et al.*, 2014). No entanto, o aumento de RANKL observado na maior concentração de tratamento (1000 nM) quando comparado ao controle mostra seu papel inverso ao observado no metabolismo ósseo, uma vez que o aumento da expressão de *Rankl* no tecido ósseo está diretamente relacionado ao aumento da adiposidade com o envelhecimento. O mesmo aumento foi observado na expressão relativa de *Rankl* na cultura primária de adipócitos. Tal aumento, induzido pelo estradiol, poderia estar relacionado ao desenvolvimento de um papel protetor desta proteína no tecido adiposo, uma vez que o estímulo com estradiol acarreta na regulação metabólica positiva de adipócitos, prevenindo a obesidade.

O estrógeno também atua promovendo o aumento da expressão de UCP-1 nos tecidos, intensificando a propriedade termogênica e atuando como potencializador do processo de *browning* (LIZCANO; GUZMAN, 2014). Com isso, o aumento no acúmulo de gotículas de lipídio, configurando adipócitos multiloculares, está relacionado a uma menor resistência a insulina e a uma caracterização menor do adipócito, uma vez que adipócitos hipertróficos apresentam gotícula unilocular, conforme demonstrado na figura 1. Observou-se também um aumento da expressão de adiponectina simultâneo ao aumento da concentração de estradiol (Figura 14), corroborando com o esperado, uma vez que, níveis reduzidos de E2 estão associados com ganho de peso como mostrado por Cho *et al*, e já se sabe que o hormônio adiponectina se encontra em baixos níveis em indivíduos obesos, conforme mostrado por Bastard *et al* (BASTARD *et al.*, 2006; CHOE *et al.*, 2016).

Al-Qahtani *et al.* mostraram que a expressão elevada de *stat3* no tecido adiposo visceral de animais tratados com dieta hiperlipídica e estradiol está envolvida com a perda de adiposidade nestes animais via aumento do gasto energético. Concomitantemente, foi observado o aumento na expressão de *Ucp1* nestes tecidos, contribuindo para a transformação do tecido adiposo branco em tecido adiposo bege, e, desta forma, associando a modulação da expressão de *Ucp1* via STAT3 (AL-

QAHTANI et al., 2017). Com isso, sabendo-se que o estradiol está relacionado ao processo de *browning* do tecido adiposo branco (CHOE et al., 2016; LÓPEZ; TENA-SEMPERE, 2017), notou-se que o tratamento com 17 $\beta$ -estradiol, tanto em linhagem celular, quanto em adipócitos de cultura primária, aumentou a expressão relativa de marcadores de *browning* como *Ucp1*, *Prdm16* e *Ppargc1a* (KIM et al., 2016; LÓPEZ; TENA-SEMPERE, 2017), podendo o aumento observado na expressão e produção de RANKL estar associado a um possível papel protetivo em tecidos adiposos brancos, uma vez que o processo de *browning* nestes tecidos também se encontra aumentado.

## 6. CONCLUSÕES

### 6.1. Conclusões

A partir dos resultados apresentados e da discussão realizada, foi possível estabelecer algumas considerações finais para o presente trabalho. Tendo em vista que o tecido adiposo exerce um importante papel na homeostase energética, atuando como reservatório energético, e que o estrógeno é um importante fator para a regulação do metabolismo de adipócitos e o remodelamento dos depósitos de lipídeos, tornou-se relevante o estudo sobre a interação da osteoprotegerina e estradiol na homeostase energética. Os estudos realizados neste projeto mostraram que o nocaute total de osteoprotegerina em camundongos promove redução de peso corporal e ingestão alimentar nestes animais. Entretanto, experimentos envolvendo a análise do gasto energético precisam ser realizados afim de determinar essa relação. Observou-se também que adipócitos submetidos a estímulos de diferentes concentrações de  $17\beta$ -estradiol apresentaram um aumento na expressão e produção de RANKL em adipócitos, bem como de marcadores de *browning* como *Ucp1* e *Ppargc1a*, associando o aumento do processo de *browning* em tecidos adiposos brancos, quando submetidos ao tratamento com estrógeno, com um possível papel protetivo de RANKL nestes tecidos. Para avaliar também a relação da osteoprotegerina com a homeostase energética, e a sua influência sob os efeitos do estradiol, torna-se crucial, também, a realização da análise de peso corporal, ingestão alimentar e gasto energético em animais tratados com dieta hiperlipídica e submetidos à ovariectomia.

## 7. REFERÊNCIAS

AL-QAHTANI, S. M.; BRYZGALOVA, G.; VALLADOLID-ACEBES, I.; KORACH-ANDRÉ, M.; DAHLMAN-WRIGHT, K.; EFENDIĆ, S.; BERGGREN, P.; PORTWOOD, N.  $17\beta$ -Estradiol suppresses visceral adipogenesis and activates brown adipose tissue-specific gene expression. **Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation**, v. 29, n. 1, p. 13–26, 2017.

AN, J. J.; HAN, D. H.; KIM, D. M.; KIM, S. H.; RHEE, Y.; LEE, E. J.; LIM, S. K. Expression and regulation of osteoprotegerin in adipose tissue. **Yonsei Medical Journal**, v. 48, n. 5, p. 765–772, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3349/ymj.2007.48.5.765>>.

ANA ALONSO, C. G. Neuroprotective role of estrogens: relationship with insulin/IGF-1 signaling. **Frontiers in Bioscience**, p. 607–619, 2012.

APONTE, Y.; ATASOY, D.; STERNSON, S. M. AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. **Nature Neuroscience**, v. 14, n. 3, p. 351–355, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nn.2739>>.

BARTON, G. M. A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 2, p. 413–420, 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2214713>>.

BASTARD, J. P.; MAACHI, M.; LAGATHU, C.; KIM, M. J.; CARON, M.; VIDAL, H.; CAPEAU, J.; FEVE, B. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. **European Cytokine Network**, v. 17, n. 1, p. 4–12, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>.

BERNARDI, S.; FABRIS, B.; THOMAS, M.; TOFFOLI, B.; TIKELLIS, C.; CANDIDO, R.; CATENA, C.; MULATERO, P.; BARBONE, F.; RADILLO, O.; ZAULI, G.; SECCHIERO, P. Osteoprotegerin increases in metabolic syndrome and promotes adipose tissue proinflammatory changes. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 394, n. 1–2, p. 13–20, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2014.06.004>>.

BJÖRNTORP, P. Body Fat Distribution, Insulin Resistance, and Metabolic Diseases. **Nutrition**, v. 13, n. 9, p. 795–803, 1997.

BLACK, D. M.; ROSEN, C. J. Postmenopausal Osteoporosis. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 3, p. 254–262, 2016. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMcp1513724>>.

BOLEGO, C.; CIGNARELLA, A.; STAELS, B.; CHINETTI-GBAGUIDI, G. Macrophage function and polarization in cardiovascular disease: a role of estrogen signaling? **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 33, n. 6, p. 1127–1134, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1161/atvbaha.113.301328>>.

BOU KHALIL, R.; SOUAIBY, L.; FARÈS, N. The importance of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis as a therapeutic target in anorexia nervosa. **Physiology and Behavior**, v. 171, p. 13–20, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.12.035>>.

CENCI, S.; WEITZMANN, M. N.; ROGGIA, C.; NAMBA, N.; NOVACK, D.; WOODRING, J.; PACIFICI, R. Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF-alpha. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 106, n. 10, p. 1229–1237, 2000. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1172/jci11066>>.

CHOE, S. S.; HUH, J. Y.; HWANG, I. J.; KIM, J. I.; KIM, J. B. Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. **Frontiers in Endocrinology**, v. 7, p. 30, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3389/fendo.2016.00030>>.

CHONDRONIKOLA, M.; SIDOSSIS, L. S. Brown and Beige fat: From molecules to physiology. **BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids**, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.05.014>>.

COLVIN, G. B.; SAWYER, C. H. Induction of Running Activity by Intracerebral Implants of Estrogen in Ovariectomized Rats. **Neuroendocrinology**, v. 4, p. 309–320, 1969.

FAIN, J. N.; TAGELE, B. M.; CHEEMA, P.; MADAN, A. K.; TICHANSKY, D. S. Release of 12 adipokines by adipose tissue, nonfat cells, and fat cells from obese women. **Obesity**, v. 18, n. 5, p. 890–896, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/oby.2009.335>>.

FEUERER, M.; HERRERO, L.; CIPOLLETTA, D.; NAAZ, A.; WONG, J.; LEE, J.; GOLDFINE, A.; BENOIST, C.; SHOELSON, S.; MATHIS, D. Fat Treg cells: a liaison

between the immune and metabolic systems. **Nature**, v. 15, n. 8, p. 930–939, 2009.

FRANK, A.; BROWN, L. M.; CLEGG, D. J. The role of hypothalamic estrogen receptors in metabolic regulation. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 35, n. 4, p. 550–557, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.yfrne.2014.05.002>>.

FRIAS, J. P.; MACARAEG, G. B.; OFRECIO, J.; YU, J. G.; OLEFSKY, J. M.; KRUSZYNSKA, Y. T. Decreased Susceptibility to Fatty Acid – Induced Peripheral Tissue Insulin Resistance in Women. **Diabetes**, v. 50, 2001.

GAUTRON, L.; ELMQUIST, J. K.; WILLIAMS, K. W. Neural control of energy balance: Translating circuits to therapies. **Cell**, v. 161, n. 1, p. 133–145, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.023>>.

GEARY, N.; ASARIAN, L.; KORACH, K. S.; PFAFF, D. W.; OGAWA, S. Deficits in E2-dependent control of feeding, weight gain, and cholecystokinin satiation in ER- $\alpha$  null mice. **Endocrinology**, v. 142, n. 11, p. 4751–4757, 2001.

GÓMEZ-HERNÁNDEZ, A.; BENEIT, N.; DÍAZ-CASTROVERDE, S.; ESCRIBANO, Ó. Differential Role of Adipose Tissues in Obesity and Related Metabolic and Vascular Complications. **International Journal of Endocrinology**, v. 2016, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2016/1216783>>.

GREGOR, M. F.; HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammatory Mechanisms in Obesity. **Annual Review of Immunology**, v. 29, n. 1, p. 415–445, 2011. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-immunol-031210-101322>>.

HARSLOF, T.; HUSTED, L. B.; CARSTENS, M.; STENKJAER, L.; SORENSEN, L.; PEDERSEN, S. B.; LANGDAHL, B. L. The expression and regulation of bone-acting cytokines in human peripheral adipose tissue in organ culture. **Hormone and Metabolic Research**, v. 43, n. 7, p. 477–482, 2011.

HEINE, P. A.; TAYLOR, J. A.; IWAMOTO, G. A.; LUBAHN, D. B.; COOKE, P. S. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor- $\alpha$  knockout mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2000.

HOTAMISLIGIL, G. S.; ARNER, P.; CARO, J. F.; ATKINSON, R. L.; SPIEGELMAN, B. M. Rapid Publication Obesity and Insulin Resistance. **Journal of Clinical**

**Investigation**, v. 95, n. January, p. 2409–2415, 1995.

IKEDA, T.; UTSUYAMA, M.; HIROKAWA, K. Expression profiles of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand, receptor activator of nuclear factor kappaB, and osteoprotegerin messenger RNA in aged and ovariectomized rat bones. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 16, n. 8, p. 1416–1425, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1359/jbmr.2001.16.8.1416>>.

IKEDA, T.; YAMAGUCHI, A.; YOKOSE, S.; NAGAI, Y.; YAMATO, H.; NAKAMURA, T.; TSURUKAMI, H.; TANIZAWA, T.; YOSHIKI, S. Changes in biological activity of bone cells in ovariectomized rats revealed by in situ hybridization. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 11, n. 6, p. 780–788, 1996. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/jbmr.5650110609>>.

KAJIMURA, S.; SPIEGELMAN, B. M.; SEALE, P. Review Brown and Beige Fat: Physiological Roles beyond Heat Generation. **Cell Metabolism**, v. 22, n. 4, p. 546–559, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2015.09.007>>.

KALU, D. N. The ovariectomized rat model of postmenopa bone loss. **Bone and Mineral**, v. 15, p. 175–191, 1991.

KELLY, M. J.; RONNEKLEIV, O. K. Minireview: neural signaling of estradiol in the hypothalamus. **Molecular Endocrinology**, v. 29, n. 5, p. 645–657, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1210/me.2014-1397>>.

KIM, S.-N.; JUNG, Y.-S.; KWON, H.-J.; SEONG, J. K.; GRANNEMAN, J. G.; LEE, Y.-H. Sex differences in sympathetic innervation and browning of white adipose tissue of mice. **Biology of Sex Differences**, v. 7, n. 1, p. 67, 2016. Disponível em: <<http://bsd.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13293-016-0121-7>>.

LINDBERG, M. K.; WEIHUA, Z.; ANDERSSON, N.; MOVERARE, S.; GAO, H.; VIDAL, O.; ERLANDSSON, M.; WINDAHL, S.; ANDERSSON, G.; LUBAHN, D. B.; CARLSTEN, H.; DAHLMAN-WRIGHT, K.; GUSTAFSSON, J. A.; OHLSSON, C. Estrogen receptor specificity for the effects of estrogen in ovariectomized mice. **Journal of Endocrinology**, v. 174, n. 2, p. 167–178, 2002. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>.

LIZCANO, F.; GUZMAN, G. Estrogen Deficiency and the Origin of Obesity during

Menopause. **Biomed Research International**, v. 2014, p. 757461, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2014/757461>>.

LÓPEZ, M.; TENA-SEMPERE, M. Estradiol and brown fat. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.beem.2016.08.004>>.

LÓPEZ, M.; TENA-SEMPERE, M. Estradiol effects on hypothalamic AMPK and BAT thermogenesis: A gateway for obesity treatment? **Pharmacology and Therapeutics**, v. 178, p. 109–122, 2017.

LUMENG, C. N.; DELPROPOSTO, J. B.; WESTCOTT, D. J.; SALTIEL, A. R. Phenotypic Switching of Adipose Tissue Macrophages With Obesity Is Generated by Spatiotemporal Differences in Macrophage Subtypes. **Diabetes**, v. 57, p. 3239–3246, 2008.

LUMENG, C. N.; SALTIEL, A. R. Review series Inflammatory links between obesity and metabolic disease. **Life Sciences**, v. 121, n. 6, p. 2111–2117, 2011.

MANCUSO, P. The role of adipokines in chronic inflammation. **ImmunoTargets and Therapy**, v. 5, p. 47–56, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2147/itt.s73223>>.

MARTÍNEZ DE MORENTIN, P. B.; GONZÁLEZ-GARCÍA, I.; MARTINS, L.; LAGE, R.; FERNÁNDEZ-MALLO, D.; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, N.; RUÍZ-PINO, F.; LIU, J.; MORGAN, D. A.; PINILLA, L.; GALLEGRO, R.; SAHA, A. K.; KALSBECK, A.; FLIERS, E.; BISSCHOP, P. H.; DIÉGUEZ, C.; NOGUEIRAS, R.; RAHMOUNI, K.; TENA-SEMPERE, M.; LÓPEZ, M. Paper Machine Quality Control Systems - Volume 1: Measurement Systems and Product Variability. **Cell Metabolism**, 2014. Disponível em: <<http://www.tappi.org/Bookstore/Books--CD-ROMs/Books/Papermaking/Paper-Machine-Quality-Control-Systems---Volume-1-Measuremen.aspx>>.

MAUVAIS-JARVIS, F. Estrogen and androgen receptors: regulators of fuel homeostasis and emerging targets for diabetes and obesity. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 22, n. 1, p. 24–33, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2010.10.002>>.

MAUVAIS-JARVIS, F.; CLEGG, D. J.; HEVENER, A. L. The role of estrogens in control of energy balance and glucose homeostasis. **Endocrine Reviews**, v. 34, n. 3, p. 309–



338, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1210/er.2012-1055>>.

MAYES, J. S.; WATSON, G. H. Direct effects of sex steroid hormones on adipose tissues and obesity. **Obesity Reviews**, v. 5, n. 4, p. 197–216, 2004.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428–435, 2008.

NIADA, S.; GIANNASI, C.; FERREIRA, L. M.; MILANI, A.; ARRIGONI, E.; BRINI, A. T. 17beta-estradiol differently affects osteogenic differentiation of mesenchymal stem/stromal cells from adipose tissue and bone marrow. **Differentiation**, v. 92, n. 5, p. 291–297, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.diff.2016.04.001>>.

PACIFICI, R. Role of T cells in ovariectomy induced bone loss-revisited. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 27, n. 2, p. 231–239, 2012.

PALLOTTINI, V.; BULZOMI, P.; GALLUZZO, P.; MARTINI, C.; MARINO, M. Estrogen Regulation of Adipose Tissue Functions: Involvement of Estrogen Receptor Isoforms. **Infectious Disorders -Drug Targets**, v. 8, p. 52–60, 2008.

PANTOULI, E.; BOEHM, M. M.; KOKA, S. Inflammatory cytokines activate p38 MAPK to induce osteoprotegerin synthesis by MG-63 cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 329, n. 1, p. 224–229, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.01.122>>.

PÉREZ DE CIRIZA, C.; LAWRIE, A.; VARO, N. Osteoprotegerin in cardiometabolic disorders. **International Journal of Endocrinology**, v. 2015, 2015.

PHETFONG, J.; SANVORANART, T.; NARTPRAYUT, K.; NIMSANOR, N.; SEENPRACHAWONG, K.; PRACHAYASITTIKUL, V.; SUPOKAWAJ, A. Osteoporosis: the current status of mesenchymal stem cell-based therapy. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 21, n. 1, p. 12, 2016. Disponível em: <<http://cmbl.biomedcentral.com/articles/10.1186/s11658-016-0013-1>>.

RAISZ, L. G. Science in medicine Pathogenesis of osteoporosis : concepts , conflicts , and prospects. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 12, 2005.

ROSEN, E. D.; SPIEGELMAN, B. M. Review What We Talk About When We Talk About Fat. **Cell**, v. 156, n. 1–2, p. 20–44, 2013. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.012>>.

SEALE, P. Transcriptional control of brown adipocyte development and thermogenesis. **International Journal of Obesity**, v. 34, n. S1, p. S17–S22, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ijo.2010.178>>.

SUYAMA, S.; LEI, W.; KUBOTA, N.; KADOWAKI, T.; YADA, T. Adiponectin at physiological level glucose-independently enhances inhibitory postsynaptic current onto NPY neurons in the hypothalamic arcuate nucleus. **Neuropeptides**, v. 65, n. January, p. 1–9, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.npep.2017.03.003>>.

TAKESHITA, S.; FUMOTO, T.; NAOE, Y.; IKEDA, K. Age-related marrow adipogenesis is linked to increased expression of RANKL. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 24, p. 16699–16710, 2014.

TIMPER, K.; BRÜNING, J. C. Hypothalamic circuits regulating appetite and energy homeostasis: pathways to obesity. **Disease Models & Mechanisms**, v. 10, n. 6, p. 679–689, 2017. Disponível em: <<http://dmm.biologists.org/lookup/doi/10.1242/dmm.026609>>.

UGUR-ALTUN, B.; ALTUN, A. Circulating Leptin and Osteoprotegerin Levels Affect Insulin Resistance in Healthy Premenopausal Obese Women 1. **Archives of Medical Research**, v. 38, 2007.

WANG, Q. P.; YANG, L.; LI, X. P.; XIE, H.; LIAO, E. Y.; WANG, M.; LUO, X. H. Effects of 17beta-estradiol on adiponectin regulation of the expression of osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand. **Bone**, v. 51, n. 3, p. 515–523, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2012.05.011>>.

XU, Y.; NEDUNGADI, T. P.; ZHU, L.; SOBHANI, N.; IRANI, B. G.; DAVIS, K. E.; ZHANG, X.; ZOU, F.; GENT, L. M.; HAHNER, L. D.; KHAN, S. A.; ELIAS, C. F.; ELMQUIST, J. K.; CLEGG, D. J. Distinct hypothalamic neurons mediate estrogenic effects on energy homeostasis and reproduction. **Cell Metabolism**, v. 14, n. 4, p. 453–465, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2011.08.009>>.

ZHANG, L.; LIU, M.; ZHOU, X.; LIU, Y.; JING, B.; WANG, Xi.; ZHANG, Q.; SUN, Y. Role of Osteoprotegerin ( OPG ) in Bone Marrow Adipogenesis. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 200072, p. 681–692, 2016.