



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA

Ingrid Felicidade

Análise de *pathway* e *network* em tecido adiposo *in vivo* e o papel da vitamina D na adipogênese *in vitro*

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Regina Ribeiro
Coorientador: Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani
Coorientadora: Profa. Dra. Susan LM Coort

Botucatu
2016

Ingrid Felicidade

Análise de *pathway* e *network* em tecido adiposo *in vivo* e o papel da vitamina D na adipogênese *in vitro*

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Regina Ribeiro
Coorientador: Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani
Coorientadora: Profa. Dra. Susan LM Coort

Botucatu
2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Felicidade, Ingrid.

Análise de pathway e network em tecido adiposo in vivo e o papel da vitamina D na adipogênese in vitro / Ingrid Felicidade. - Botucatu, 2016

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Lúcia Regina Ribeiro

Coorientador: Mário Sérgio Mantovani

Coorientador: Susan LM Coort

Capes: 40105008

1. Ciclo celular. 2. Envelhecimento. 3. Expressão gênica. 4. Obesidade. 5. Adipócitos. 6. Vitamina D.

Palavras-chave: Ciclo celular; SGBS; Senescência.

Ingrid Felicidade

Análise de *pathway* e *network* em tecido adiposo *in vivo* e o papel da vitamina D na adipogênese *in vitro*

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Regina Ribeiro
Coorientador: Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani
Coorientadora: Profa. Dra. Susan LM Coort

Comissão Examinadora

Profa. Dra. Glenda Nicioli da Silva
Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP)

Prof. Dr. Daniel Araki Ribeiro
Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)

Profa. Dra. Camila Renata Côrrea
Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB/UNESP)

Profa. Dra. Maria Inês de Moura Campos Pardini
Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB/UNESP)

Profa. Dra. Lúcia Regina Ribeiro
Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB/UNESP)

Botucatu, 26 de Fevereiro de 2016.

A Deus, meu Tudo
À Maria, minha Mãe e Rainha
Aos meus pais, minha base e fortaleza
Ao meu amado esposo, meu refúgio e norte

AGRADECIMENTOS

A Deus,

Meu Amado Senhor, obrigada por me guiar sob a sua proteção e por permitir que se realizassem os corretos planos para mim, e não, somente, os meus sonhos. Eu te louvo e agradeço pelo término de mais essa etapa.

Que o Senhor me ensine, cada dia mais, a amar como Ti e ter o dom da fé e da sabedoria para as vitórias e desafios vindouros.

“Eu creio nas promessas de Deus,

Eu creio nas promessas do meu Senhor.

Se sou fiel no pouco, Ele me confiará mais,

Se sou fiel no pouco, meus passos guiará.”

(Eugênio Jorge)

À Mãe, Rainha e Vencedora três vezes admirável de Schoenstatt,

“Nada sem Vós! Nada sem nós!”

Mãe, obrigada pelo auxílio espiritual, por me educar na fé, mas, principalmente, como pessoa.

Obrigada por permitir e me guiar dentro da escola do Pe. José Kentenich, nosso Pai e

Fundador que cada dia mais me ensina e mostra um novo mundo.

Obrigada Mãe pelo colo e incondicional amor!

"Sem dificuldades, sem sacrifícios, sem luta, jamais chegaremos a ser algo grande.

Grandes homens crescem na cruz!"

(Pe. José Kentenich)

Aos meus pais, Antonio e Rosangela,

Somente tenho a agradecer pelo amor incondicional e apoio constante. Obrigada por me darem os bens mais preciosos, como caráter e educação. Com base em nossa família, sei que tudo posso e consigo, com esforço e humildade. Amo vocês! Obrigada por tudo!

Ao meu esposo Alisson,

Que sorte tenho eu por ter uma pessoa como você ao meu lado. Nessa matemática maluca onde $1+1=1$, e isso, incrivelmente, funciona muito bem conosco, eu não tenho palavras para descrever o quanto seu apoio e companheirismo tem me ajudado desde o nosso primeiro dia de namoro! Você tem acompanhado, graças a Deus, cada fase desde a graduação e sem seu

suporte, tudo teria sido muito mais difícil. Você é a personificação da palavra companheirismo. Obrigada pelo amor, carinho e amizade! Te amo para todo o sempre.

“Se os olhares se cruzarem e, neste momento, houver o mesmo brilho intenso entre eles, fique alerta: pode ser a pessoa que você está esperando desde o dia em que nasceu.

Se o primeiro e o último pensamento do seu dia for essa pessoa, se a vontade de ficar juntos chegar a apertar o coração, agradeça: Deus te mandou um presente: O Amor.”

(Carlos Drummond de Andrade)

Aos meus familiares,

Agradeço por cada membro da minha família, assim como os da família de meu esposo, que agora também são meus, por terem vibrado comigo cada conquista e passo dado. Em especial, meu Tio Ronaldo, o qual eu vejo desde criança estudar sem fim para realizar o sonho de se tornar um docente, com toda certeza essa sementinha foi por ti, também, plantada.

Amo todos vocês!

À minha orientadora, Profa. Dra. Lúcia Regina Ribeiro

Lúcia, muito obrigada por ter me aceito para continuar trabalhando com você durante todo o doutorado. Obrigada pela orientação, paciência e conhecimento passado nesses últimos 6 anos, foi muito gratificante. Obrigada por todas as oportunidades que você me ajudou a alcançar. Somente tenho a agradecer por tê-la como orientadora nesse momento de formação acadêmica e profissional. Mais uma vez, anseio que nossa parceria não se encerre por aqui e que possamos continuar a trabalhar juntas ao longo da minha carreira profissional.

Minha mais sincera gratidão!

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani

Obrigada Mário por deixar as portas do seu laboratório, e do seu grupo de estudo, sempre abertas para mim. Suas discussões e conhecimento foram essenciais para que o trabalho fosse concretizado, em especial o cultivo celular. Obrigada por me co-orientar nesses últimos 6 anos e que nossa colaboração perdure por muito tempo.

Muito obrigada Mário, a sua pessoa e experiência tornaram minha base ainda mais sólida.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Susan Coort

O mundo dá voltas, e por vezes nos traz ótimas surpresas. Obrigada por toda ajuda, comprometimento e atenção durante o meu estágio na Maastricht University. A sua dedicação

e paciência em me ensinar foram essenciais para que eu aprendesse e conseguisse aplicar esses conhecimentos no projeto e artigo desenvolvido durante o período que estive com vocês. Obrigada por me acolher e permitir que eu conhecesse sua família. Tenho certeza que ainda faremos muitas colaborações no futuro e sempre guardarei com carinho sua amizade e seus ensinamentos. Ainda tenho muito a aprender sobre bioinformática e tenho certeza que muito desse conhecimento será adquirido através de você. Muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Chris Evelo,

Chris, obrigada pela confiança que deposita em mim há tantos anos e, por isso, ter aberto as portas do seu grupo de pesquisa, sem nenhuma cerimônia. Me sinto muito feliz e honrada por ter integrado, mesmo por pouco tempo, esse excelente grupo. Suas discussões, conversas e correções me ajudaram, e ainda ajudam, muito para a finalização dos trabalhos e definições de novos projetos. Tenho certeza que ainda mais poderá ser feito no futuro. Por hora, deixo meu muito obrigada.

Ao Grupo de pesquisa do Laboratório de Genética Toxicológica – UEL,

Meu desejo no mestrado era que nossa amizade perdurasse pelos próximos e próximos anos, e agora, com a certeza de que fui atendida, peço saúde para continuarmos vivendo sempre essa amizade. Em especial, Lilian, Gláucia, Andressa, Simone, Bruna, Thalita, Daniele Sartori, Eliane e Adrivânio, vocês fazem a diferença na minha vida! Obrigada pelos anos de amizade, pela paciência em discutir dados, ler e reler meus textos, pela disponibilidade de trabalhar dias e horas comigo, por serem meus dois braços enquanto eu não estava no Brasil. Eu sempre digo: com vocês os dias passam mais rápido! Espero que Deus abençoe o futuro de cada um e que nossos caminhos sempre se cruzem. E que esse grupo continue sendo maravilhoso e acolhendo todos que entram. Amo vocês!

Às MSc. Daniela Santos e Dra. Vanessa Peresi,

Sou muito grata por nossas vidas terem se cruzado e ter feito com que eu ganhasse duas amigas. Muito obrigada por todo o companheirismo, palavras de apoio, discussões e correções, vocês fazem parte das maravilhosas surpresas que a pós-graduação me proporcionou. Que Deus abençoe sempre o caminho de vocês e que mantenha nossas amizades. Embora distantes fisicamente, sei que a presença de vocês é constante.

Ao Grupo de pesquisa BiGCaT, Maastricht University

Agradeço pela oportunidade de ter integrado o grupo e pela disponibilidade de todos em me ensinar e ajudar no dia a dia. Vocês são um ótimo grupo e desejo todo o sucesso no futuro.

Agradeço especialmente ao Nuno, assim como a Vera, pela amizade dentro e fora do departamento, à Martina pela ajuda e dedicação, ao Lars por mais uma vez me ensinar e ajudar com a estatística, e, junto com o Egon, dividirem a sala comigo, deixando trabalho mais leve. Ao Johnathan, Fred, Linda, Ryan, Elisa, Anwasha, Myrtle e Mirella pela amizade e companhia. Foi um enorme prazer e uma experiência única conhecer um lugar lindo com pessoas ainda melhores. Sucesso e nos vemos por aí.

Ao Programa de Pós-graduação em Patologia (UNESP), nas pessoas da Dra. Márcia Guimarães da Silva e Dra. Denise Fecchio

À Dra. Márcia que nunca mediu esforços para me ajudar enquanto pessoa, e coordenadora do programa, e à Dra. Denise por zelar e aprimorar o programa cada dia mais, fazendo o possível na coordenação para que o programa e os alunos não parem de crescer. Muito obrigada pela oportunidade.

À Vânia do Amaral Soler – UNESP

Vânia, MUITO OBRIGADA pelo apoio nesses últimos anos. Feliz de nós, alunos e docentes do programa, que temos você sempre disposta a ajudar e atender. Obrigada por toda ajuda!

Você não faz ideia como a sua pessoa, o carinho dispensado no trabalho diário, foram essenciais na minha formação. Que Deus a guarde e abençoe sempre.

Muitíssimo obrigada!

Ao Dr. Carsten Carlberg,

Carsten obrigada pela oportunidade de trabalhar com você e seu grupo de pesquisa. Seus conhecimentos em vitamina D são ímpares, e eu me sinto lisonjeada de ter colaborado com você e ainda encontrar as portas abertas para sanar todas as minhas dúvidas. Obrigada.

À Sabine Seuter e Jussi Ryyänen,

Pela amizade e conhecimento. Sabine muito obrigada por sempre estar disposta a me ajudar e sempre será uma grata surpresa encontra-la em congressos. Jussi, obrigada por ter deixado a sua tese em segundo plano para me acompanhar e me ensinar o que sabia sobre o cultivo celular, sei que fez o seu melhor e o que estava ao seu alcance. Obrigada por tudo!

À MSc. Juliana Lara Padovani,

Muito obrigada por toda a sua ajuda. Em meio a problemas, sem o seu apoio, eu não sei como conseguiria resolver tudo a tempo. Que Deus guarde seu bondoso coração e espero contribuir no futuro toda a ajuda dispensada. MUITO OBRIGADA!

À Dra. Ana Lúcia dos Anjos Ferreira e Dra. Daisy Maria Fávero Salvadori,

Muito obrigada por terem aceito integrar minha banca de qualificação. Obrigada pela disponibilidade, atenção e cuidado na correção da minha tese. Suas recomendações foram de grandioso valor. Muito obrigada!

À Dra. Maria Inês de Moura Campos Pardini, Dr. Daniel Araki Ribeiro, Dra. Camila

Renata Côrrea e Dra. Glenda Nicioli da Silva,

Agradeço pela disponibilidade em dividir o conhecimento de vocês comigo, em especial nesse momento de amadurecimento profissional. Antecipadamente, agradeço os comentários, correções e observações em meu trabalho. Muito obrigada por terem aceitado integrar minha banca de defesa da tese.

Aos meus amigos,

Sem vocês a vida seria menos colorida e leve. Obrigada por todo o apoio, incentivo, preocupação, palavra, refúgio. Obrigada por sempre estarem presentes em minha vida, mesmo quando eu preciso me ausentar. Amo cada um de vocês! Obrigada pela orações e pensamentos positivos, eles me ajudaram e me ajudam muito.

Às agências financiadoras,

CAPES e CNPq pelo suporte financeiro para o desenvolvimento dessa tese.

A todos aqueles que torceram, rezaram, ajudaram ou simplesmente fizeram-me companhia durante esses anos, meu MUITO OBRIGADA!

*“O Senhor fez a terra produzir os medicamentos: o homem sensato não os despreza.
O Altíssimo deu-lhes a ciência da medicina para ser honrado em suas maravilhas; e dela se
serve para acalmar as dores e curá-las.”*

Eclo 38, 4.6-7a

RESUMO

FELICIDADE, I. Análise de *pathway* e *network* em tecido adiposo *in vivo* e o papel da vitamina D na adipogênese *in vitro*. 2016. 174 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2016.

A prevalência de obesidade mais que dobrou entre 1980 e 2014, uma vez que mais de 1,9 bilhões de adultos são com sobrepeso, e mais de 600 milhões desses são obesos. No Brasil, de acordo com as últimas pesquisas, em 2014, 52,5% dos brasileiros são sobrepesos, enquanto 17,9% são obesos. Obesidade é o maior fator de risco para doenças não-transmissíveis, como doenças cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2, hipertensão e câncer. Indivíduos obesos metabolicamente saudáveis tendem a apresentar um quadro de obesidade hiperplásica, o que garante a integridade da função do tecido adiposo, e tem demonstrado ser a chave para a manutenção da homeostase corporal em casos de desequilíbrio no metabolismo energético, como na obesidade. A vitamina D, e seus metabólitos, são lipofílicos e, dessa forma, são armazenados no tecido adiposo, sendo esse evento a possível causa para baixos níveis séricos de VitD em indivíduos obesos. Por isso, o objetivo da presente tese foi realizar análises de *pathway* e *network* em tecido adiposo de indivíduos obesos, comparados com indivíduos eutróficos, e avaliar a ação da vitamina 1,25(OH)₂D₃ na adipogênese em modelo de tecido adiposo humano normal. No primeiro artigo, realizou-se normalização dos dados brutos de *microarray* para análises de *pathway* e integração desses em um *network*. Já no segundo artigo, foi realizada análise celular em tempo real (RTCA), ensaios de atividade metabólica e proliferação celular foram utilizados para mensurar os efeitos da VitD na proliferação e diferenciação adipogênica de células SGBS (síndrome de Simpson-Golabi-Behmel) tratadas com VitD 10nM e 100nM. Análises de apoptose e ciclo celular foram, ainda, realizadas, seguidas por quantificação de triglicerídeos e expressão gênica por RT-qPCR. Os resultados encontrados sustentam o papel central da via da adipogênese em indivíduos obesos, além de mostrar que essa via apresenta alterações na expressão gênica, quando comparada com dados de indivíduos não obesos, além da interação de vias da vitamina D com a via da adipogênese, em obesos. Posteriormente, foi demonstrado que a vitamina D possui ação em pré-adipócitos, em genes biomarcadores da adipogênese e no VDR, além de induzir parada de ciclo celular e diminuição de lipídios intracelulares. A partir dos resultados obtidos com o tratamento de pré-adipócitos humanos com vitamina D, sugere-se a senescência celular induzida por oncogenes, como um possível mecanismo para a ação da vitamina na parada de ciclo celular. Assim, os resultados abrem caminhos para mais investigações no que tange a ação da vitamina D na proliferação de tecido adiposo, além de servir de base para a compreensão da hiperplasia na manutenção da saúde em indivíduos obesos, e garantir os benefícios da suplementação da vitamina D em todas as populações.

Palavras-chave: Ciclo celular; Senescência; SGBS.

SUMÁRIO

Capítulo I – Revisão da literatura	15
1 REVISÃO DA LITERATURA	16
1.1 Obesidade	16
1.2 Adipogênese	17
1.2.1 Proliferação de pré-adipócitos	20
1.2.2 Diferenciação	20
1.3 Modelos para estudo em tecido adiposo	23
1.3.1 Modelos experimentais <i>in vitro</i>	24
1.3.1.1 Modelos em ratos	24
1.3.1.2 Modelos em humanos	25
1.3.1.2.1 Pré-adipócitos humanos SGBS (síndrome de Simpson-Golabi-Behmel)	26
1.4 Vitamina D	26
1.4.1 Vitamina D e obesidade.....	27
1.4.2 Papel da vitamina D na adipogênese	28
1.4.3 Efeito antiproliferativo da vitamina D.....	28
1.5 Senescência celular	29
1.5.1 Tipos de senescência celular.....	30
1.5.1.2 Senescência induzida por oncogenes	31
1.5.2 Senescência na obesidade	32
2 OBJETIVOS	33
2.1 Geral	33
2.2 Específicos	33
3 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS	34
REFERÊNCIAS	35
Capítulo II – Artigo 1: The role of adipogenesis pathway in obese individuals: a pathway-based analysis in human subcutaneous adipose tissue	41
Abstract	44
INTRODUCTION	46
METHODS	47
<i>Transcriptomics dataset</i>	47
<i>Affymetrix microarray analysis</i>	48

<i>Pathways analysis</i>	49
<i>Gene ontology analysis</i>	49
<i>Network integrations</i>	50
RESULTS	50
<i>Study groups</i>	50
<i>Differential expression</i>	51
<i>Pathway analysis</i>	51
<i>Biological process</i>	52
<i>Network integration</i>	53
DISCUSSION	53
Acknowledgements	58
REFERENCES	58
FIGURE LEGENDS	61
FIGURES AND TABLE	65
SUPPLEMENTARY INFORMATION	70
List of references	70
Figures	71
Tables	84
Capítulo III – Artigo 2: Papel da vitamina D3 na adipogênese em células SGBS: novos achados na proliferação de pré-adipócitos	112
Resumo	114
INTRODUÇÃO	115
MATERIAIS E MÉTODOS	116
<i>Cultivo celular</i>	116
<i>Delineamento experimental</i>	117
<i>Análise celular em tempo real (RTCA) via sistema xCELLigence</i>	117
<i>Ensaio do MTT</i>	118
<i>Ensaio de azul de tripano</i>	118
<i>Análise de apoptose e ciclo celular</i>	119
<i>Análise colorimétrica e quantificação de lipídios</i>	120
<i>Expressão gênica em RT-qPCR</i>	120
<i>Análise estatística</i>	121
RESULTADOS	122
<i>Tratamento com VitD em células de pré-adipócitos humanos</i>	122

<i>Tratamento com VitD durante o estágio de diferenciação</i>	127
<i>Tratamento com VitD em adipócitos.....</i>	128
<i>Tratamento contínuo com VitD desde pré-adipócitos e a partir do estágio de diferenciação (T0h)</i>	130
<i>Diferenciação de células de pré-adipócitos humanos SGBS em adipócitos.....</i>	132
DISCUSSÃO	133
AGRADECIMENTOS	139
REFERÊNCIAS	139
INFORMAÇÃO SUPLEMENTAR	145
Dado suplementar S1	145
Tabela suplementar S1	149
Figuras	151
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	163
CONCLUSÃO.....	165
REFERÊNCIAS	166

Capítulo I

Revisão da Literatura

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Obesidade

Obesidade é o resultado do desequilíbrio entre ingestão e gasto energético (BILLION et al., 2008). Ainda, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (World Health Organization – WHO), obesidade é um excesso de gordura armazenada que pode resultar em um comprometimento da saúde e da homeostase. Comumente, obesidade é definida pelo índice de massa corporal (IMC) $\geq 30,0 \text{ Kg/m}^2$ enquanto sobrepeso é definido pelo IMC $\geq 25,0 \text{ Kg/m}^2$. A prevalência mundial de obesidade mais do que dobrou entre 1980 e 2014, uma vez que mais de 1,9 bilhões de adultos, com 18 anos ou mais, estavam com sobrepeso. Destes, mais de 600 milhões estavam com obesidade (WHO, 2015).

No Brasil, de acordo com a última pesquisa do VIGITEL (Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por Inquérito Telefônico) em 2014, 52,5% dos brasileiros apresentavam sobrepeso, enquanto 17,9% obesidade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Além disso, dados do Sistema Único de Saúde (SUS), reportaram gastos de R\$ 488 milhões com obesidade, e comorbidades associadas, em 2008, período no qual 45% dos indivíduos apresentavam sobrepeso e 13,7% obesidade (SNA, 2014).

A obesidade é um dos principais fatores de risco para doenças crônicas não-transmissíveis, como doenças cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2 (T2DM), hipertensão e câncer (VIDAL-PUIG, 2013; ALLOTT & HURSTING, 2015; WHO, 2015). No Brasil, essas doenças crônicas não-transmissíveis causaram 72% das mortes em 2014 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). A resistência à insulina é a maior consequência da obesidade, seguida pela inflamação de baixo grau, no tecido adiposo, que rapidamente se tornam sistêmica e diminuem a sinalização da insulina enquanto aumentam a taxa de lipólise (GREGOR & HOTAMISLIGIL, 2011; LAFONTAN, 2014; RUTKOWSKI et al., 2015). Esse desequilíbrio é também aumentado pelo armazenamento ectópico de gordura com consequente promoção da lipotoxicidade e estresse oxidativo que conduzem à uma disfunção celular, de acordo com o tipo celular afetado, como doença hepática gordurosa não-alcoólica (NAFLD) e disfunção em células β -pancreáticas (VIDAL-PUIG, 2013; LAFONTAN, 2014).

Associada à resistência insulínica e obesidade, NAFLD e inflamação podem ser prevenidas pela expansão do tecido adiposo, pela proliferação de pré-adipócitos, relacionada com o aumento do metabolismo energético (RUTKOWSKI et al., 2015). Recentemente, tem

sido demonstrado que a resistência à insulina, em indivíduos metabolicamente não-saudáveis e lipodistróficos, é causada pela incapacidade de expansão do tecido adiposo (VIRTUE & VIDAL-PUIG, 2008). Embora a redução de tecido adiposo e da ação da insulina pareçam prevenir o ganho de peso adicional em pessoas obesas, com problemas para controle do apetite e de regularidade em exercícios físicos, estudos demonstram que a hipótese da expansão do tecido adiposo é capaz de manter a homeostase metabólica nesses indivíduos evitando, dessa forma, o ciclo vicioso causado pelo T2DM e a resistência à insulina em indivíduos obesos (VIRTUE & VIDAL-PUIG, 2008; VIDAL-PUIG, 2013; LAFONTAN, 2014).

Além disso, enquanto a energia excedente persiste e a capacidade de armazenamento do tecido adiposo é capaz de estocar continuamente o excesso de energia e lipídios, a homeostase metabólica e cardiovascular pode ser preservada, apesar da obesidade, sendo que o sequestro de ácidos graxos, na forma de triglicerídeos, pelos adipócitos, previne a lipotoxicidade (LAFONTAN, 2014).

No âmbito celular, obesidade é originalmente considerada uma doença hipertrófica resultante de um aumento no número ou tamanho de células do tecido adiposo (MORENO-NAVARRETE & FERNÁNDEZ-REAL, 2012). Em relação ao tecido adiposo, sabe-se que o aumento celular dos adipócitos pré-existent (hipertrofia) e a diferenciação de novos pré-adipócitos e adipócitos maduros (hiperplasia), são necessários para a expansão do tecido, observada na obesidade e durante o desenvolvimento do organismo (ALVAREZ et al., 2014).

1.2 Adipogênese

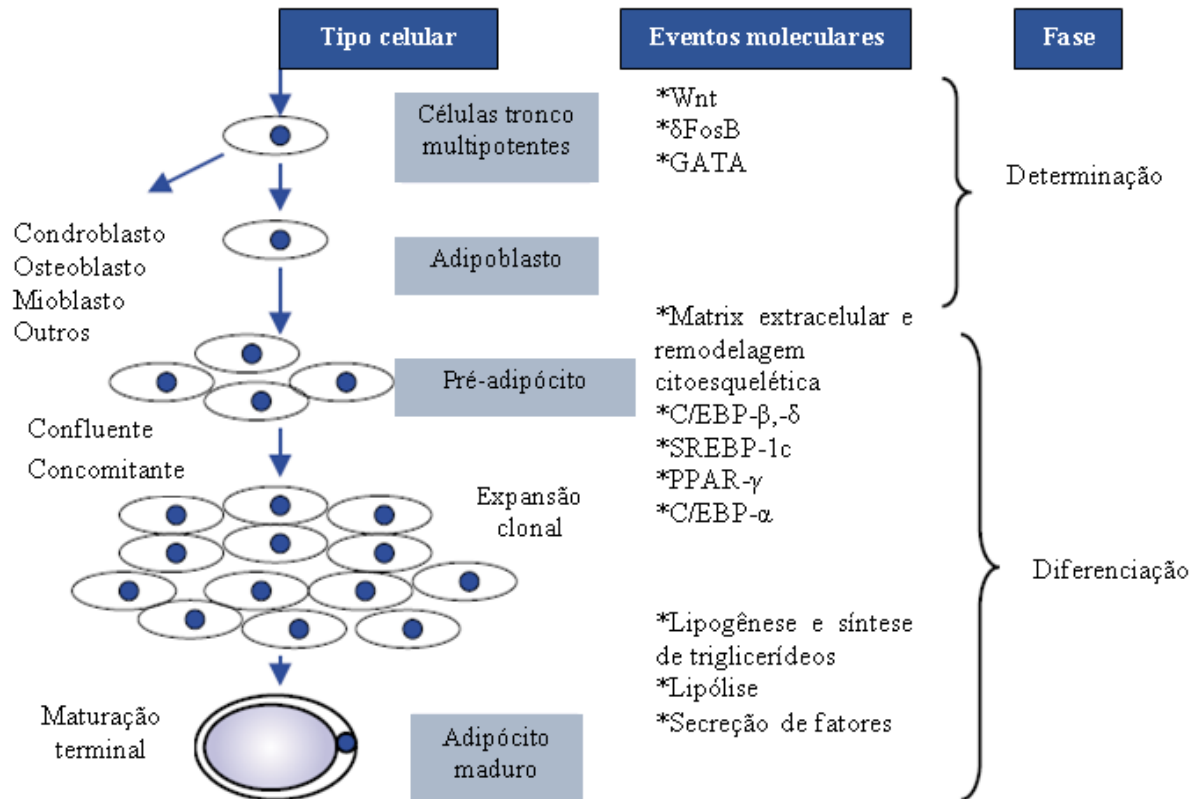
O tecido adiposo é caracterizado por acentuada heterogeneidade celular sendo encontrado entre os componentes celulares: pré-adipócitos, adipócitos, fibroblastos, células endoteliais e células tronco multipotentes, que são capazes de se diferenciarem em diversos tipos celulares. De maneira geral, o tecido adiposo consiste em aproximadamente 1/3 de adipócitos maduros, sendo o restante dividido entre pequenas células tronco mesenquimais (MSCs), células T regulatórias, células endoteliais precursoras, pré-adipócitos, em vários estágios de desenvolvimento, e macrófagos que conferem, dessa forma, ao tecido uma constante plasticidade funcional, a qual determina sua habilidade de expansão no decorrer da vida (MORENO-NAVARRETE & FERNÁNDEZ-REAL, 2012).

Há dois tipos de tecido adiposo, branco (WAT, *white adipose tissue*) e marrom (BAT, *brown adipose tissue*), diferindo em algumas características significativas. O tecido adiposo branco contém grandes vacúolos de lipídios individuais que compreendem a maioria do volume celular, enquanto o citoplasma e o núcleo são encontrados na periferia celular. Ainda, os pré-adipócitos, que possuem morfologia semelhante à de fibroblastos, podem ser cultivados *in vitro* e, posteriormente, induzidos a diferenciação para o estudo da adipogênese e de seus metabólitos. Já o tecido adiposo marrom, o qual é caracterizado por vacúolos de lipídios multiloculares e acentuada presença de mitocôndrias, são derivados a partir de distintos depósitos de tecido adiposo que são altamente vascularizados e inervados (BILLION et al., 2008; MORENO-NAVARRETE & FERNÁNDEZ-REAL, 2012).

Duas fases da adipogênese têm sido extensivamente caracterizadas (Figura 1):

i) fase determinante: estágio resultante da conversão de células tronco em pré-adipócitos, o que não pode ser diferenciado morfológicamente de seus precursores celulares, no entanto, perdem o potencial de diferenciação em outros tipos celulares.

ii) fase de determinação terminal ou diferenciação: nesse estágio, os pré-adipócitos assumem características de um adipócito maduro, adquirindo os mecanismos necessários para a síntese e transporte de lipídios, ação da insulina e secreção de proteínas específicas. A regulação terminal da diferenciação é mais extensivamente caracterizada do que a determinação, já que a maioria dos estudos têm usado linhagens celulares que possuem um potencial restrito de diferenciação em outros tipos celulares (BILLION et al., 2008; MORENO-NAVARRETE & FERNÁNDEZ-REAL, 2012).

Figura 1 – Determinação e diferenciação de adipócitos.

Fonte: Fève, 2005.

Mecanismos moleculares que controlam a conversão de pré-adipócitos em adipócitos maduros têm recebido muita atenção nas últimas décadas, devido ao aumento da prevalência de obesidade e comorbidades associadas (SIERSBÆK et al., 2012). A adipogênese é controlada por uma rígida cascata de regulação transcricional, onde fatores de transcrição ativam ou reprimem a expressão de cada gene de maneira sequencial (SIERSBÆK et al., 2012).

A transição, a partir do óvulo, para a determinação e conversão de células precursoras dos adipócitos, em adipócitos maduros, ocorre através de uma série de estágios. Um único óvulo fertilizado dá origem a cerca de 200 tipos de células que compõem as várias linhagens de desenvolvimento e organismos multicelulares. Os fibroblastos pluripotentes (células tronco) são conhecidos por terem origem mesodermal e podem diferenciar-se em pré-adipócitos, cartilagens, osso ou tecido muscular (NTAMBI & KIM, 2000). Durante o processo de diferenciação terminal, o pré-adipócito sofre mudanças na morfologia, na expressão bioquímica e nas funções celulares para se tornar um adipócito maduro, o qual é capaz de transportar e sintetizar lipídios, responder metabolicamente à insulina e secretar

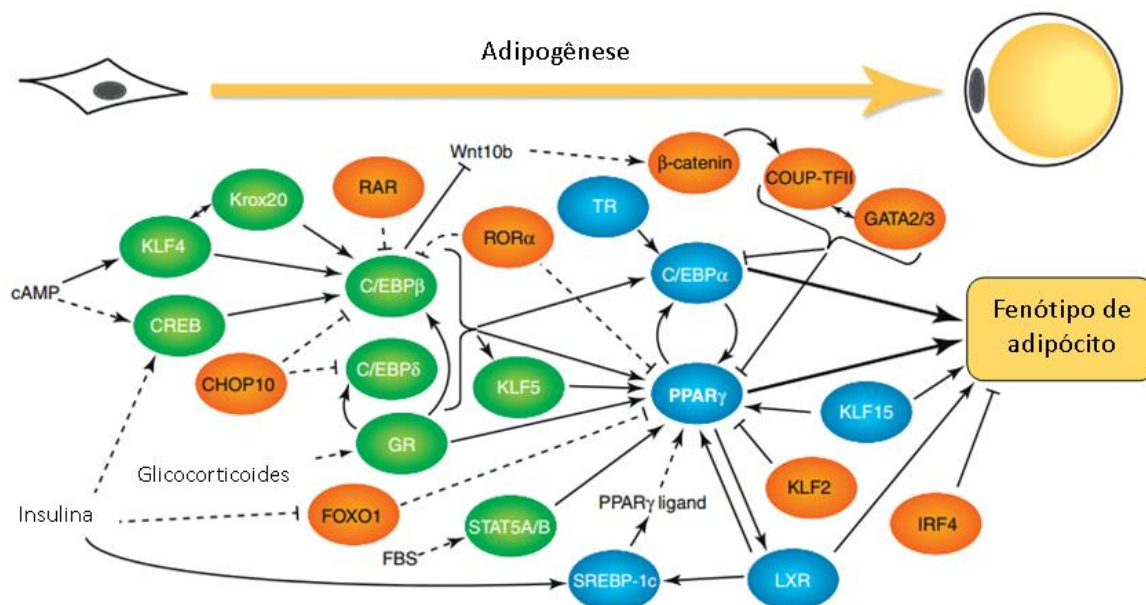
proteínas específicas dos adipócitos (WOOD, 2008). Em 1994, a identificação da leptina estabeleceu definitivamente o tecido adiposo como um órgão endócrino (ZHANG et al., 1994). Desde então, descobriu-se inúmeros compostos bioativos, a maioria deles agindo como hormônios (LAFONTAN, 2005).

1.2.1 Proliferação de pré-adipócitos

Pré-adipócitos humanos são células do tipo fibroblastos e consistem em 15-50% das células do tecido adiposo (WABITSCH et al., 2001; TCHKONIA et al., 2010; ALI et al., 2013). O principal papel dos pré-adipócitos é diferenciar-se em adipócitos maduros funcionais, melhorando a sensibilidade à insulina e evitando o depósito de gordura ectópica, o qual está relacionado com resistência à insulina, síndrome metabólica e doenças cardiovasculares (ZAMBONI et al., 2014). A proliferação de pré-adipócitos tem sido reportada como protetiva, por aumentar a capacidade de expansão do tecido adiposo e favorecer a renovação celular, melhorando a sensibilidade a insulina.

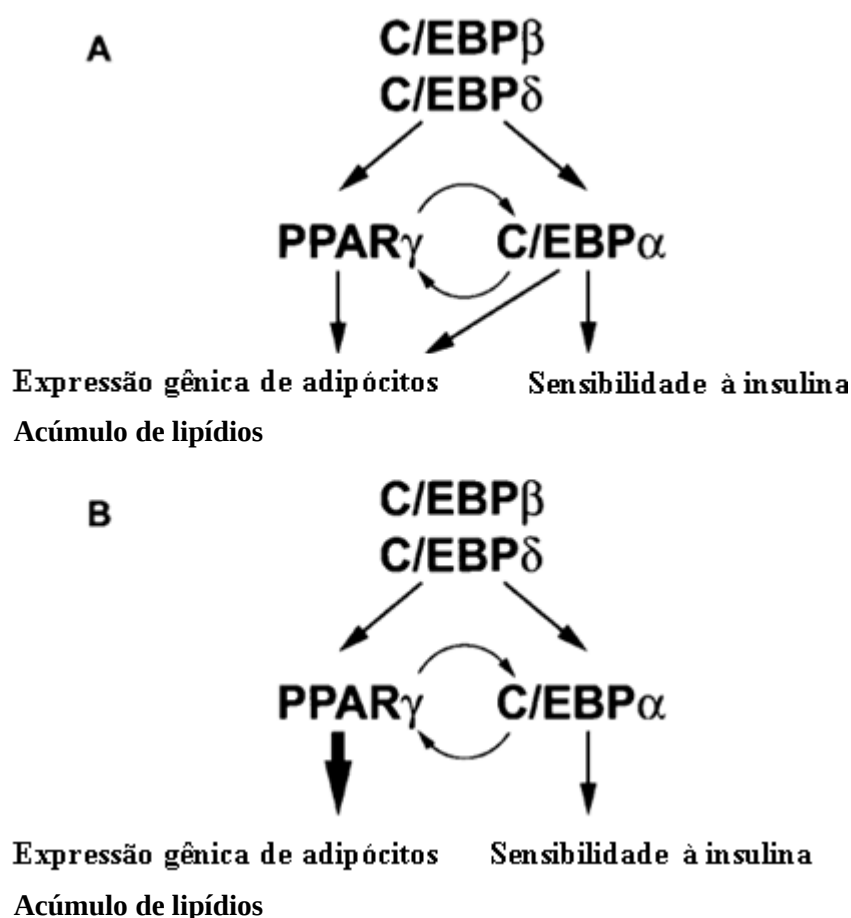
1.2.2 Diferenciação

A diferenciação dos adipócitos segue um programa bem definido. De acordo com o modelo atualmente aceito, o programa adipogênico envolve inúmeros estágios sequenciais ao longo de 4-7 dias (KONG & LI, 2006). Sob indução de agentes pró-diferenciação, as células sofrem crescimentos através de 1 ou 2 etapas de divisão celular, conhecidas como expansão mitótica clonal, a qual é acompanhada por uma expressão gênica em cascata, inicializada pela expressão dos genes *C/EBP β* (proteína ligante do amplificador CCAAT beta) e *C/EBP δ* (proteína ligante do amplificador CCAAT delta). Esses primeiros eventos são, então, seguidos por um aumento na expressão dos genes *C/EBP α* (proteína ligante do amplificador CCAAT alfa) e *PPAR γ* (receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama), reguladores centrais da transcrição na adipogênese, os quais ativam a expressão de genes específicos para esse processo. Subsequentemente, no estágio final, as células são terminalmente diferenciadas em adipócitos maduros (KONG & LI, 2006) (Figura 2).

Figura 2 – Cascata transcripcional da diferenciação dos adipócitos.

Fatores de transcrição adipogênicos iniciais (verde) são ativados diretamente pelo coquetel hormonal adipogênico e induzem fatores adipogênicos tardios (azul). Fatores anti-adipogênicos são demonstrados em laranja. Linhas sólidas indicam regulação da expressão gênica e linhas pontilhadas indicam regulação da atividade. Fonte: Siersbæk et al., 2012.

Rosen et al. (2002), demonstraram dois modelos sobre o papel dos genes *C/EBPα* e *PPARγ* na adipogênese. A Figura 3A mostra como os genes *PPARγ* e *C/EBPα* induzem a expressão um do outro e podem agir independentemente na promoção da diferenciação de adipócitos; já a Figura 3B apresenta um modelo alternativo onde o gene *PPARγ* é o regulador direto da adipogênese, enquanto o gene *C/EBPα*, possui um papel central na manutenção da expressão do gene *PPARγ* e na promoção da sensibilidade a insulina.

Figura 3 – Modelo representativo do papel dos genes *C/EBP α* e *PPAR γ* na adipogênese

Fonte: ROSEN et al., 2002

O *PPAR γ* é tanto suficiente quanto necessário para a conversão de pré-adipócitos em adipócitos, sendo conhecido como regulador mestre da adipogênese. Os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (*PPAR*) são membros de uma família de receptores nucleares e agem como fatores de transcrição formando um heterodímero com o receptor do retinóide X (*RXR*). O heterodímero *PPAR-RXR* se liga aos elementos de resposta do *PPAR* (*PPRE*) na região promotora de genes responsivos ao *PPAR* (HEINÄNIEMI et al., 2007; WOOD, 2008). Já os sítios de ligação do gene *C/EBP α* são encontrados na região promotora de diversos genes que ativam a adipogênese (WU et al., 1999).

Concomitantemente à expressão gênica em cascata, descrita acima, há, também, o aumento da expressão do gene receptor da vitamina D (*VDR*), durante a diferenciação. Essa curta disponibilidade do gene *VDR* possibilita a influência da vitamina D no processo de diferenciação dos pré-adipócitos em adipócitos (WOOD, 2008).

1.3 Modelos para estudo em tecido adiposo

O estudo da adipogênese, especialmente a diferenciação, tem sido amplamente realizado nos últimos 40 anos, especialmente em modelos de pré-adipócitos *in vitro* desenvolvidos para estudar características dos adipócitos e tecido adiposo (ALI et al., 2013). Como já demonstrado, o processo envolve seis estágios bem definidos: precursores mesenquimais, pré-adipócitos concomitantes, parada de crescimento em pré-adipócitos, expansão mitótica clonal, diferenciação terminal e adipócitos maduros. Todos os processos são passíveis de estudos *in vitro*, de acordo com a fase celular da adipogênese (Figura 4).

Figura 4 – Fases da adipogênese



Estudos da adipogênese *in vivo* são difíceis, devido aos diversos componentes celulares compondo, aproximadamente, 70% e 50% do tecido adiposo, humano e animal respectivamente, como pequenas veias sanguíneas, tecido nervoso, fibroblastos e pré-adipócitos, em diversos estágios de desenvolvimento (CORNELIUS et al., 1994). Além disso, a dificuldade de distinção entre pré-adipócitos e fibroblastos, e a inabilidade em manter os pré-adipócitos em estágios de desenvolvimento similares, podem confundir os resultados de estudos *in vivo* (ALI et al., 2013). Dessa forma, estudos *in vitro*, ainda são preferíveis para o estudo dos processos da adipogênese, assim como das fases celular.

Experimentos *in vitro*, especialmente em linhagens celulares de ratos e camundongos, têm sido usados para descrever a cascata transcricional de diferenciação de pré-adipócitos (ROSEN et al., 2000). Apesar das vantagens desses modelos, que incluem i) a homogeneidade da população celular, permitindo respostas definitivas ao tratamento, e ii) elevada capacidade de proliferação celular dos pré-adipócitos, os eventos moleculares da adipogênese em linhagens celulares de ratos e camundongos podem não refletir o que ocorre em pré-adipócitos humanos (ALI et al., 2013). Por isso, surgiram estudos em culturas

primárias de pré-adipócitos humanos. No entanto, embora estudos tenham conseguido grandes avanços, esses modelos ainda apresentam alguns problemas, como i) dificuldade de isolamento adequado dos pré-adipócitos, ii) baixa porcentagem de pré-adipócitos no tecido adiposo total, e iii) limitada capacidade de proliferação e curto tempo de vida em cultura celular (NTAMBI & YOUNG, 2000; ALI et al., 2013).

Como alternativa, em humanos, em 2001, Wabitsch e colaboradores, apresentaram um estudo onde isolaram células de pré-adipócitos do tecido adiposo branco subcutâneo de um paciente com síndrome de Simpson-Golabi-Behmel (SGBS), uma rara desordem ligada ao cromossomo X e caracterizada pelo elevado crescimento celular pré- e pós-natal (MIM 312870). A linhagem celular finita (*cell strain*) estabelecida, exibe elevada capacidade de diferenciação, resultando em células de tecido adiposo maduras bioquímica e funcionalmente similares à adipócitos humanos. Apesar de manter o elevado potencial de diferenciação em adipócitos, células SGBS não são imortalizadas e após, aproximadamente, 70 gerações elas perdem a capacidade proliferativa e, finalmente, morrem (WABITSCH et al., 2001). No entanto, pré-adipócitos SGBS são uma excelente alternativa celular para estudar eventos adipogênicos em humanos.

1.3.1 Modelos experimentais *in vitro*

Dois diferentes tipos de linhagens celulares estão atualmente disponíveis: pré-adipócitos e células tronco multipotentes, que possuem a habilidade de diferenciar-se em tecido adiposo, ósseo e muscular (MORENO-NAVARRETE & FERNÁNDEZ-REAL, 2012).

1.3.1.1 Modelos em ratos

As mais frequentes linhagens celulares usadas como modelos para o estudo da adipogênese em ratos são 3T3-F442A e 3T3-L1, isoladas da linhagem celular Swiss 3T3, resultante de embriões de ratos Swiss 3T3 de 17-19 dias de idade, sendo a linhagem 3T3-F442A um modelo com células em fases mais avançadas no processo de diferenciação do que a linhagem 3T3-L1 (GREEN & MEUTH, 1974; GREEN & KEHINDE, 1976; GREGOIRE et al., 1998). O estabelecimento dessas linhagens como modelos clássicos para o estudo da adipogênese é resultado da homogeneidade da população celular, especialmente no que tange

o estágio de diferenciação, o que permite resultados homogêneos e reprodutíveis dos tratamentos (MORENO-NAVARRETE & FERNÁNDEZ-REAL, 2012).

Além dessas linhagens de pré-adipócitos, há a linhagem celular Ob17. No entanto, esses pré-adipócitos encontram-se em um estágio tardio e, por isso, são usados com uma menor frequência (MORENO-NAVARRETE & FERNÁNDEZ-REAL, 2012). Células Ob17 são derivadas do tecido adiposo do epidídimo de ratos adultos geneticamente obesos (Ob/Ob) e, por isso, podem conferir diferentes padrões de expressão gênica e metabólitos.

Em ratos, células C3H101/2, estabelecidas em 1973, são células tronco mesenquimais (MSCs) de embriões de ratos C3H de 14-17 dias de idade que, após tratamento com BMP4, são induzidas à linhagem adipocitária e podem ser diferenciadas em adipócitos após indução por indutores específicos (MORENO-NAVARRETE & FERNÁNDEZ-REAL, 2012). Ainda, nessa classe, encontram-se as células tronco derivadas do tecido adiposo (ADSCs), similares à MSCs mas, mais simples de serem purificadas e facilmente obtidas.

1.3.1.2 Modelos em humanos

Tentativas recentes de obtenção de linhagens celulares de pré-adipócitos humanos tem tido significativos avanços nos últimos anos, uma vez que dois tipos celulares foram descritos: pré-adipócitos derivados de lipossarcoma e pré-adipócitos de uma criança com síndrome de Simpson-Golabi-Behmel (WABITSCH et al., 2000; WABITSCH et al., 2001; FEVÈ, 2005). Pré-adipócitos derivados de lipossarcoma resultaram na linhagem celular LiSa-2 que é capaz de manter o potencial de diferenciação em adipócitos, após indução específica, com inúmeras características fenotípicas, bioquímicas e funcionais de células de adipócitos maduros, apesar das consideráveis alterações genéticas (WABITSCH et al., 2000). Por sua vez, o conhecimento adquirido com a linhagem celular humana LiSa-2 resultou no estabelecimento da linhagem celular finita SGBS, que apresenta todas as características de uma cultura de pré-adipócitos primária, como descrito (WABITSCH et al., 2001).

Similarmente aos modelos de ratos, MSCs e ADSCs também podem ser isoladas em humanos e, embora o curto tempo de vida em cultura celular, refletem a funcionalidade do tecido *in vivo* e podem ser diferenciadas em adipócitos maduros, *in vitro* (MORENO-NAVARRETE & FERNÁNDEZ-REAL, 2012).

1.3.1.2.1 Pré-adipócitos humanos SGBS (síndrome de Simpson-Golabi-Behmel)

Pré-adipócitos humanos SGBS foram isolados de um paciente com síndrome de Simpson-Golabi-Behmel (SGBS), como descrito acima. A alteração molecular causadora dessa síndrome não é ainda completamente entendida, embora mutações no gene *glipican 3* (*GPC3*), envolvido no controle de crescimento, tem sido associado com a síndrome em alguns pacientes, o que não foi o caso do paciente o qual as células foram isoladas (WABITSCH et al., 2001).

Ao se comparar células de pré-adipócitos SGBS com pré-adipócitos primários de pacientes controle, observou-se que células SGBS mantinham o potencial de diferenciação em adipócitos por, pelo menos, 70 gerações, com expressão de genes específicos à adipócitos, como genes transportadores da glicose (*GLUT*), e características funcionais de células adiposas (lipogênese e lipólise) durante as gerações, justificando o uso dessas células para o estudo da adipogênese em humanos, *in vitro* (WABITSCH et al., 2001).

1.4 Vitamina D

Vitamina D, uma vitamina lipossolúvel, é obtida a partir da dieta ou, principalmente, sintetizada na pele (vitamina D₂ ou vitamina D₃, respectivamente), pela conversão de 7-dihidrocolesterol em colecalciferol, seguida, ainda, por duas hidroxilações (CARLBERG, 1999; HOLICK, 2005). A primeira ocorre no fígado, onde a vitamina D é convertida para 25(OH)D, principal forma de vitamina D circulante e comumente dosada para verificação da vitamina D sérica (TSIARAS & WEINSTOCK, 2011). A 25(OH)D é, então, hidroxilada nos rins para 1,25(OH)D, a forma hormonal da vitamina D, a qual interage com o VDR (WAMBERG et al., 2013).

A forma hormonal da vitamina D regula, via mecanismo nuclear de seu receptor, inúmeros processos biológicos, como crescimento celular e diferenciação e o VDR parece estar envolvido na maioria da ação da vitamina D, no núcleo (OZONO et al., 1991). VDR é um fator de transcrição ativado por ligante, um receptor nuclear órfã, membro da superfamília de receptores nucleares, o qual forma um heterodímero, preferencialmente, com o RXR nos elementos responsivos à vitamina D (VDREs) de genes, controlando a transcrição desses (WALTERS, 1992; CARLBERG, 1999; VALDIVIELSO & FERNANDEZ, 2006).

A vitamina D tem um efeito pleiotrópico em humanos o qual, em parte, é atribuído ao fato que entre 1.000 e 10.000 *loci* de ligação genômica do VDR são encontrados nas células humanas, incluindo tecido adiposo (HOLICK, 2005; LAHNALAMPI et al., 2010; CARLBERG & MOLNÁR, 2015). Além disso, estudos têm demonstrado a presença de enzimas metabolizadoras da vitamina D no tecido adiposo, sendo elas CYP27B1, que converte 25(OH)D em 1,25(OH)₂D, e CYP24A1, responsável pela degradação de 25(OH)D e 1,25(OH)₂D em ácido calcitroico e outros metabólitos inativos (HOLICK, 2005; NIMITPHONG et al., 2012; NARVAEZ et al., 2013; WAMBERG et al., 2013).

O tecido adiposo tem demonstrado ser um reservatório para vitamina D em humanos e ratos, sendo recentemente demonstrado que sua localização está nos vacúolos de lipídios (MALMBERG et al., 2014; LANDRIER et al., 2016). Além disso, Heaney et al. (2009) demonstraram que 65% do total de vitamina D no corpo está na forma de 1,25(OH)₂D₃, sendo que 73% está armazenado no tecido adiposo, enquanto 34% do total de 25(OH)D encontra-se no tecido adiposo. A concentração de vitamina D no tecido adiposo varia de acordo com os indivíduos e parece não estar correlacionada com 25(OH)D plasmática (LANDRIER et al., 2016).

1.4.1 Vitamina D e obesidade

As causas da relação inversa entre 25(OH)D e obesidade são ainda pouco entendidas. Algumas poucas hipóteses têm sido propostas, por exemplo a) diminuição da exposição ao sol comparado com indivíduos eutróficos, b) habilidade de conversão de 7-dihidrocolesterol em colesterciferol, na pele, diminuída, c) *feedback* negativo a partir de 1,25(OH)₂D e paratormônio elevados na síntese hepática de 25(OH)D, e d) sequestro ou e) diluição volumétrica da vitamina D no tecido adiposo (BELL et al., 1985; WORSTMAN et al., 2000; DRINCIC et al., 2012; POURSHAHIDI, 2015).

Todas as causas de deficiência de vitamina D em indivíduos obesos tem sido provadas, mas a hipótese de sequestro, postulada por Worstman et al. (2000), tem fornecido fortes evidências sobre essa relação. No estudo de Worstman et al. (2000), após a intervenção com luz UV-B, indivíduos obesos demonstraram uma concentração sérica de 25(OH)D 57% menor do que o grupo eutrófico, enquanto a concentração de 25(OH)D inicial era similar, e nenhuma diferença na concentração de 7-deidrocolesterol disponível foi encontrada, sugerindo uma diminuição na biodisponibilidade de 25(OH)D circulante.

Recentemente, Didriksen et al. (2015) demonstraram que o tecido adiposo de indivíduos obesos, com tolerância à glicose diminuída (IGT) e/ou glicose em jejum alterada (IFG), apresentaram níveis de vitamina D3 seis vezes maiores do que o grupo placebo, após a intervenção de 20.000 UI/semana por 3-5 anos, reforçando a hipótese de sequestro da vitamina D pelo tecido adiposo.

1.4.2 Papel da vitamina D na adipogênese

Em ratos, a vitamina D tem demonstrado inibir a diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos maduros. O modelo proposto na literatura demonstra uma ativação do gene *VDR*, através do ligante vitamina D, causando a queda substancial na indução do mRNA do gene *C/EBP β* , e na quantidade de proteína presente no início da diferenciação (NATARAJAN, 2008). Isso ocorre em um período crítico onde o gene *C/EBP β* é requerido para a indução dos genes *C/EBP α* e *PPAR γ* (BLUMBERG et al., 2006). Claramente, os genes *C/EBP α* e *PPAR γ* são a chave dos efeitos da vitamina D na adipogênese. No entanto, mais estudos são necessários para investigar o mecanismo celular exato de supressão desses dois genes pela vitamina D (KONG & LI, 2006). A inibição do gene *PPAR γ* , resulta, também, no aumento da inflamação no tecido adiposo (van DJIK et al., 2009).

No entanto, estudos comparativos do perfil genômico de ligação do *PPAR γ* e *C/EBP α* em adipócitos de ratos e humanos revelaram conservação limitada de eventos de ligação entre as duas espécies, aproximadamente 10-20% das regiões de ligação em ratos são conservadas em adipócitos humanos (MIKKELSEN et al., 2010; SCHMIDT et al., 2011; SOCCIO et al., 2011; SIERSBÆK et al., 2012).

Essas diferenças podem ser a chave para os resultados opostos observados em estudos *in vitro* de células humanas, já que a vitamina D (1,25(OH)₂D₃) demonstrou aumentar a diferenciação e o acúmulo de lipídios em pré-adipócitos e pré-adipócitos derivados de células tronco (ASCs) de humanos (NIMITPHONG et al., 2012; NARVAEZ et al., 2013).

1.4.3 Efeito antiproliferativo da vitamina D

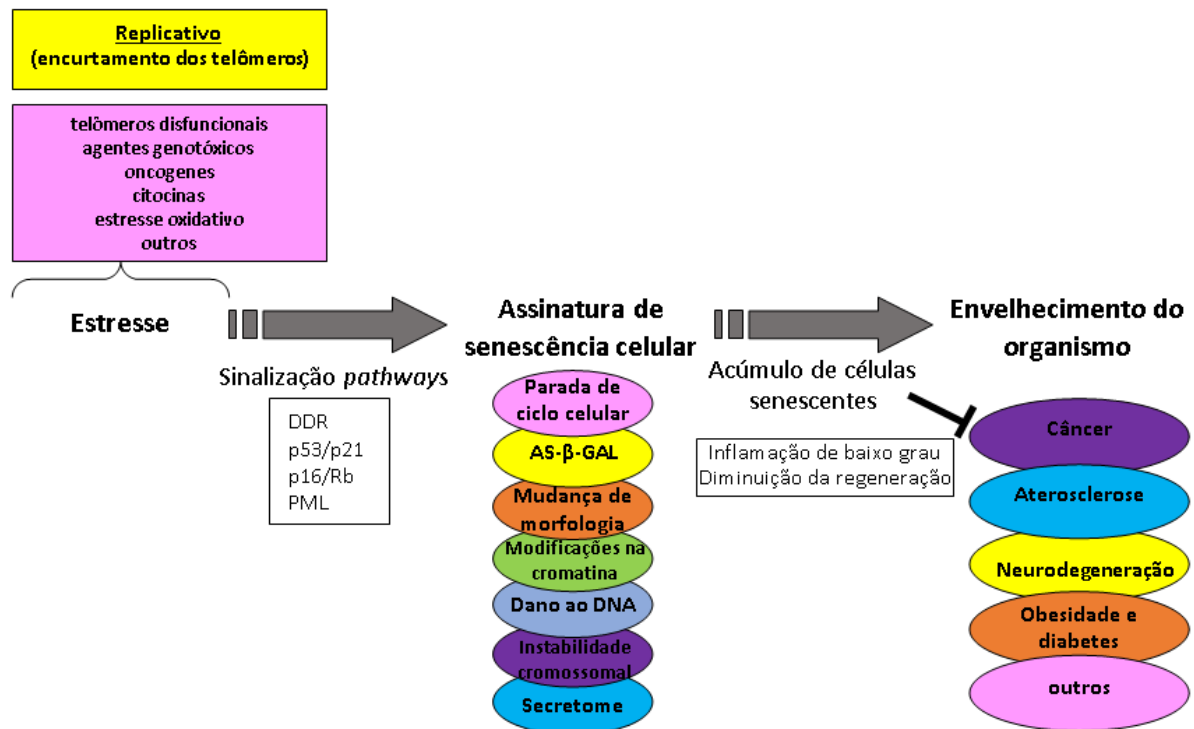
A vitamina D tem demonstrado agir diretamente na expressão de genes que regulam o crescimento celular, como *CDKN1A* (*P21*), *CDKN2A* (*P16*) e genes da família RAS, sendo seu efeito antiproliferativo amplamente observado em estudos de câncer *in vitro*

(FLEET et al., 2012; BAO et al., 2014; PICKHOLTZ et al., 2014; ZHANG et al., 2014; LI et al., 2015). Esses efeitos da vitamina D, além da inibição da angiogênese e indução da apoptose, demonstraram ser *VDR* dependente (FLEET et al., 2012; GONZÁLEZ-PRADO et al., 2014; GOEMAN et al., 2014).

Em tecido adiposo, o efeito antiproliferativo da vitamina D ainda é pouco documentado, haja visto que a maioria dos estudos são realizados com o objetivo de avaliar a diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos, usando um coquetel hormonal notadamente conhecido por induzir genes alvo da diferenciação em humanos (SIERSBÆK et al., 2012; NARVAEZ et al., 2013). No entanto, Narvaez et al. (2013) observaram um potente efeito anti-proliferativo da vitamina D em pré-adipócitos derivados de células tronco do tecido adiposo, embora os autores não tenham descrito os resultados encontrados nessa fase celular do tecido adiposo.

1.5 Senescência celular

Senescência celular é um processo de sinalização de transdução que conduz à um estado de parada de crescimento celular irreversível, acompanhado de específica morfologia celular e padrão de expressão gênica (SARETZKI, 2010). A senescência poder ser ativada por diferentes mecanismos, incluindo danos ao DNA, ativação de oncogenes, diminuição dos telômeros ou tratamento com drogas e irradiação (Figure 5) (SARETZKI, 2010). Apesar da parada de crescimento celular, as células senescentes continuam metabolicamente ativas, embora com um padrão de expressão gênica alterado (SARETZKI, 2010).

Figura 5 – Senescência celular associada com biomarcadores e consequências funcionais.

Diferentes tipos de estresse podem induzir a sinalização de vias que ativam a senescência celular, o qual é caracterizada por diferentes biomarcadores (*cellular senescence signature*). Acúmulo de células senescentes nos tecidos, promove baixa capacidade regenerativa e aumento da inflamação de baixo grau. Fonte: (SIKORA et al., 2011)

1.5.1 Tipos de senescência celular

A maioria das células somáticas, em contraste com as células tronco embrionárias e as linhagens celulares germinativas, possuem um tempo de vida finito, que é raramente alcançado *in vivo*, mas pode ser estudado *in vitro* (SARATZKI, 2010). Senescência é a perda definitiva e irreversível da capacidade replicativa de células primárias, sendo categorizados em senescência replicativa, senescência induzida por estresse ou senescência induzida por oncogenes (OIS) (SARATZKI, 2010).

A senescência replicativa tem sido melhor estudada e descrita em fibroblastos, embora já tenha sido categorizada em outros tipos celulares. Esse tipo de senescência é reconhecido como sendo um mecanismo celular intrínseco que restringe a proliferação celular e age como um potente supressor tumoral, tendo como principal mecanismo, o encurtamento de telômeros que pode ser reconhecido como uma quebra no DNA, ativando resposta ao dano e uma parada permanente no ciclo celular (SARATZKI, 2010).

Ainda, senescência celular é um mecanismo comum que é ativado por células normais em respostas a vários tipos de estresse, dentre eles danos externos ao DNA por meio de agentes quimioterápicos ou irradiação, estresse oxidativo e dano à estrutura da cromatina. Nesses casos, a parada no ciclo celular não é associada com o encurtamento dos telômeros e é denominada como senescência prematura induzida por estresse (ITAHANA et al., 2004).

Além desses, conta-se com a senescência induzida por oncogenes. Embora a ativação de oncogenes é um evento promotor da tumorigênese, em células normais o aumento da proliferação induz a ativação de oncogenes que conduzem a célula à uma permanente parada de proliferação (SARETZKI, 2010).

1.5.1.2 Senescência induzida por oncogenes

A senescência induzida por oncogenes (OIS), como outros tipos, apresentam parada de ciclo celular na fase G1, indução de dano ao DNA e ativação de p53, positividade ao teste de Beta-galactase, elevados níveis de proteínas p16INKa e hipofosforilação da proteína RB (SARETZKI, 2010). Cultura de células normais são induzidas à senescência em resposta ao aumento da expressão do oncogene *RAS* ou de seus efetores *downstream*, como RAF, quinase ativada por MAP e oncoproteína PML, essa resposta tem sido sugerida para representar um mecanismo de supressão tumoral, pelo qual células normais previnem a proliferação incontrolada em resposta à ativação aberrante de oncogenes (SARETZKI, 2010).

Recentemente foi demonstrado que a vitamina D foi capaz de induzir o gene *RASSF2* (*fold change* = 2.15), que codifica uma proteína que contém um domínio de associação da oncoproteína Ras, em pré-adipócitos humano primários derivados de células tronco, tratados com vitamina D 10nM, por 24h (NARVAEZ et al., 2013). Pertencente à família Ras, *RRASF2* também promove parada de ciclo celular (VOS et al., 2003).

Outro mecanismo conhecido por induzir OIS via família *RAS* é aumento da expressão de *C/EBPβ*, que promove um papel crucial na regulação do ciclo celular (LEE et al., 2010; HUGGINS, et al., 2013). Após aumento da sinalização de Ras, *C/EBPβ* é induzido e, se acompanhado pelo aumento da expressão de *C/EBPα*, responsável pela inibição de *C/EBPγ*, regulador negativo da expressão gênica de *C/EBPβ*, genes que regulam a transição G1-S são silenciados (SEBASTIAN & JOHNSON, 2006; LEE et al., 2010; ALBERICH-JORDÀ et al., 2012; HUGGINS, et al., 2013).

1.5.2 Senescência na obesidade

A obesidade e o envelhecimento são responsáveis pela indução de pré-adipócitos à senescência, por meio do estresse celular e renovação celular constante, respectivamente, conduzindo à uma diminuição na adipogênese e aumento do perfil pró-inflamatório (TCHKONIA et al., 2010). Acúmulo de células senescentes pode, parcialmente, contribuir para dano tecidual e inflamação de baixo grau, no envelhecimento (SIKORA et al., 2011).

Essa disfunção celular, em pré-adipócitos na obesidade, em conjunto com a inabilidade de diferenciação desses em adipócitos maduros, pode contribuir para a falha no sequestro de ácidos graxos, lipotoxicidade sistêmica e resistência à insulina (TCHKONIA et al., 2010). Obesos mórbidos podem ter trinta vezes mais pré-adipócitos senescentes do que indivíduos não obesos, sendo a senescência nesse tipo celular o responsável pela infiltração de células imunes no tecido que induz o perfil pró-inflamatório (TCHKONIA et al., 2010).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

– Análises de *pathway* e *network* em tecido adiposo de indivíduos obesos e avaliação da ação da vitamina D ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) na adipogênese, utilizando os genes da família dos receptores nucleares como biomarcadores, em modelo de tecido adiposo normal, *in vitro*.

2.2 Específicos

- Avaliar o perfil de expressão gênica em tecido adiposo de indivíduos obesos;
- Avaliar a ação da vitamina D ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) na adipogênese através de alterações nos níveis de expressão dos genes *VDR*, *C/EBP α* , *C/EBP β* , *C/EBP δ* , *PPAR γ* , *CAPN1*, *BCL2*, *CASP3*, *CASP9* e *CDKN1A (P21)* no tecido adiposo normal;
- Avaliar o perfil de índice celular, metabolismo mitocondrial e proliferação celular em células SGBS tratadas e não tratadas com a vitamina $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$;
- Avaliar a apoptose e o ciclo celular em células SGBS tratadas e não tratadas com a vitamina $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$;
- Quantificar lipídios intracelulares em células SGBS tratadas e não tratadas com a vitamina $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

3 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS

A presente tese foi submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, da Universidade Estadual de Londrina, e aprovado no dia 22 de dezembro de 2011, com modificação no dia 10 de março de 2016 (CAAE 53543116.7.0000.5231).

REFERÊNCIAS

- Alberich-Jordà M, Wouters B, Balastik M, Shapiro-Koss C, Zhang H, Di Ruscio A, et al. C/EBP γ deregulation results in differentiation arrest in acute myeloid leukemia. *J Clin Invest.* 2012; 122(12):4490-4504.
- Ali AT, Hochfeld WE, Myburgh R, Pepper MS. Adipocyte and adipogenesis. *Eur J Cell Biol.* 2013; 92(6-7):229-236.
- Allott EH, Hursting SD. Obesity and cancer: mechanistic insights from transdisciplinary studies. *Endocr Relat Cancer.* 2015; 22(6):R365-386.
- Alvarez MS, Fernandez-Alvarez A, Cucarella C, Casado M. Stable SREBP 1a knockdown decreases the cell proliferation rate in human preadipocyte cells without inducing senescence. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014; 447(1):51-56.
- Bao A, Li Y, Tong Y, Zheng H, Wu W, Wei C. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ and cisplatin synergistically induce apoptosis and cell cycle arrest in gastric cancer cells. *Int J Mol Med.* 2014; 33(5):1177-1184.
- Bell NH, Epstein S, Greene A, Shary J, Oexmann MJ, Shaw S. Evidence for alteration of vitamin D-endocrine system in obese subjects. *J Clin Invest.* 1985; 76(1):370-373.
- Billon N, Monteiro MC, Dani C. Developmental origin of adipocytes: new insights into a pending question. *Biol Cell.* 2008; 100(10): 563-575.
- Blumberg JM, Tzameli I, Astapova I, Lam FS, Flier JS, Hollenberg AN. Complex role of the vitamin D receptor and its ligand in adipogenesis in 3T3-L1 cells. *J Biol Chem.* 2006; 281(16):11205-11213.
- Carlberg C. Lipid soluble vitamins in gene regulation. *Biofactors.* 1999; 10(2-3):91-97.
- Carlberg C, Molnár F. Vitamin D receptor signaling and its therapeutic implications: Genome-wide and structural view. *Can J Physiol Pharmacol.* 2015; 93(5):311-318.
- Cornelius P, MacDougald OA, Lane MD. Regulation of adipocyte development. *Annu Rev Nutr.* 1994; 14:99-129.
- Didriksen A, Burild A, Jakobsen J, Fuskevåg OM, Jorde R. Vitamin D₃ increases in abdominal subcutaneous fat tissue after supplementation with vitamin D₃. *Eur J Endocrinol.* 2015; 172(3):235-241.
- Drincic AT, Armas LA, Van Diest EE, Heaney RP. Volumetric dilution, rather than sequestration best explains the low vitamin D status of obesity. *Obesity (Silver Spring).* 2012; 20(7):1444-1448.
- Fève B. Adipogenesis: cellular and molecular aspects. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2005; 19(4): 483-99.

- Fleet JC, DeSmet M, Johnson R, Li Y. Vitamin D and cancer: a review of molecular mechanisms. *Biochem J.* 2012; 441(1):61-76.
- Goeman F, De Nicola F, D'Onorio De Meo P, Pallocca M, Elmi B, Castrignanò T, Pesole G, Strano S, Blandino G, Fanciulli M, Muti P. VDR primary targets by genome-wide transcriptional profiling. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2014; 143:348-356.
- González-Pardo V, Suares A, Verstuyf A, De Clercq P, Boland R, de Boland AR. Cell cycle arrest and apoptosis induced by $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and TX 527 in Kaposi sarcoma is VDR dependent. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2014; 144 Pt A:197-200.
- Green H, Meuth M. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell.* 1974; 3:127-133.
- Green H, Kehinde O. Spontaneous heritable changes leading to increased adipose conversion in 3T3 cells. *Cell.* 1976; 7:105-113.
- Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Ver.* 1998; 78:783-809.
- Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol.* 2011; 29: 415-45.
- Heaney RP, Recker RR, Grote J, Horst RL, Armas LA. Vitamin D(3) is more potent than vitamin D(2) in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011; 96(3):E447-52.
- Heinäniemi M, Uski JO, Degenhardt T, Carlberg C. Meta-analysis of primary target genes of peroxisome proliferator-activated receptors. *Genome Biol.* 2007; 8(7):R147.
- Holick MF. The vitamin D epidemic and its health consequences. *J Nutr.* 2005; 135(11):2739S-2748S.
- Huggins CJ, Malik R, Lee S, Salotti J, Thomas S, Martin N, et al. C/EBP γ Suppresses Senescence and Inflammatory Gene Expression by Heterodimerizing with C/EBP β . *Mol Cell Biol.* 2013; 33(16):3242-58.
- Itahana K, Campisi J, Dimri GP. Mechanisms of cellular senescence in human and mouse cells. *Biogerontology* 2004; 5(1):1-10.
- Kong J, Li YC. Molecular mechanism of $1,25\text{dihydroxyvitamin D}_3$ inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006; 290(5):E916-E924.
- Lafontan M. Fat cells: afferent and efferent messages define new approaches to treat obesity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2005; 45:119-146.
- Lafontan M. Adipose tissue and adipocyte dysregulation. *Diabetes Metab.* 2014; 40(1):16-28.

Lahnalampi M, Heinäniemi M, Sinkkonen L, Wabitsch M, Carlberg C. Time-resolved expression profiling of the nuclear receptor superfamily in human adipogenesis. *PLoS One*. 2010; 5(9):e12991.

Landrier JF, Karkeni E, Marcotorchino J, Bonnet L, Tourniaire F. Vitamin D modulates adipose tissue biology: possible consequences for obesity? *Proc Nutr Soc*. 2016; 75(1):38-46.

Lee S, Shuman JD, Guszczynski T, Sakchaisri K, Sebastian T, Copeland TD, et al. RSK-Mediated Phosphorylation in the C/EBP β Leucine Zipper Regulates DNA Binding, Dimerization, and Growth Arrest Activity. *Mol Cell Biol*. 2010; 30(11):2621-2635.

Li HX, Gao JM, Liang JQ, Xi JM, Fu M, Wu YJ. Vitamin D3 potentiates the growth inhibitory effects of metformin in DU145 human prostate cancer cells mediated by AMPK/mTOR signalling pathway. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2015; 42(6): 711-717.

Malmberg P, Karlsson T, Svensson H, Lönn M, Carlsson NG, Sandberg AS, Jennische E, Osmancevic A, Holmäng A. A new approach to measuring vitamin D in human adipose tissue using time-of-flight secondary ion mass spectrometry: a pilot study. *J Photochem Photobiol B*. 2014; 138:295–301.

Mikkelsen TS, Xu Z, Zhang X, Wang L, Gimble JM, Lander ES, Rosen ED. Comparative epigenomic analysis of murine and human adipogenesis. *Cell*. 2010; 143: 156–169.

Ministério da Saúde. Vigitel Brasil 2014: Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico [Internet]. 2015; [português]. Disponível em: <http://www.portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/>.

Moreno-Navarrete JM, Fernández-Real JM. Adipose tissue biology: Adipocyte differentiation. Springer New York 2012: 17-28.

Narvaez CJ, Simmons KM, Brunton J, Salinero A, Chittur SV, Welsh JE. Induction of STEAP4 correlates with 1,25-dihydroxyvitamin D3 stimulation of adipogenesis in mesenchymal progenitor cells derived from human adipose tissue. *J Cell Physiol*. 2013; 228(10):2024-36.

Natarajan R. Vitamin D metabolites inhibit adipocyte differentiation in 3T3-L1 preadipocytes. 2008. 62f. Dissertação (Mestrado) - Graduate School of the University of Massachusetts Amherst, Estados Unidos da América, 2008.

Nimitphong H, Holick MF, Fried SK, Lee MJ. 25-hydroxyvitamin D₃ and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ promote the differentiation of human subcutaneous preadipocytes. *PLoS One*. 2012; 7(12):e52171.

Ntambi JM, Kim YC. Adipocyte differentiation and gene expression. *J Nutr*. 2000; 130(12):3122S-3126S.

Ntambi JM, Young-Cheul K. Adipocyte differentiation and gene expression. *J Nutr*. 2000; 130(12):3122S-3126S.

Pickholtz I, Saadyan S, Keshet GI, Wang VS, Cohen R, Bouwman P, Jonkers J, Byers SW, Papa MZ, Yarden RI. Cooperation between BRCA1 and vitamin D is critical for histone acetylation of the p21waf1 promoter and growth inhibition of breast cancer cells and cancer stem-like cells. *Oncotarget*. 2014; 5(23):11827-11846.

Pourshahidi LK. Vitamin D and obesity: current perspectives and future directions. *Proc Nutr Soc*. 2015; 74(2):115-124.

Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev*. 2000; 14(11):1293-1307.

Rosen ED, Hsu CH, Wang X, Sakai S, Freeman MW, Gonzalez FJ, Spiegelman BM. C/EBP α induces adipogenesis through PPAR γ : a unified pathway. *Genes Dev*. 2002; 16(1):22-26.

Rutkowski JM, Stern JH, Scherer PE. The cell biology of fat expansion. *J Cell Biol*. 2015; 208(5):501-512.

Saretzki G. Cellular senescence in the development and treatment of cancer. *Curr Pharm Des*. 2010; 16(1):79-100.

Schmidt SF, Jørgensen M, Chen Y, Nielsen R, Sandelin A, Mandrup S. Cross species comparison of C/EBP α and PPAR γ profiles in mouse and human adipocytes reveals interdependent retention of binding sites. *BMC Genomics*. 2011; 12:152.

Sebastian T, Johnson PF. Stop and Go: Anti-Proliferative and Mitogenic Functions of the Transcription Factor C/EBP β . *Cell Cycle*. 2006; 5(9):953-957.

Siersbæk R, Nielsen R, Mandrup S. Transcriptional networks and chromatin remodeling controlling adipogenesis. *Trends Endocrinol Metab*. 2012; 23(2):56-64.

Sikora E, Arendt T, Bennett M, Narita M. Impact of cellular senescence signature on ageing research. *Ageing Res Rev*. 2011; 10(1):146-152.

SNA, Sistema Nacional de Auditoria. Doenças ligadas à obesidade custam R\$ 488 milhões. [Internet]. 2013; [atualizado em 19/03/2013; em português]. Disponível em: <http://sna.saude.gov.br/noticias.cfm?id=5013>.

Soccio RE, Tuteja G, Everett LJ, Li Z, Lazar MA, Kaestner KH. Species-specific strategies underlying conserved functions of metabolic transcription factors. *Mol. Endocrinol*. 2011; 25: 694–706.

Tchkonia T, Morbeck DE, Von Zglinicki T, Van Deursen J, Lustgarten J, Scrable H, Khosla S, Jensen MD, Kirkland JL. Fat tissue, aging, and cellular senescence. *Aging Cell*. 2010; 9(5):667-684.

Tsiaras WG, Weinstock MA. Factors influencing vitamin D status. *Acta Derm Venereol*. 2011; 91(2): 115-124.

Valdivielso JM, Fernandez E. Vitamin D receptor polymorphisms and diseases. *Clin Chim Acta*. 2006; 371(1-2):1-12.

van Dijk SJ, Feskens EJM, Bos MB, Hoelen DWM, Heijligenberg R, Bromhaar MG, de Groot LCPGM, de Vries JHM, Müller M, Afman LA. A saturated fatty acid-rich diet induces an obesity-linked proinflammatory gene expression profile in adipose tissue of subjects at risk of metabolic syndrome. *Am J Clin Nutr*. 2009; 90(6):1656-1664.

Vidal-Puig A. Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the metabolic syndrome. *Endocrinol Nutr*. 2013; 60 Suppl 1:39-43.

Virtue S, Vidal-Puig A. It's not how fat you are, it's what you do with it that counts. *PLoS Biol*. 2008; 6(9):e237.

Vos MD, Ellis CA, Elam C, Ulku AS, Taylor BJ, Clark GJ. RASSF2 is a novel K-Ras specific effector and potential tumor suppressor. *J Biol Chem*. 2003; 278(30):28045-51.

Wabitsch M, Brüderlein S, Melzner I, Braun M, Mechtersheimer G, Möller P. LiSa-2, a novel human liposarcoma cell line with a high capacity for terminal adipose differentiation. *Int J Cancer*. 2000; 88(6):889-94.

Wabitsch M, Brenner RE, Melzner I, Braun M, Möller P, Heinze E, et al.. Characterization of a human preadipocyte cell strain with high capacity for adipose differentiation. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001; 25(1):8-15.

Walters MR. Newly identified actions of the vitamin D endocrine system. *Endocr Rev*. 1992; 13(4):719-764.

Wamberg L, Christiansen T, Paulsen SK, Fisker S, Rask P, Rejnmark L, Richelsen B, Pedersen SB. Expression of vitamin D-metabolizing enzymes in human adipose tissue -- the effect of obesity and diet-induced weight loss. *Int J Obes (Lond)*. 2013; 37(5):651-657.

WHO, Media Centre. Obesity and overweight [Internet]. WHO: Fact sheet N° 311; [atualizado em Janeiro 2015]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>.

Wood RJ. Vitamin D and adipogenesis: new molecular insights. *Nutr Rev*. 2008; 66(1):40-46.

Wortsman J, Matsuoka LY, Chen TC, Lu Z, Holick MF. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *Am J Clin Nutr*. 2000; 72(3):690-693.

Wu Z, Rosen ED, Brun R, Hauser S, Adelmant G, Troy AE, McKeon C, Darlington GJ, Spiegelman BM. Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol Cell*. 1999; 3(2):151-158.

Zamboni M, Rossi AP, Fantin F, Zamboni G, Chirumbolo S, Zoico E, Mazzali G. Adipose tissue, diet and aging. *Mech Ageing Dev* 2014; 136-137:129-137.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994; 372(6505):425-432.

Zhang Z, Zhang H, Hu Z, Wang P, Wan J, Li B. Synergy of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and carboplatin in growth suppression of SKOV-3 cells. *Oncol Lett*. 2014; 8(3):1348-1354.

Capítulo II

Artigo 1:

The role of the adipogenesis pathway in obese individuals: a pathway-based analysis in human subcutaneous adipose tissue

1 **The role of the adipogenesis pathway in obese individuals: a**
 2 **pathway-based analysis in human subcutaneous adipose**
 3 **tissue**

4 **The adipogenesis pathway in obese individuals**

5

6 Ingrid Felicidade^{1,2*}, Martina Kutmon^{2,3}, Mário Sérgio
 7 Mantovani⁴, Lúcia Regina Ribeiro¹, Chris T. Evelo^{2,3}, Susan L.
 8 Coort^{2*}.

9 1 – Department of Pathology, Medical School of Botucatu
 10 (FMB), São Paulo State University (UNESP), Botucatu, Brazil

11 2 – Department of Bioinformatics - BiGCaT, NUTRIM School
 12 for Nutrition and Translational Research in Metabolism,
 13 Maastricht University, Maastricht, The Netherlands

14 3 – Maastricht Centre for Systems Biology (MaCSBio),
 15 Maastricht University, Maastricht, The Netherlands

16 4 – Department of General Biology, State University of
 17 Londrina (UEL), Londrina, Brazil.

18 *These authors contributed equally to this work

19

20 Corresponding author:

21 Ingrid Felicidade

22 Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia
 23 Geral, Laboratório de Genética Toxicológica, Universidade
 24 Estadual de Londrina.

25 Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445 Km 380, Campus

26 Universitário. CEP 86057-970, Londrina/PR, Brazil.

27 Telephone/Fax: +55 43 3371-4977

28 E-mail: ingrid.felicidade@gmail.com

29

30 **Conflict of Interest:** The authors declare no conflict of
31 interest.

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51 **Abstract**

52 **Background:** Obesity is an important public health and
53 economic problem worldwide. Adipose tissue expansion plays
54 a role in the metabolic dysregulations in obesity. In addition to
55 storing excess fat, adipose tissue is the target organ for
56 lipophilic drugs and nutrients from diet, such as vitamin D3.

57 **Objectives:** The present study used a publicly available
58 transcriptomics dataset, comparing the gene expression in the
59 subcutaneous adipose tissue (SAT) from obese and lean
60 subjects. It aimed to investigate gene expression and their
61 interactions in biological processes to gain new insights in the
62 role of adipose tissue in obesity.

63 **Methods:** Correlation and linear regression analysis was
64 performed based on the metabolic characteristics to define the
65 experimental groups in the transcriptomics dataset. After pre-
66 processing of the transcriptomics dataset statistical analysis was
67 performed to select differentially expressed (DE) genes, in SAT
68 from obese versus lean subjects, which were used in pathway
69 and gene ontology analyses. A network was created from the
70 adipogenesis pathway with only the DE genes and extended
71 with other pathways, from the online pathway repository
72 WikiPathways, if these pathways shared at least one DE gene
73 with the adipogenesis pathway.

74 **Results:** In SAT 291 genes were differentially expressed in
75 obese subjects compared to lean. Pathway analysis revealed

76 that 12 pathways had overrepresentations of DE genes. A new
77 pathway was created based on the DE genes found in
78 adipogenesis pathway and literature knowledge. Interestingly,
79 the network analysis showed that adipogenesis is linked with
80 vitamin D based on DE genes in adipose tissue of obese
81 subjects compared to lean.

82 **Conclusion:** Our pathway-based approach showed that in SAT
83 from obese subjects compared to lean, molecular changes occur
84 in biological processes related to adipogenesis. Interestingly, it
85 revealed a link between adipogenesis and genes involved in
86 vitamin D metabolism and receptor pathways.

87

88

89

90

91

92

93

94

95

96

97

98

99

100

101 INTRODUCTION

102 Obesity has been recognized as a major public health and
103 economic problem and is classified by body mass index (BMI).
104 Obese individuals often have an impaired insulin tolerance
105 together with other metabolic dysregulations but they can also
106 show no aberrant metabolic features (1). Adipose tissue
107 expansion is known to contribute to metabolic dysregulations in
108 obesity.

109 Subcutaneous adipose tissue (SAT) is the largest fat depot in
110 humans and it is also the preferred organ where lipophilic drugs
111 and nutrients from diet accumulate. The capacity of SAT to
112 accommodate excess fat is regulated by the ability of the
113 existing adipose cells to expand (hypertrophy) and/or recruit
114 precursor cells into adipogenic differentiation (hyperplasia).
115 During the adipose tissue expansion, several biological
116 pathways can in principle be affected considering the adipose
117 tissue heterogeneity being composed of various microvascular
118 and immune cells besides adipocytes (2). As a key organ for the
119 energy homeostasis, increase in energy intake and decrease in
120 energy expenditure induces changes in immune cells and in
121 production of adipokines and cytokines leading to chronic low-
122 grade inflammation (2). These processes allow the adipose
123 tissue to play a key role on metabolic homeostasis as well as in
124 the control of the bioavailability of the compounds stored in the
125 tissue.

126 Defining obesity based only on BMI is not a sufficiently
127 sensitive marker for risk prediction for associated metabolic
128 disorders. For such an early prediction of development of
129 metabolic disorders, the investigation of pathways and markers
130 is essential. In this context, investigating and understanding the
131 adipose tissue developmental mechanisms could help to
132 understand this heterogeneous disorder. The present study uses
133 a publicly available transcriptomics dataset of SAT from obese
134 and lean subjects, from Keller *et al.*(3), and aims to investigate
135 the differences in gene expression profiling linked to biological
136 pathways to gain new insights into the role of adipose tissue in
137 obesity.

138 **METHODS**

139 A pathway-based analysis was applied to investigate the SAT
140 gene expression differences between obese and lean subjects.
141 The analysis as described in Figure 1 is an adaptation from the
142 workflow previously described by Kutmon *et al.* (4).

143 *Transcriptomics dataset*

144 The transcriptomics data used was part of a published study by
145 Keller *et al.* (3) and is available in the Gene Expression
146 Omnibus (<http://identifiers.org/geo/GSE27951>). The authors
147 originally divided the dataset in lean (n=6), overweight (n=10)
148 and obese (n=17) subjects and they were classified according to
149 glucose tolerance levels (normal, impaired glucose tolerance or
150 insulin insensitive). Adipose tissue was obtained by biopsies of

151 the subcutaneous abdominal region, free from visible blood,
152 connective tissue and after overnight fasting (3). A general
153 health examination with fasting insulin and glucose, HbA1c
154 and BMI measures were performed, and glucose tolerance
155 classification was done after an oral glucose tolerance test.

156 In the present study, we studied the differences between
157 adipose tissue from obese and lean subjects. A correlation and
158 linear regression analysis was performed, using
159 R/Bioconductor software, to determined which variables have
160 more explanatory power than BMI. The experimental groups
161 were selected based not only on BMI, but also in metabolic
162 characteristics of the individuals. After removing the
163 overweight and obese subjects with normal glucose tolerance
164 we identified 5 lean and 8 obese subjects, forming two different
165 groups in the PCA analysis. The obese subjects have an
166 impaired glucose tolerance and are in a prediabetic state.

167 *Affymetrix microarray analysis*

168 The global gene expression was measured in adipose tissue
169 from the lean and obese subjects with the Affymetrix Human
170 Genome U133 Plus 2.0 microarray. ArrayAnalysis.org (5) was
171 used to reanalyze the raw data for the selected subjects. The
172 quality of the raw data was determined and thereafter the data
173 was normalized using the GCRMA method. The statistics
174 module of ArrayAnalysis.org was used to apply linear
175 regression models to compare obese versus lean subjects. The

176 genes with average expression < 5 (on a $2\log$ scale) were
177 removed. Genes were considered differentially expressed when
178 absolute $2\log\text{FC}$ ($\log\text{FC}$) > 0.58 and $p\text{-value} < 0.05$.

179 *Pathways analysis*

180 The pathways analysis was performed in PathVisio 3.2.0 (6) to
181 interpret and visualize the molecular changes on a pathway
182 level. The human pathway collection, containing 292 pathways
183 (downloaded on 22/09/2015), was obtained from
184 WikiPathways (7). An overrepresentation analysis was
185 performed using the DE genes and the pathways were
186 considered significantly changed when (i) Z-score > 1.96 , (ii)
187 permuted $p\text{-value} < 0.05$ and (iii) minimum number of
188 changed genes is 3. The $\log\text{FC}$ and $p\text{-value}$ were visualized on
189 selected pathways using PathVisio.

190 Finally, a detailed adipogenesis pathway was created in
191 PathVisio, based on the DE genes and a literature review (List
192 of references available in Supplementary Information).

193 To improve the biological interpretation. The pathway, entitled
194 Transcription factor regulation in adipogenesis pathway, is
195 available at WikiPathways.

196 *Gene ontology analysis*

197 Gene Ontology (GO) analysis was performed using the GO-
198 Elite web-interface (8) to identify biological processes, cellular
199 components and molecular functions based on the DE genes in
200 the SAT of obese subjects compared to lean subjects. The

201 following settings were used: (i) 2000 permutations, (ii) Z-
202 score pruning algorithm, (iii) Z-score threshold > 1.96 , (iv) p-
203 value threshold < 0.05 and (v) minimum number of changed
204 genes is 3. GO-Elite uses an advanced ontology enrichment
205 pruning algorithm to report a minimal non-redundant set of
206 results.

207 *Network integrations*

208 The network analysis and visualization tool Cytoscape 3.2.1
209 was used to find other relevant pathways linked to the
210 adipogenesis pathway (9). First, a network was created with the
211 pathway-gene associations of the adipogenesis pathway and all
212 its DE genes. Then pathways from the WikiPathways collection
213 were added that also contained genes that are in the
214 adipogenesis pathway and were differentially expressed.
215 Thereafter, the other DE genes in the included pathways were
216 added to the network. The final network contains two types of
217 nodes, pathways and genes, and the edges show that a gene is
218 present in a specific pathway. Every gene present has at least
219 one edge connecting it to a pathway node. Finally, the logFC
220 and p-value were visualized on the gene nodes and the z-scores
221 were visualized on the pathway nodes.

222 **RESULTS**

223 *Study groups*

224 The correlation analysis (Table S1) of the subjects showed a
225 positive correlation between BMI and fasting insulin, and a

226 negative correlation between BMI and fasting glucose and
 227 between fasting glucose and fasting insulin.

228 Using multiple linear regression it was observed that fasting
 229 insulin ($p = 0.0008$) and glucose ($p = 0.0208$) levels and,
 230 HbA1c ($p = 0.0335$) have the most significant explanatory
 231 contribution to BMI. Therefore, we selected the groups not
 232 only based on BMI but those metabolic characteristics were
 233 also considered. The anthropometric and metabolic
 234 characteristics of the subjects selected are described in Table
 235 S2. These characteristics show that the obese subjects have an
 236 impaired glucose tolerance and are in a prediabetic state based
 237 on the fasting glucose and insulin levels.

238 *Differential expression*

239 In the selected human adipose tissue dataset 20 111 genes were
 240 measured and annotated with Ensembl gene identifiers.
 241 Statistical analysis showed, after adjustment for low expressed
 242 genes, that 291 genes were differentially expressed. In total 148
 243 genes were upregulated and 143 genes were downregulated in
 244 SAT of obese subjects compared to the lean control group. The
 245 complete list of genes is shown in Table S3 and S4, and a PCA
 246 analysis with DE genes is shown in Figure S1.

247 *Pathway analysis*

248 The pathway analysis identified 12 significantly changed
 249 pathways (Table 1). Several pathways linked with obesity were
 250 significantly changed like complement activation,

251 adipogenesis, fatty acids biosynthesis and the integrated cancer
252 pathway. Interestingly, also some general pathways were
253 affected in SAT of obese subjects *e.g.* GPCR related pathways,
254 allograft rejection and constitutive androstane receptor
255 pathway. The change in gene expression and the significance
256 level was visualized on the pathways shown in the
257 Supplementary Information (Figure S2-S13).

258 An important pathway associated with adipocyte expansion in
259 obesity is the adipogenesis pathway (Figure 2A). This pathway
260 clearly shows the genes involved in the adipogenesis but does
261 not show the exact mechanisms of the process. . The pathway
262 contains nine significantly downregulated and one significantly
263 upregulated gene. The upregulated gene is leptin (*LEP*) which
264 is commonly increased in adipose tissue of obese subjects (10).
265 The downregulated genes are *CEBPD*, *FOXO1A*, *IRS2*, *LPIN1*,
266 *NR3C1*, *NRIP1* (*RIP140*), *PCK2*, *RXRA* and *TWIST1*. To better
267 represent the adipogenesis process we created a new pathway
268 entitled Transcription factor regulation in adipogenesis, at
269 WikiPathways
270 (<http://www.wikipathways.org/instance/WP3599>), showing the
271 interactions between the DE genes of adipogenesis pathway
272 and target genes in the process, based on literature analysis
273 (Figure 2B).

274 *Biological process*

275 The GO analysis revealed 92 biological processes, 9 cellular

276 components and 15 molecular functions changed in obese SAT
277 compared to lean (Table S5). The most relevant biological
278 processes related to obesity and metabolic disorders and their
279 associated genes are shown in Table S6.

280 *Network integration*

281 A network biology approach was used to identify all human
282 biological pathways in the WikiPathways collection in which
283 the DE genes in the adipogenesis pathway are present.

284 Besides the genes present in the adipogenesis pathway, the
285 created network (Figure 3) also shows 25 biological pathways,
286 from WikiPathways repository, that share at least one DE gene
287 with adipogenesis pathway. The DE genes in SAT that are part
288 of these processes were also added to the network.

289 The network contains 81 edges connecting 62 nodes, consisting
290 of 36 gene products and 26 pathways (Figure 3A and Table
291 S7). Out of the 25 added biological pathways, four were
292 significantly altered (z-score > 1.96). These are the vitamin D
293 receptor pathway, vitamin D metabolism, constitutive
294 androstane receptor pathway and farnesoid x receptor pathway
295 (Figure 3B).

296 **DISCUSSION**

297 The present study identified biological pathways that are
298 affected on a molecular level in SAT in obese compared to lean
299 individuals. A prominent process in obesity is adipogenesis
300 which was among the significantly altered pathways. However

301 the adipogenesis process in WikiPathways only consists of
302 gene lists and is lacking interactions. To get a better
303 understanding of the adipogenesis pathway and the interactions
304 between the DE genes, we created a new pathway diagram in
305 WikiPathways. Furthermore, a network was created based on
306 the adipogenesis gene expression profile to identify other
307 pathways in which the DE adipogenesis genes were present.
308 This network reflects the gene expression and pathways altered
309 in obese subjects with impaired insulin sensitivity.
310 Interestingly, this network approach revealed a relation
311 between obesity and vitamin D3 metabolism in SAT.
312 It has been demonstrated that insulin resistance in obesity is
313 related to an impaired adipogenesis. The impaired adipogenesis
314 could result in a limited capacity to increase the adipose tissue
315 mass by hypertrophy and/or hyperplasia (11). An important
316 process required for adipogenesis is angiogenesis which is
317 commonly affected by obesity (10), and also observed in our
318 GO analysis by changes in regulation of angiogenesis,
319 vasculature and blood vessels biological processes.
320 During adipogenesis dysfunction the cell infiltration and
321 cytokines pro-inflammatory secretion increase in adipose
322 tissue, and a low-grade inflammation is established (11). Our
323 results are in line with these findings since genes in processes
324 related with immune response, including the complement
325 pathway, were mostly upregulated in obese SAT.

326 In addition to storing lipids, the adipose tissue is an endocrine
327 organ. Leptin is one of the hormones produced by adipose
328 tissue and modulates the inflammation response and regulates
329 the energy balance. Recently, Kelder *et al.* (12) created a white
330 adipose tissue health reference network based on adipogenesis,
331 in which *LEP* expression was significantly downregulated
332 while in our study the expression is upregulated, confirming
333 the involvement of *LEP* in obese adipose tissue.

334 Increase in *LEP* expression has been associated with
335 downregulation of *CEBPD*, *RXRA* and *FOXO1A* (13). *PPARG*
336 and the *CEBP* family are the main regulators of the
337 transcriptional development and differentiation in adipose
338 tissue.

339 Moreover, in an obese state, the action of glucocorticoids is
340 impaired. Our analysis revealed a downregulation of *NR3C1*,
341 demonstrating another mechanism that could decrease
342 adipogenesis process initiation, given the importance of
343 hormone stimulation. Tomlinson *et al.* (14) demonstrated that
344 glucocorticoids increase the insulin sensitivity through *IRS1*
345 and *IRS2* activation by *FOXO1A*, however, *FOXO1A* is also
346 known as a negative regulator of *PPARG* (13).

347 In the original adipogenesis pathway from WikiPathways the
348 expression of most genes was downregulated demonstrating
349 that adipogenesis is negatively correlated with obesity at the
350 molecular level. The expression of *TWIST1* is downregulated

351 which could result in an inhibition of the negative feedback of
352 pro-inflammatory cytokines like *LEP* (15). Moreover, in line
353 with our findings, Miranda *et al.* (16) showed a downregulation
354 of *LPIN1* in insulin resistance and low-grade inflammation
355 associated with obesity. Another nuclear receptor
356 downregulated in adipogenesis pathway was *NRIP1* which is
357 responsible for controlling diverse physiological functions as
358 co-activator and repressor for nuclear receptors (17) and is
359 downregulated in SAT of obese women (18).

360 Recently, it has been demonstrated that obesity is a risk factor
361 for the development of vitamin D3 deficiency (19).
362 Interestingly, our pathway analysis revealed that in addition to
363 adipogenesis also the vitamin D3 receptor pathway is
364 significantly altered in SAT of obese subjects. The network
365 analysis also showed a clear link between adipogenesis and
366 vitamin D3 receptor and metabolism pathways based on
367 changes in gene expression.

368 Although vitamin D3 levels in blood and adipose tissue were
369 not measured in the obese and lean subjects, the changes in
370 gene expression direct towards an altered vitamin D3 action.

371 Recently, Carlberg *et al.* (20) showed an upregulation of *CD14*,
372 a known primary vitamin D3 target, in adipose tissue after 5
373 months of vitamin D3 supplementation without changes in the
374 genetic expression of the vitamin D receptor (*VDR*). Our study
375 confirms that *CD14* gene expression is significantly

376 upregulated in SAT during obesity. Moreover, Ryyänänen *et al.*
377 (21) study showed a downregulation of *NRIP1*, another vitamin
378 D3 responsive gene in human adipose tissue, which was
379 downregulated and present in the adipogenesis and *VDR*
380 pathways.

381 In the vitamin D receptor pathway the expression of several
382 genes was upregulated in adipose tissues during obesity like
383 *HLA-DRB1* a gene linked with complement activation, and
384 *S100A4* a gene encoding a protein of the calcium ion bond
385 family (22). In addition, other genes were downregulated, i.e.,
386 *ADRB* a thermogenesis gene known to be downregulated in
387 obese SAT, *CDC34*, a gene playing a role in cell cycle by
388 degradation of G1 regulator, and *ID1* a transcription factor
389 associated with several cellular processes, *e.g.* proliferation,
390 differentiation and cell fate determination (23-25).

391 Based on pathway and network analysis, a biological network
392 was created which originates from the adipogenesis pathways.

393 The network identified the most relevant pathways altered in
394 obese SAT and the key genes involved. Furthermore, the
395 network analysis showed that adipogenesis is linked with
396 vitamin D metabolism and receptor based on DE genes in
397 adipose tissue of obese subjects compared to lean.

398 Our pathway-based approach showed that in SAT from obese
399 subjects compared to lean, molecular changes can be used to
400 identify biological processes of interest and their interactions.

401 The current paper also provides new hypotheses for future
 402 studies related to obesity and vitamin D deficiency.

403 **Acknowledgements**

404 We would like to thank Keller *et al.* for making the data
 405 available in a public repository enabling us to perform our
 406 analysis. Financial supported by CAPES (Proc. nº 9933/2014-
 407 00), CNPq and the EU FP7 project MICROGENNET (EU
 408 Marie Curie action program IRSES grant 269210,
 409 www.microgennet.org).

410 **Conflict of Interest**

411 The authors declare no conflict of interest.

412 **Supplementary information**

413 Supplementary information (SI) is available at International
 414 Journal of Obesity's website.

415 **REFERENCES**

- 416 1. Gustafson B, Hedjazifar S, Gogg S, Hammarstedt A,
 417 Smith U. Insulin resistance and impaired adipogenesis. Trends
 418 Endocrinol Metab. 2015;26(4):193-200.
- 419 2. Lafontan M. Adipose tissue and adipocyte
 420 dysregulation. Diabetes Metab. 2014;40(1):16-28.
- 421 3. Keller P, Gburcik V, Petrovic N, Gallagher IJ,
 422 Nedergaard J, Cannon B, et al. Gene-chip studies of
 423 adipogenesis-regulated microRNAs in mouse primary
 424 adipocytes and human obesity. BMC Endocr Disord.
 425 2011;11:7.

- 426 4. Kutmon M, Evelo CT, Coort SL. A network biology
 427 workflow to study transcriptomics data of the diabetic liver.
 428 BMC Genomics. 2014;15:971.
- 429 5. Eijssen LM, Jaillard M, Adriaens ME, Gaj S, de Groot
 430 PJ, Muller M, et al. User-friendly solutions for microarray
 431 quality control and pre-processing on ArrayAnalysis.org.
 432 Nucleic Acids Res. 2013;41(Web Server issue):W71-6.
- 433 6. Kutmon M, van Iersel MP, Bohler A, Kelder T, Nunes
 434 N, Pico AR, et al. PathVisio 3: an extendable pathway analysis
 435 toolbox. PLoS Comput Biol. 2015;11(2):e1004085.
- 436 7. Kutmon M, Riutta A, Nunes N, Hanspers K,
 437 Willighagen EL, Bohler A, et al. WikiPathways: capturing the
 438 full diversity of pathway knowledge. Nucleic Acids Res. 2015.
- 439 8. Zambon AC, Gaj S, Ho I, Hanspers K, Vranizan K,
 440 Evelo CT, et al. GO-Elite: a flexible solution for pathway and
 441 ontology over-representation. Bioinformatics.
 442 2012;28(16):2209-10.
- 443 9. Su G, Morris JH, Demchak B, Bader GD. Biological
 444 network exploration with cytoscape 3. Curr Protoc
 445 Bioinformatics. 2014;47:8 13 1-8 24.
- 446 10. Trayhurn P. Hypoxia and adipocyte physiology:
 447 implications for adipose tissue dysfunction in obesity. Annu
 448 Rev Nutr. 2014;34:207-36.

- 449 11. Vidal-Puig A. Adipose tissue expandability, lipotoxicity
450 and the metabolic syndrome. *Endocrinol Nutr.* 2013;60 Suppl
451 1:39-43.
- 452 12. Kelder T, Summer G, Caspers M, van Schothorst EM,
453 Keijer J, Duivenvoorde L, et al. White adipose tissue reference
454 network: a knowledge resource for exploring health-relevant
455 relations. *Genes Nutr.* 2015;10(1):439.
- 456 13. Nakae J, Oki M, Cao Y. The FoxO transcription factors
457 and metabolic regulation. *FEBS Lett.* 2008;582(1):54-67.
- 458 14. Tomlinson JJ, Boudreau A, Wu D, Abdou Salem H,
459 Carrigan A, Gagnon A, et al. Insulin sensitization of human
460 preadipocytes through glucocorticoid hormone induction of
461 forkhead transcription factors. *Mol Endocrinol.*
462 2010;24(1):104-13.
- 463 15. Dobrian AD. A tale with a Twist: a developmental gene
464 with potential relevance for metabolic dysfunction and
465 inflammation in adipose tissue. *Front Endocrinol (Lausanne).*
466 2012;3:108.
- 467 16. Miranda M, Escote X, Alcaide MJ, Solano E,
468 Ceperuelo-Mallafre V, Hernandez P, et al. Lpin1 in human
469 visceral and subcutaneous adipose tissue: similar levels but
470 different associations with lipogenic and lipolytic genes. *Am J*
471 *Physiol Endocrinol Metab.* 2010;299(2):E308-17.

- 472 17. Nautiyal J, Christian M, Parker MG. Distinct functions
 473 for RIP140 in development, inflammation, and metabolism.
 474 Trends Endocrinol Metab. 2013;24(9):451-9.
- 475 18. Mejhert N, Laurencikiene J, Pettersson AT, Kaaman M,
 476 Stenson BM, Ryden M, et al. Role of Receptor-Interacting
 477 Protein 140 in human fat cells. BMC Endocr Disord.
 478 2010;10:1.
- 479 19. Didriksen A, Burild A, Jakobsen J, Fuskevag OM, Jorde
 480 R. Vitamin D3 increases in abdominal subcutaneous fat tissue
 481 after supplementation with vitamin D3. Eur J Endocrinol.
 482 2015;172(3):235-41.
- 483 20. Carlberg C, Seuter S, de Mello VD, Schwab U,
 484 Voutilainen S, Pulkki K, et al. Primary vitamin D target genes
 485 allow a categorization of possible benefits of vitamin D(3)
 486 supplementation. PLoS One. 2013;8(7):e71042.
- 487 21. Ryynanen J, Neme A, Tuomainen TP, Virtanen JK,
 488 Voutilainen S, Nurmi T, et al. Changes in vitamin D target gene
 489 expression in adipose tissue monitor the vitamin D response of
 490 human individuals. Mol Nutr Food Res. 2014;58(10):2036-45.
- 491 22. Xuan X, Li Q, Zhang Z, Du Y, Liu P. Increased
 492 expression levels of S100A4 associated with hypoxia-induced
 493 invasion and metastasis in esophageal squamous cell cancer.
 494 Tumour Biol. 2014;35(12):12535-43.
- 495 23. Pagano M. Cell cycle regulation by the ubiquitin
 496 pathway. FASEB J. 1997;11(13):1067-75.

- 497 24. Satyanarayana A, Klarmann KD, Gavrilova O, Keller
498 JR. Ablation of the transcriptional regulator Id1 enhances
499 energy expenditure, increases insulin sensitivity, and protects
500 against age and diet induced insulin resistance, and
501 hepatosteatosis. FASEB J. 2012;26(1):309-23.
- 502 25. Kurylowicz A, Jonas M, Lisik W, Jonas M, Wicik ZA,
503 Wierzbicki Z, et al. Obesity is associated with a decrease in
504 expression but not with the hypermethylation of thermogenesis-
505 related genes in adipose tissues. J Transl Med. 2015;13:31.

506

507 **FIGURE LEGENDS**

508 **Figure 1. Pathway-based analysis workflow.** First, a publicly
509 available transcriptomics dataset (GSE27951) from Keller *et al.*
510 (5) was selected. Second, correlation and linear regression
511 analyses were performed based on the metabolic characteristics
512 of the selected transcriptomics dataset to define the
513 experimental groups. Third, quality of the raw transcriptomics
514 data was investigated and the data were normalized and
515 clustered. Fourth, the normalized dataset was used for statistical
516 analysis resulting in a list of differentially expressed genes.
517 These genes were used in pathway and gene ontology analysis.
518 To perform pathway analysis a pathway collection is needed.
519 Pathway statistics are performed to obtain a list of altered
520 biological pathways and the statistically analyzed
521 transcriptomics data can visualized on the pathways. The

522 adipogenesis pathway was selected and based on the DE genes
 523 in this pathway a new pathway was created. Gene ontology
 524 analysis requires the gene ontology classes and will result in a
 525 list of altered biological processes. Finally, network analysis is
 526 performed to combine the pathway results and extend it with
 527 knowledge from the online pathway repository, WikiPathways.

528

529 **Figure 2. Visualization of changes in adipose tissue gene**
 530 **expression in obesity on two adipogenesis pathways.** Genes
 531 differentially expressed in subcutaneous adipose tissue (SAT)
 532 from obese subjects, compared with lean subjects, visualized in
 533 two adipogenesis pathways. (A) Original Adipogenesis
 534 pathway from WikiPathways
 535 (<http://www.wikipathways.org/instance/WP236>) and (B)
 536 Transcription factor regulation in adipogenesis, for the present
 537 study (<http://www.wikipathways.org/instance/WP3599>). This
 538 pathway is based on a literature review and shows the
 539 interaction between the adipogenesis genes DE expressed in
 540 obese SAT compared with lean. In the two pathways the genes
 541 are shown as black rectangular boxes. The boxes are split up in
 542 two parts. At the left the 2logFC is visualized and at the right
 543 the significant level (p-value) is indicated. Moreover, the not
 544 measured genes and low-expressed genes are visualized.

545

546 **Figure 3. Network visualization of pathways and**

547 **differentially expressed genes in adipose tissue in obesity.**
548 The interactions between differentially expressed genes in
549 subcutaneous adipose tissue in obese compared to lean subjects
550 and pathways. (A) The network shows interactions between
551 pathways and genes linked with the differentially expressed
552 adipogenesis genes. (B) The network is a selection of network
553 A in which significantly altered pathways are selected and
554 connected to the differentially expressed genes in the
555 adipogenesis pathway. The pathways are demonstrated as gray
556 hexagons, differing size according with z-score, and genes as
557 gradient of red and blue ellipse, up and downregulated
558 respectively. Green border was used for significantly changes
559 ($p < 0.05$).

FIGURES AND TABLE

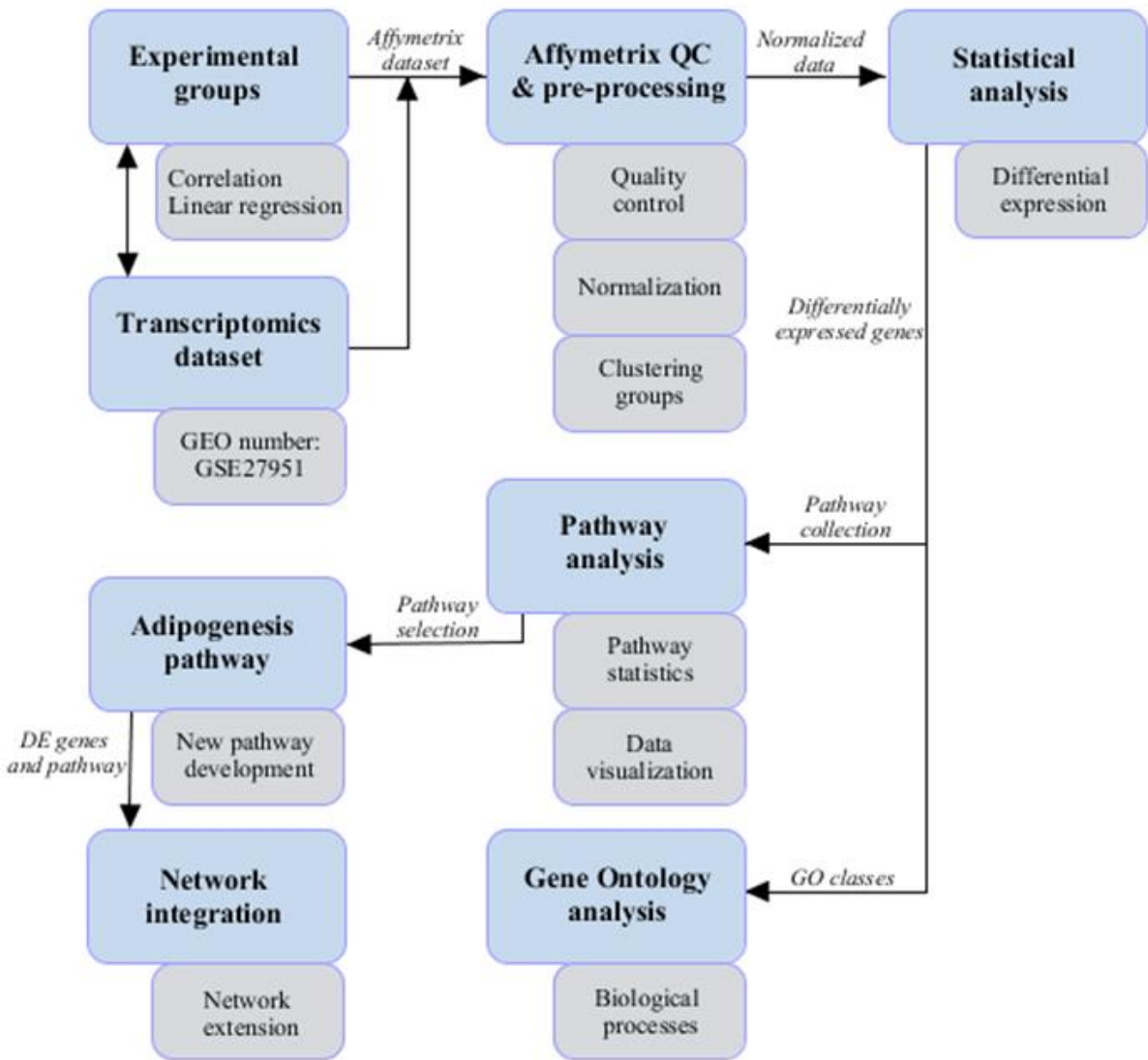
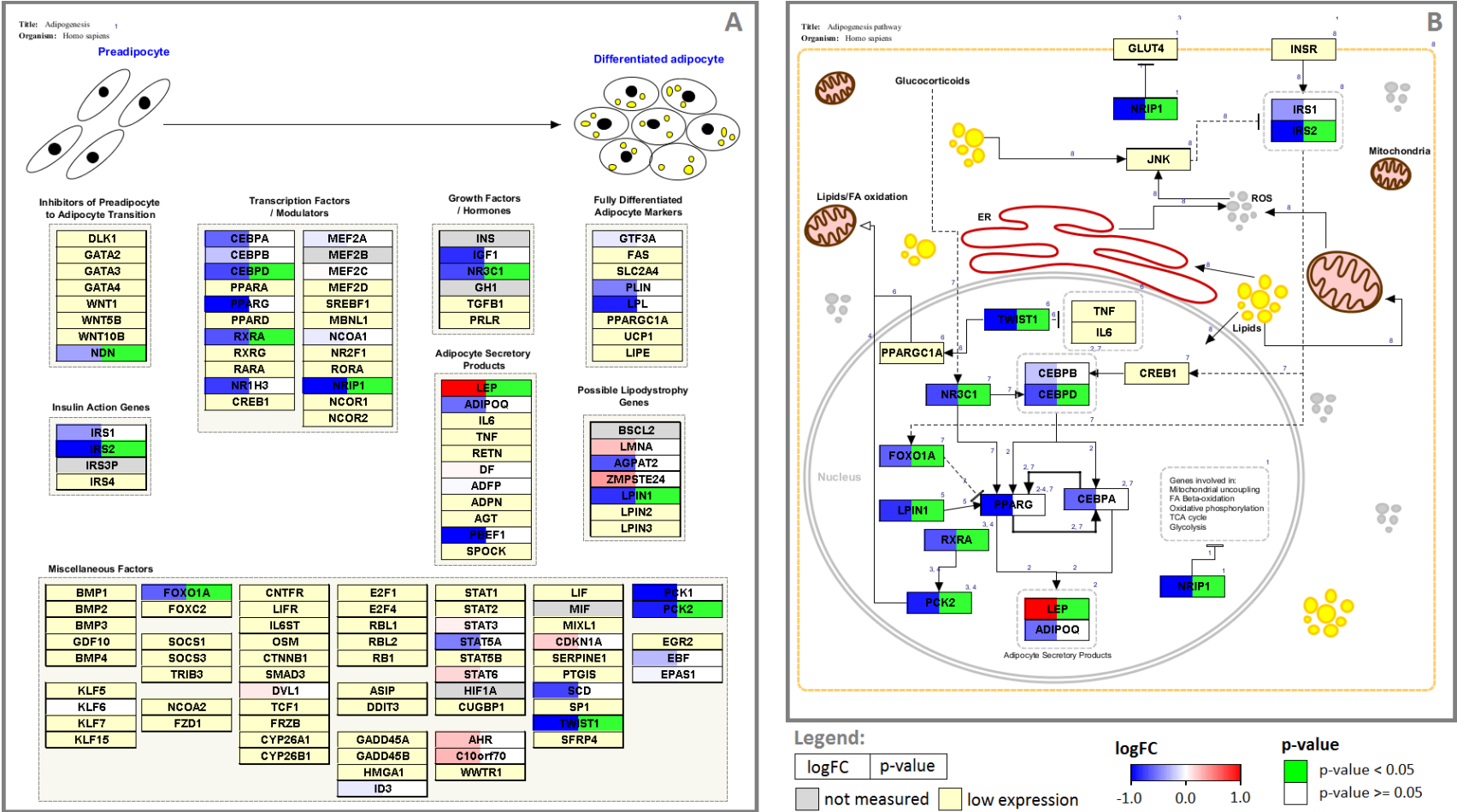


Figure 1. Pathway-based analysis workflow.



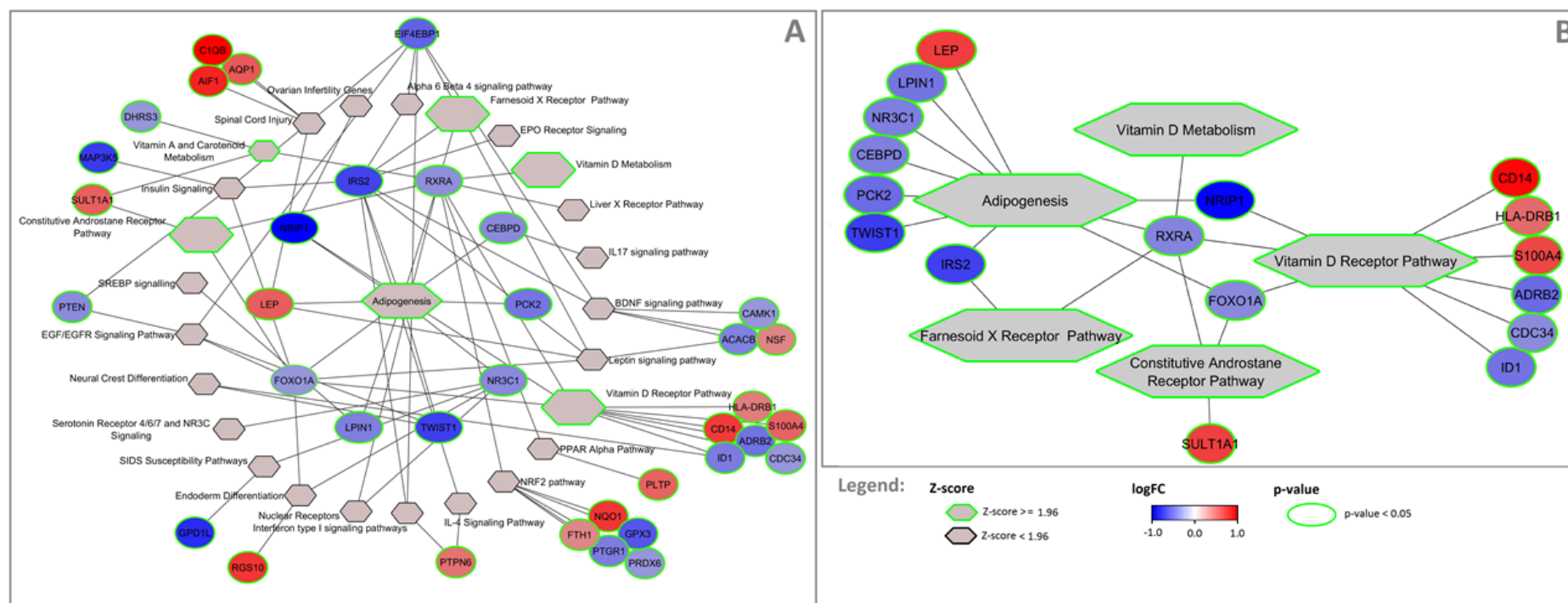


Figure 3. Network visualization of pathways and differentially expressed genes in adipose tissue in obesity.

Table 1. Pathways significantly changed in obese individuals compared to lean.

Pathway	Z-score	p-value	Changed genes	Genes	Relation
Complement activation	4.900	0.000	5 / 24	↑ C1QA, C1QB, C1QG, C1R, C1S	Obesity
GPCRs, other	4.290	0.000	3 / 118	↑ FY ↓ GPR116, ADRB2	General
Complement and coagulation cascades	4.250	0.000	7 / 64	↑ C1QA, C1QB, C1QG, C1S, C1R, CFH, CLU	Obesity
Vitamin D Receptor Pathway	3.500	0.001	9 / 188	↑ CD14, HLA-DRB1, S100A4 ↓ RXRA, ADRB2, NRIP1, CDC34, ID1, FOXO1	Obesity
Allograft rejection	3.380	0.006	7 / 113	↑ CCL19, COL5, HLA-DRB1, HLA-DMB, HLA-DPB1, HLA-DPA1, HLA-DQB1	General
miRNA targets in ECM and membrane receptors	3.170	0.005	5 / 46	↑ COL1A2, COL5A1, COL6A2, ITGB5, THBS2	General
Fatty acid biosynthesis	2.980	0.010	5 / 33	↓ HADHSC, ACACB, ACSS2, ECHDC2, ECHDC3	Obesity
Adipogenesis	2.870	0.005	10 / 132	↑ LEP ↓ CEBPD, FOXO1A, IRS2, LPIN1, NR3C1, NRIP1, PCK2, RXRA, TWIST1	Obesity
Glycerophospholipid biosynthetic pathway	2.560	0.010	3 / 94	↑ PTDSS1 ↓ CRLS1, LPIN1	Obesity
GPCRs, class A rhodopsin-like	2.300	0.024	3 / 272	↑ AGTRL1, NPY1R ↓ ADRB2	General
Integrated cancer pathway	2.300	0.014	3 / 50	↑ CDC25B ↓ PTEN, ASK1	Obesity
Constitutive androstane	2.080	0.036	3 / 34	↑ SULT1A1	General

receptor pathway

↓ FOXO1, RXRA

The pathways are ranked according the Z-score. The changed genes are represented as the number of differentially expressed in the pathway compared to the total number of measured genes in the pathway. The arrows indicates up (↑) and downregulated (↓).

SUPPLEMENTARY INFORMATION**List of references***References SI*

Literature reviewed for the construction of the new adipogenesis pathway.

1. Tontonoz P, Hu E, Devine J, Beale EG, Spiegelman BM. PPAR gamma 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol Cell Biol.* 1995;15(1):351-7.
2. Beale EG, Forest C, Hammer RE. Regulation of cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression in adipocytes. *Biochimie.* 2003;85(12):1207-11.
3. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature.* 2006;444(7121):860-7.
4. Miranda M, Escote X, Alcaide MJ, Solano E, Ceperuelo-Mallafre V, Hernandez P, et al. Lpin1 in human visceral and subcutaneous adipose tissue: similar levels but different associations with lipogenic and lipolytic genes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010;299(2):E308-17.
5. Lowe CE, O'Rahilly S, Rochford JJ. Adipogenesis at a glance. *J Cell Sci.* 2011;124(Pt 16):2681-6.
6. Rosell M, Jones MC, Parker MG. Role of nuclear receptor corepressor RIP140 in metabolic syndrome. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1812(8):919-28.
7. Dobrian AD. A tale with a Twist: a developmental gene with potential relevance for metabolic dysfunction and inflammation in adipose tissue. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2012;3:108.
8. Siersbaek R, Nielsen R, Mandrup S. Transcriptional networks and chromatin remodeling controlling adipogenesis. *Trends Endocrinol Metab.* 2012;23(2):56-64

Figures

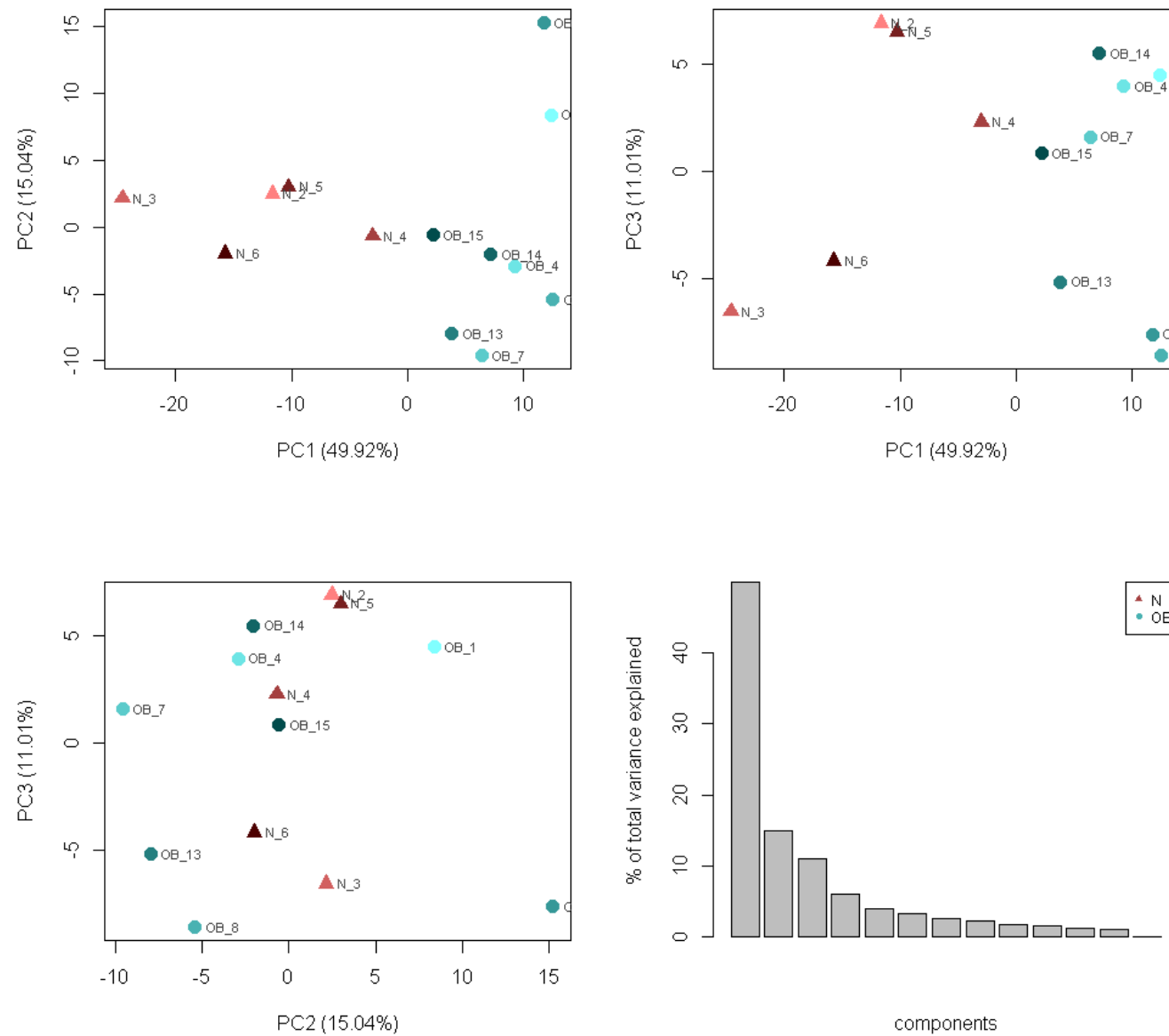


Figure S1 – PCA analysis. Results from DE genes of obese and lean individuals, after GCRMA normalization.

Title: Complement Activation
 Availability: CC BY 2.0
 Organism: Homo sapiens

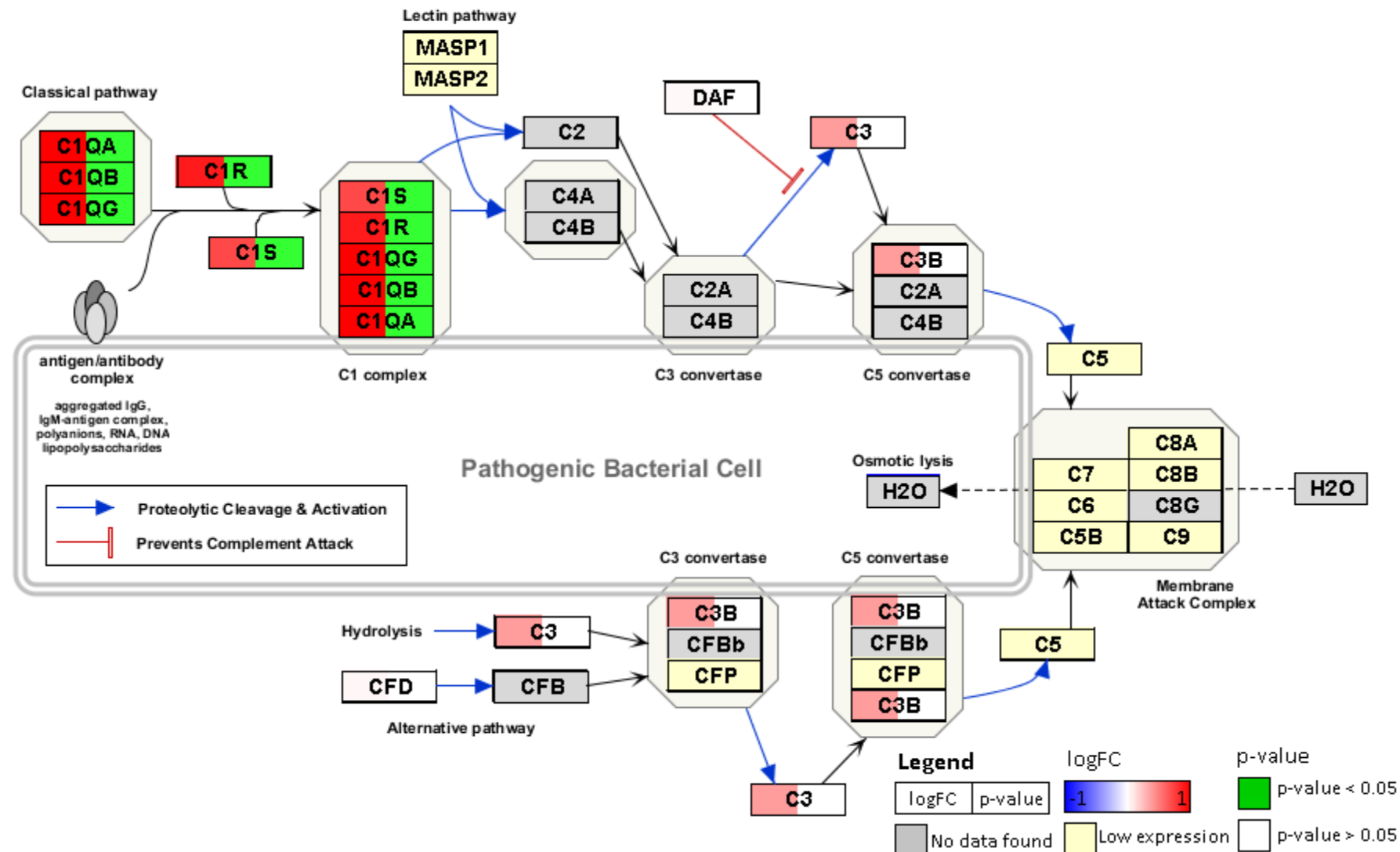


Figure S2 – Complement activation pathway from WikiPathways. Genes differentially expressed in adipose tissue dataset visualized in the pathway. (<http://www.wikipathways.org/instance/WP545>)

Title: GPCRs, Other
 Last modified: 10/15/2013^{1, 2}
 Organism: Homo sapiens

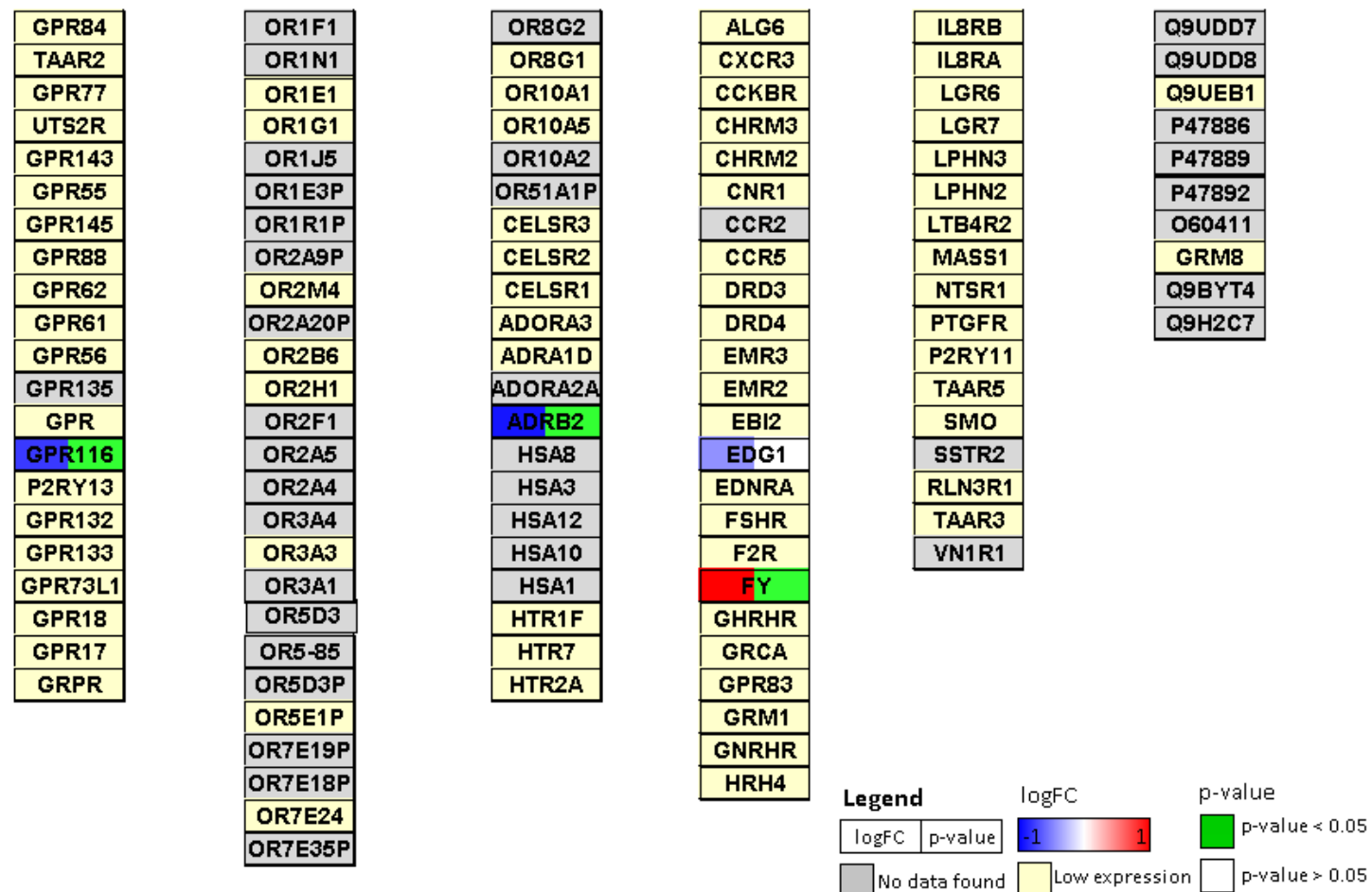


Figure S3 – GPCRs, other pathway from WikiPathways. Genes differentially expressed in adipose tissue dataset visualized in the pathway. (<http://www.wikipathways.org/instance/WP117>)

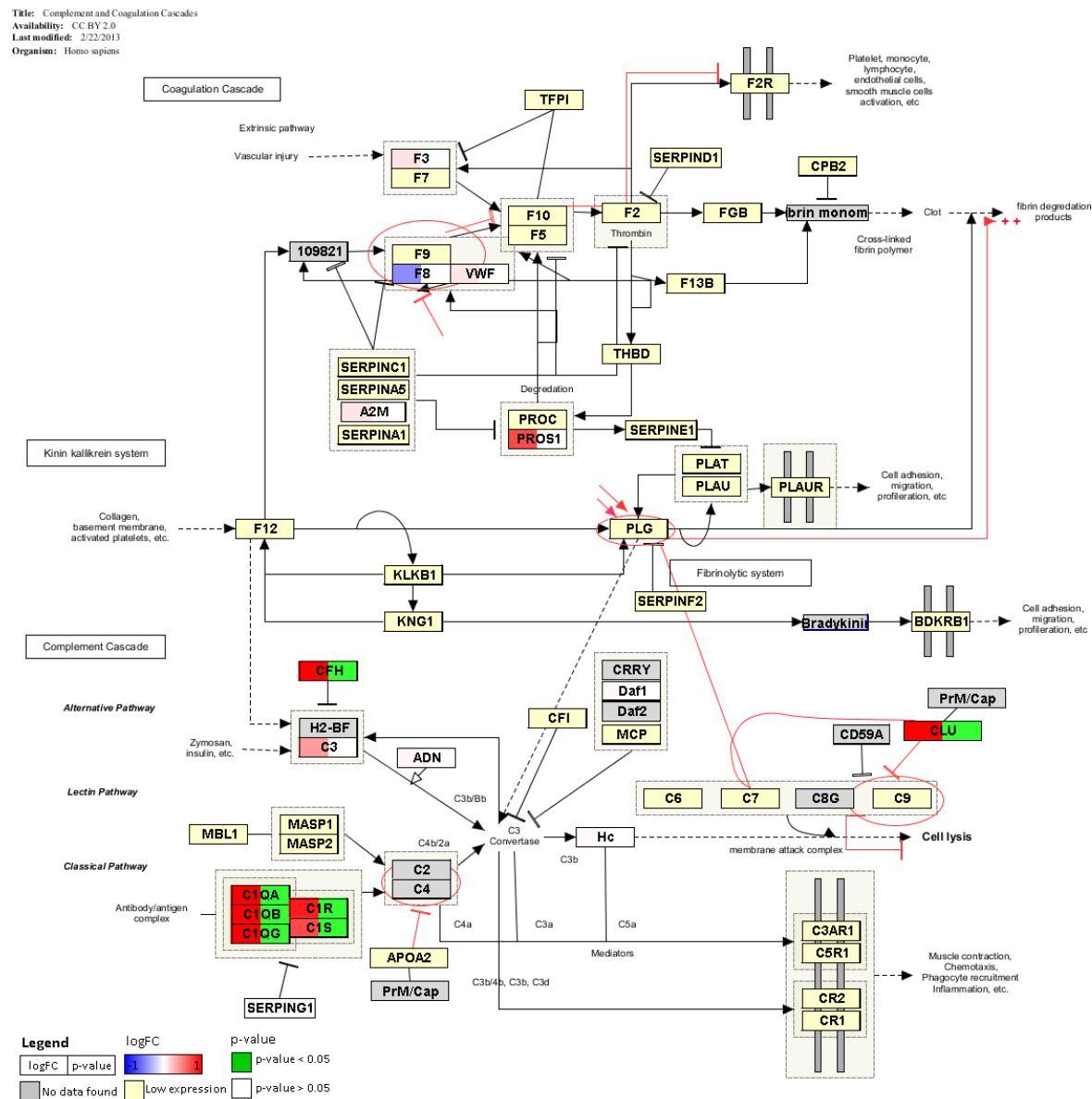


Figure S4 – Complement and coagulation cascades pathway from WikiPathways. Genes differentially expressed in adipose tissue dataset visualized in the pathway. (<http://www.wikipathways.org/instance/WP558>)

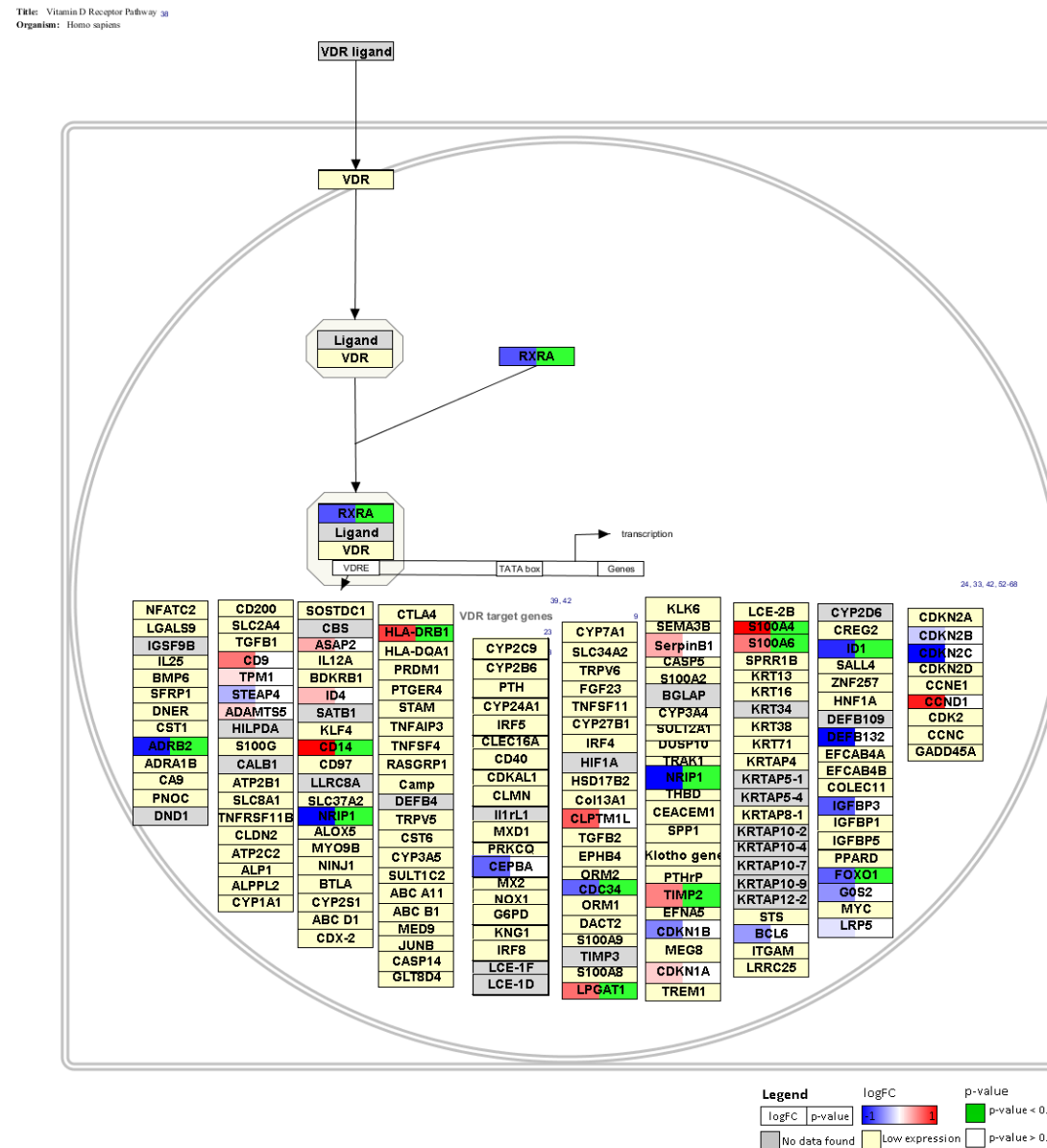
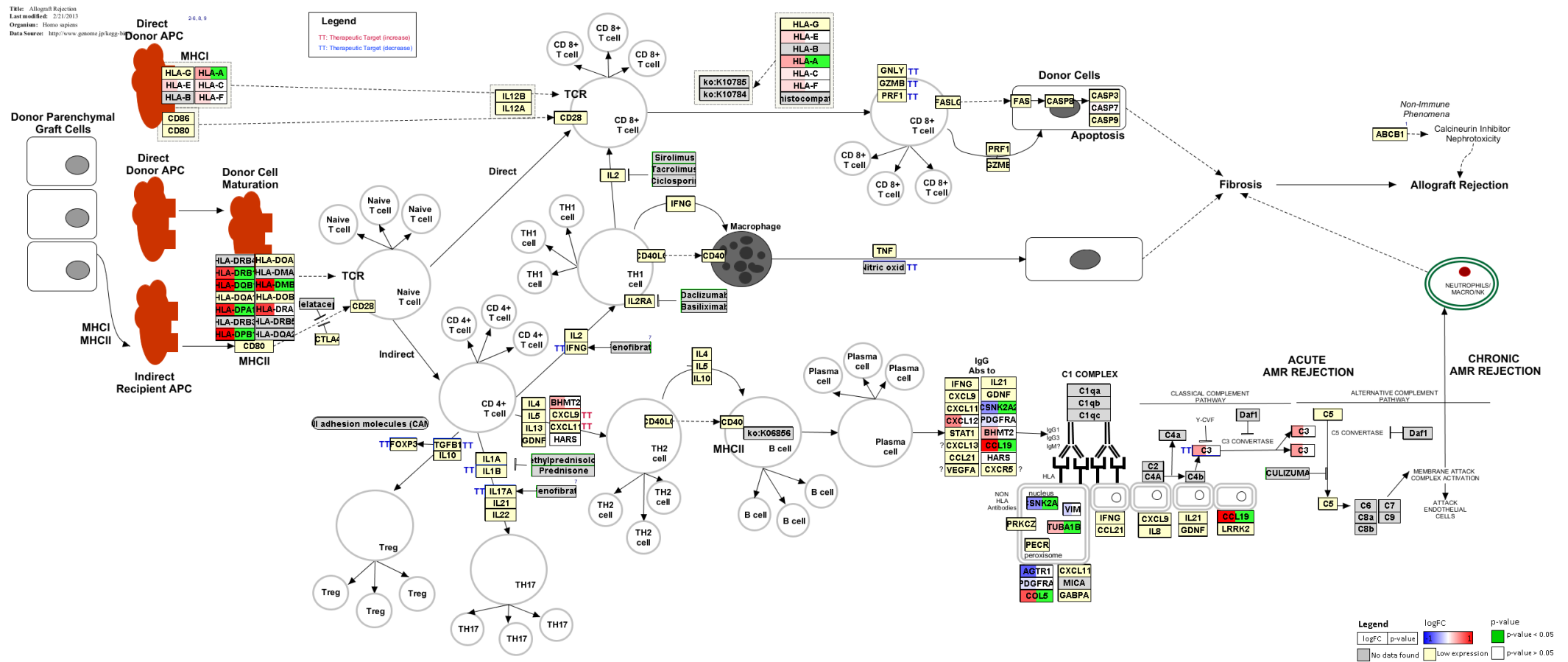


Figure S5 – Vitamin D receptor pathway from WikiPathways. Genes differentially expressed in adipose tissue dataset visualized in the pathway. (<http://www.wikipathways.org/instance/WP2877>)



Title: miRNA targets in ECM and membrane receptors
Organism: Homo sapiens

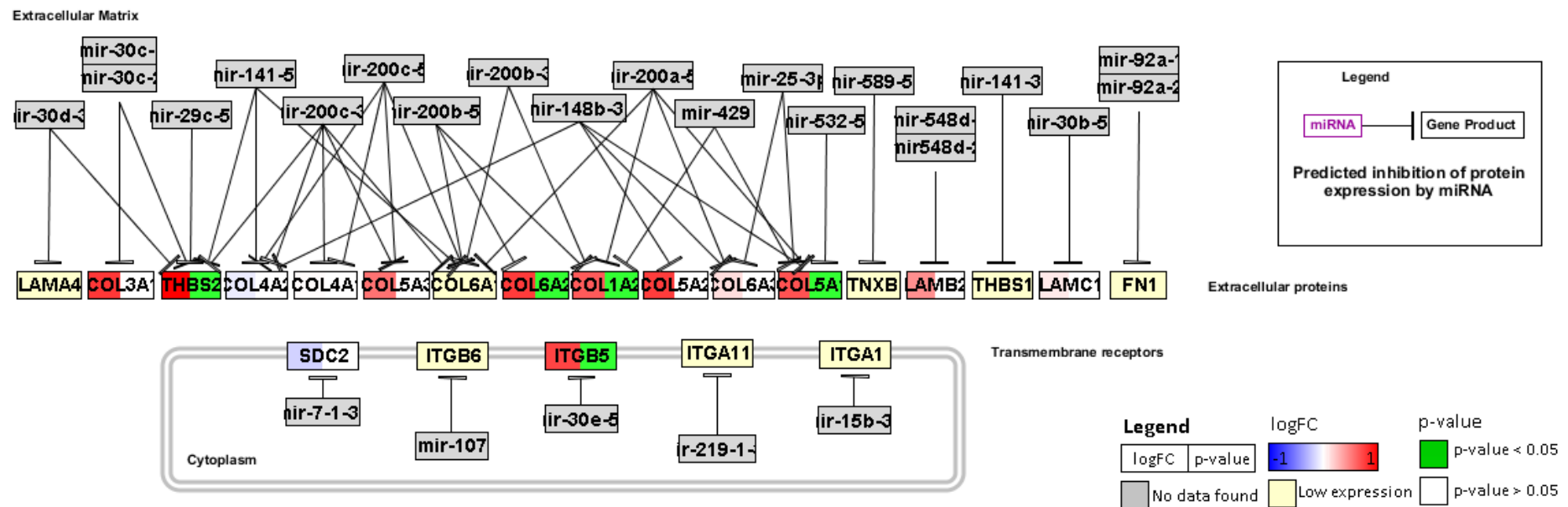


Figure S7 – miRNA targets in ECM and membrane receptors pathway from WikiPathways. Genes differentially expressed in adipose tissue dataset visualized in the pathway. (<http://www.wikipathways.org/instance/WP2911>)

Figure S8 – Fatty acids biosynthesis pathway from WikiPathways. Genes differentially expressed in adipose tissue dataset visualized in the pathway. (<http://www.wikipathways.org/instance/WP357>)

Title: Adipogenesis 1
Organism: Homo sapiens

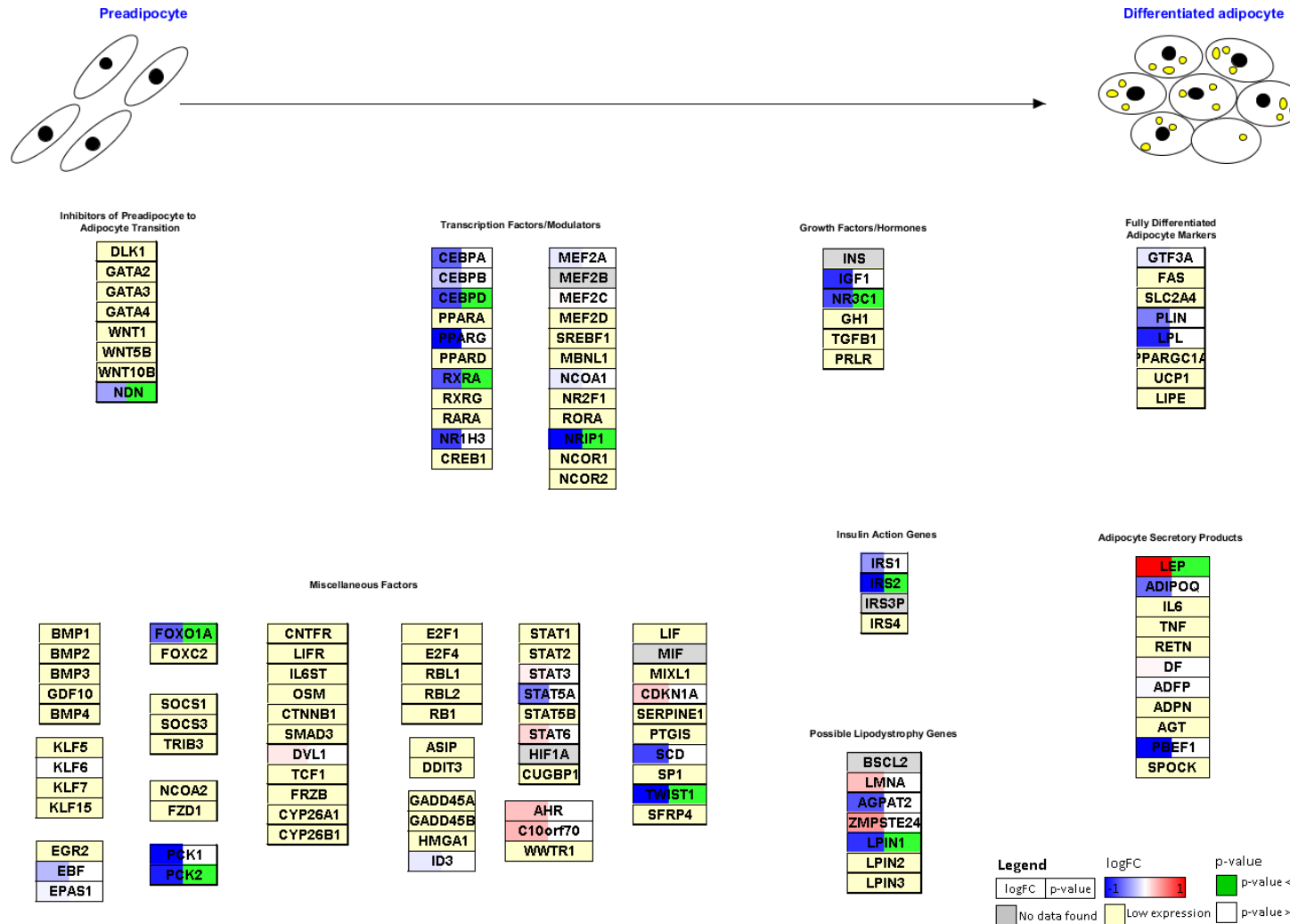


Figure S9 – Adipogenesis pathway from WikiPathways. Genes differentially expressed in adipose tissue dataset visualized in the pathway. (<http://www.wikipathways.org/instance/WP236>)

WikiPathways: Glycerolphospholipid biosynthesis

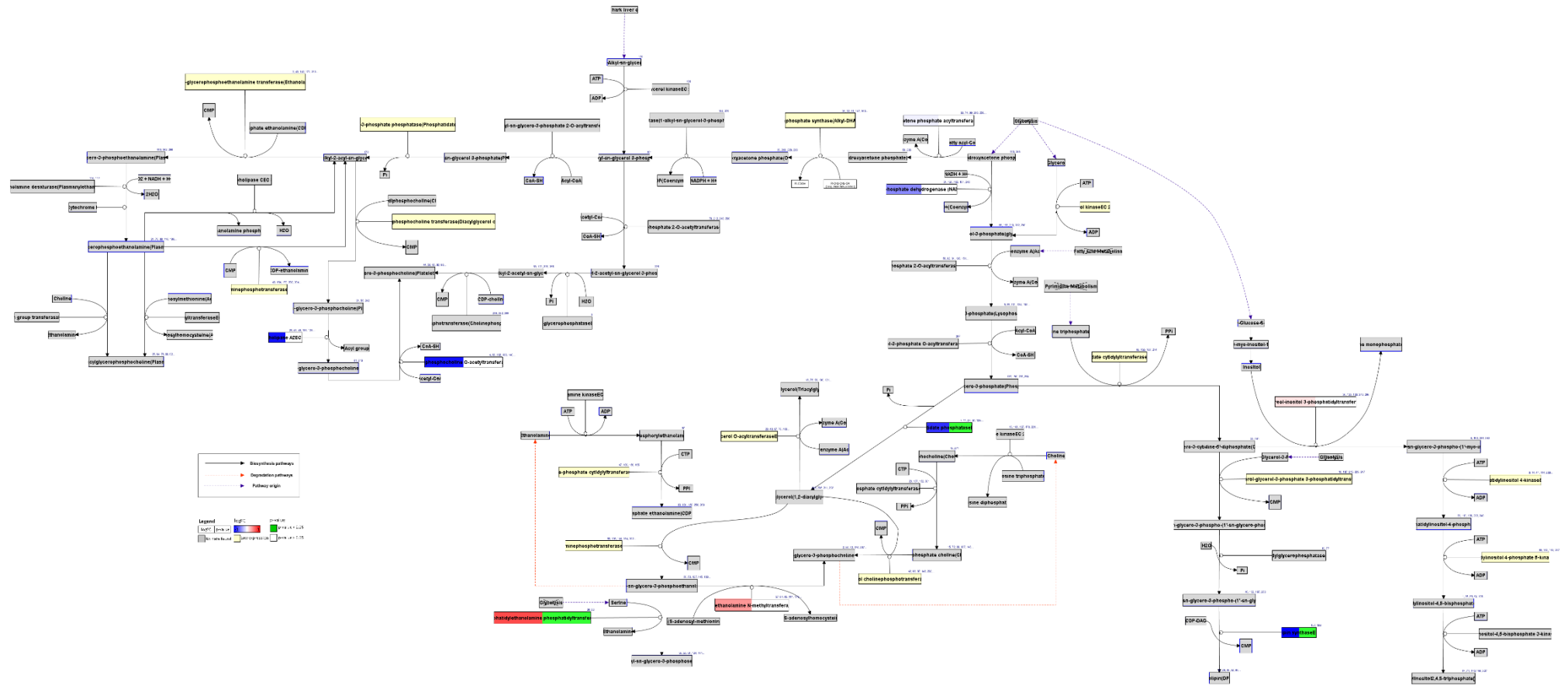


Figure S10 – Glycerolphospholipid biosynthetic pathway from WikiPathways. Genes differentially expressed in adipose tissue dataset visualized in the pathway. (<http://www.wikipathways.org/instance/WP2533>)

Capítulo II – Artigo 1

Title: GPCRs, Class A Rhodopsin-like 1, 2
Organism: Homo sapiens

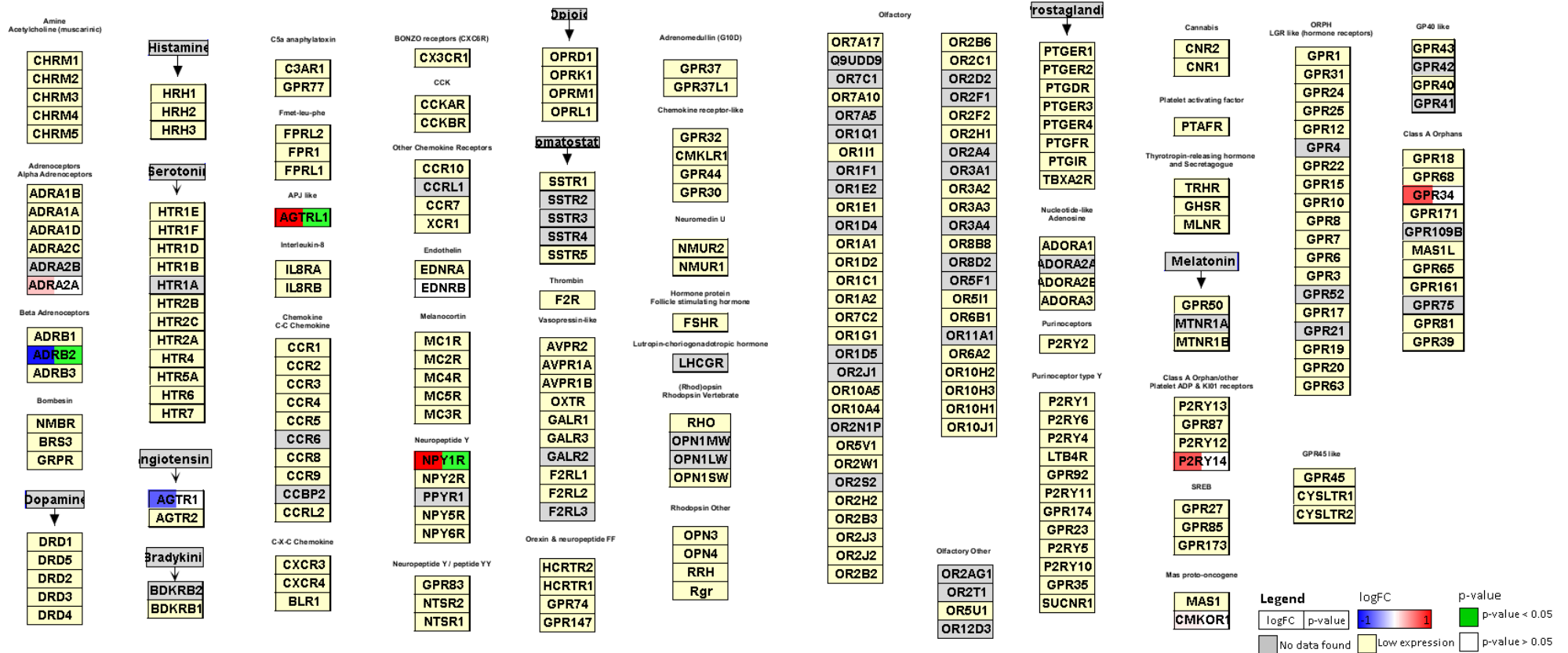


Figure S11 – GPCRs, class A rhodopsin-like pathway from WikiPathways. Genes differentially expressed in adipose tissue dataset visualized in the pathway. (<http://www.wikipathways.org/instance/WP455>)

Title: Integrated Cancer pathway
 Availability: CC BY 2.0
 Last modified: 10/16/2013
 Organism: Homo sapiens

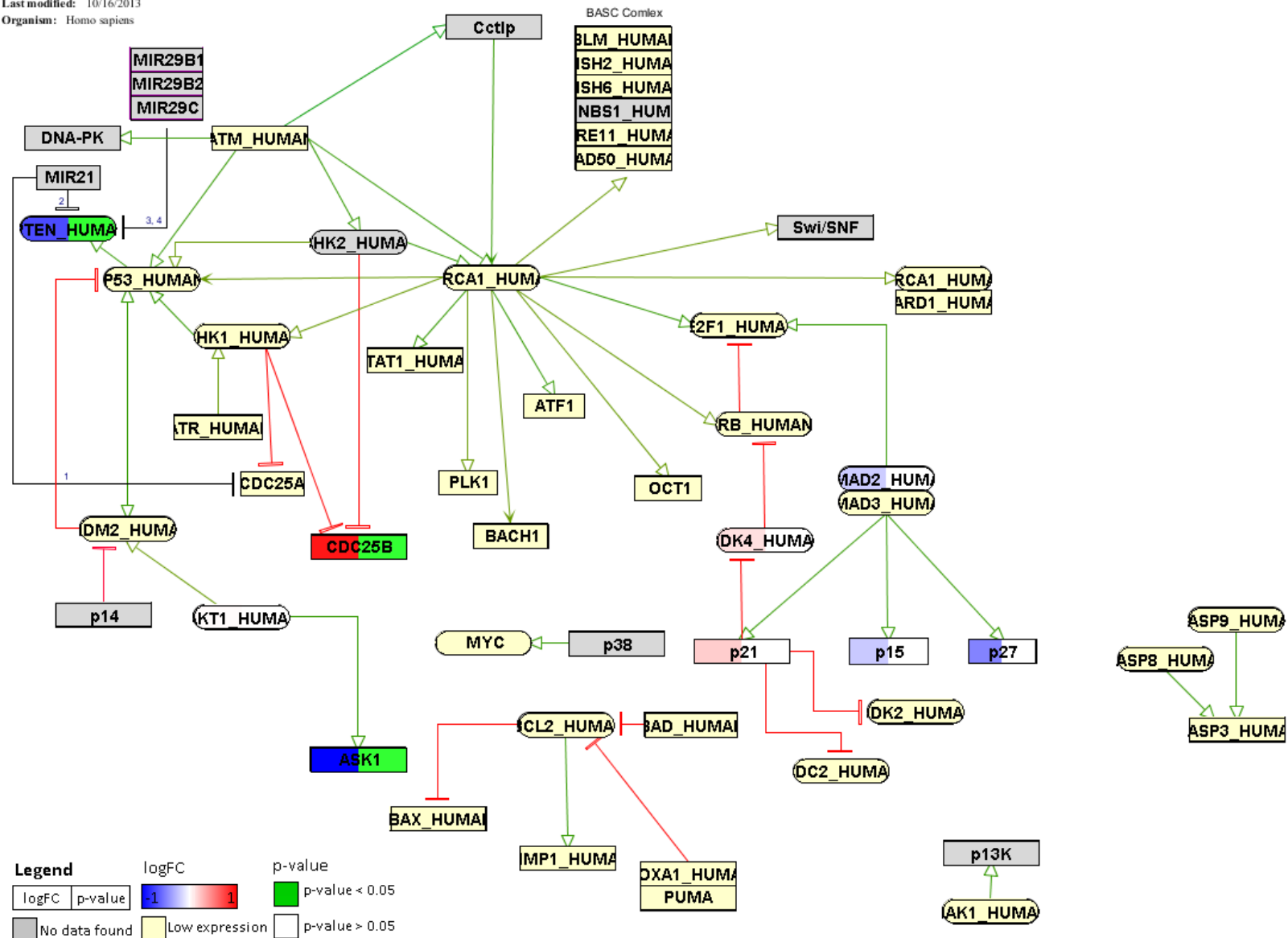


Figure S12 – Integrated cancer pathway from WikiPathways. Genes differentially expressed in adipose tissue dataset visualized in the pathway. (<http://www.wikipathways.org/instance/WP1971>)

Title: Constitutive Androstane Receptor Pathway, 20, 23
 Organism: Homo sapiens

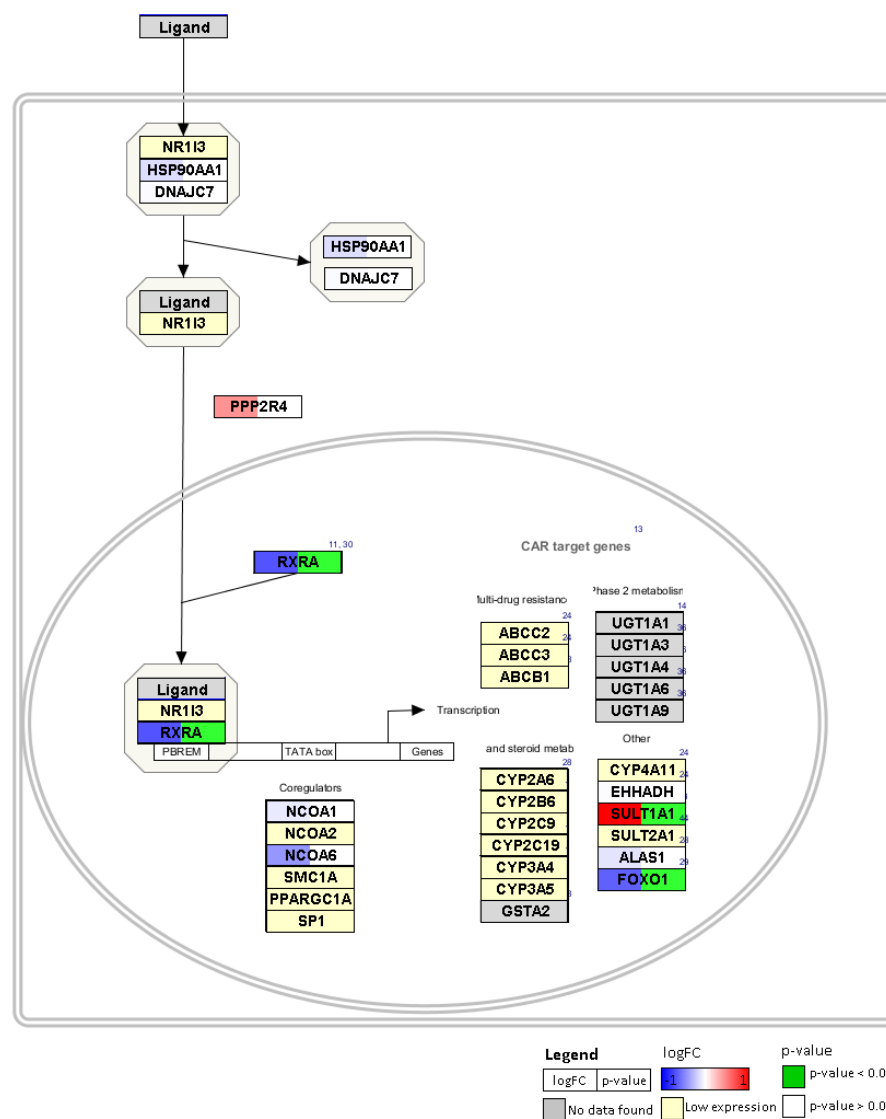


Figure S13 – Constitutive androstane receptor pathway from WikiPathways. Genes differentially expressed in adipose tissue dataset visualized in the pathway. (<http://www.wikipathways.org/instance/WP2875>)

Tables

Table S1 – Correlation data analysis of metabolic characteristics

	Age (y)		Fasting insulin (pmol/L)		Fasting glucose (mg/dL)		HbA1c (%)		BMI (Kg/m²)	
	<i>r / p-value</i>									
Age (y)	1.00	-	0.00	0.998	-0.27	0.135	0.22	0.213	-0.30	0.089
Fasting insulin (pmol/L)	0.00	0.998	1.00	-	-0.35	0.045*	0.19	0.288	0.50	0.003**
Fasting glucose (mg/dL)	-0.27	0.135	-0.35	0.045*	1.00	-	-0.06	0.755	-0.39	0.026*
HbA1c (%)	0.22	0.213	0.19	0.288	-0.06	0.754	1.00	-	-0.07	0.705
BMI (Kg/m²)	-0.30	0.089	0.50	0.003**	-0.39	0.026*	-0.07	0.705	1.00	-

The data are present as correlation coefficient (r) and p-value. Pearson correlation analysis was done to test the significance relationship between the variable. *p < 0.05 and **p < 0.01

Table S2 – Characteristics of lean and obese subjects selected for the study.

	Lean			Obese			p-value
n	5			8			
Age (y)	54.20	±	13.99	49.38	±	12.14	0.543
Fasting insulin (pmol/L)	30.80	±	13.59	115.75	±	58.83	0.004***
60 pmol/L < fasting insulin ≥ 60 pmol/L							
Fasting glucose (mg/dL)	92.16	±	4.10	128.48	±	24.05	0.003**
100 mg/dL < fasting glucose ≥ 100 mg/dL							
HbA1c (%)	5.56	±	0.27	6.16	±	0.53	0.020*
5.7% < Hb1Ac ≥ 6.5%							
BMI (Kg/m²)	21.92	±	2.93	39.33	±	5.86	2E-05***
24.99 Kg/m ² < BMI ≥ 30 Kg/m ²							

The data are present as Mean ± SD. Student's t test was done for test the significant difference between obese and lean subjects. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

Table S3 – Upregulated genes

<i>ENSG_ID</i>	<i>Gene name</i>	<i>logFC</i>	<i>p-value</i>	<i>Pathways</i>
ENSG00000174807	CD248	0.8226	0.0498	
ENSG00000164692	COL1A2	0.6469	0.0481	WP2911, WP306, WP453, WP366
ENSG00000104870	FCGRT	0.6316	0.0471	
ENSG00000151468	CCDC3	1.764	0.0463	
ENSG00000118855	MFSD1	0.588	0.0428	
ENSG00000231389	HLA-DPA1	0.9033	0.0426	WP2328
ENSG00000112874	NUDT12	0.6252	0.042	
ENSG00000101871	MID1	0.8648	0.0409	
ENSG00000179344	HLA-DQB1	1.0319	0.0408	WP2328
ENSG00000115738	ID2	0.8814	0.0389	WP53, WP2012
ENSG00000213088	FY	1.4659	0.0387	WP117, WP24
ENSG00000111679	PTPN6	0.8908	0.0374	WP2583, WP585, WP23, WP1449, WP395, WP286, WP304
ENSG00000101825	MXRA5	1.1595	0.0368	
ENSG00000157800	SLC37A3	0.6299	0.0367	
ENSG00000163520	FBLN2	0.6173	0.0366	
ENSG00000167996	FTH1	0.6249	0.0366	WP2007, WP2884
ENSG00000073969	NSF	0.6676	0.0354	WP2380, WP2267
ENSG00000074590	NUAK1	0.8404	0.0353	
ENSG00000154721	JAM2	0.6503	0.0335	
ENSG00000196139	AKR1C3	1.0313	0.0329	WP702, WP696
ENSG00000182326	C1S	0.7135	0.0324	WP545, WP558
ENSG00000065717	TLE2	1.0368	0.0323	
ENSG00000246430	LINC00968	2.2709	0.0321	
ENSG00000180573	HIST1H2AC	1.1985	0.0315	

Capítulo II – Artigo 1

ENSG00000111261	MANSC1	0.6889	0.0312	
ENSG00000002933	TMEM176A	0.7707	0.0312	
ENSG00000142173	COL6A2	0.7662	0.0303	WP2911, WP306
ENSG00000144455	SUMF1	0.6423	0.0295	
ENSG00000137267	TUBB2A	0.8334	0.0288	WP2272, WP2359
ENSG00000129116	PALLD	1.0073	0.0285	
ENSG00000174697	LEP	1.1143	0.0283	WP1403, WP2034, WP2895, WP2431
ENSG00000273033	RP11-67L2.2	0.6594	0.027	
ENSG00000130635	COL5A1	0.6764	0.0267	WP2328, WP2911, WP306
ENSG00000269728	NA	0.5848	0.026	
ENSG00000163751	CPA3	1.6339	0.025	
ENSG00000170266	GLB1	1.098	0.0237	WP2858
ENSG00000123243	ITIH5	0.8816	23W	
ENSG00000139329	LUM	0.6751	0.0234	
ENSG00000173706	HEG1	0.5834	0.0231	
ENSG00000120708	TGFBI	0.5845	0.023	
ENSG00000171159	C9orf16	0.7343	0.0224	
ENSG00000129538	RNASE1	0.8507	0.0219	
ENSG00000196126	HLA-DRB1	0.7603	0.0216	WP2877, WP2328, WP530
ENSG00000101224	CDC25B	0.9064	0.0211	WP1971, WP1984, WP179, WP382, WP2446, WP615
ENSG00000134817	AGTRL1	1.3452	0.0207	WP455
ENSG00000122679	RAMP3	1.1382	0.0203	WP289
ENSG00000183087	GAS6	0.9924	0.0198	
ENSG00000196502	SULT1A1	1.1064	0.0194	WP694, WP697, WP691, WP692, WP2875, WP716, WP702
ENSG00000206538	VGLL3	1.5571	0.0184	
ENSG00000129009	ISLR	0.8485	0.018	
ENSG00000181019	NQO1	1.5861	0.0179	WP697, WP2884, WP2436, WP408, WP3, WP2586, WP2100, WP2873, WP2864

ENSG00000110906	KCTD10	0.5911	0.0171	
ENSG00000005059	CCDC109B	0.6225	0.0169	
ENSG00000152137	HSPB8	1.2563	0.0168	
ENSG00000240583	AQP1	1.1739	0.0165	WP2431
ENSG00000149483	TMEM138	1.0332	0.0164	
ENSG00000091986	CCDC80	0.8856	0.016	
ENSG00000118292	C1orf54	1.0159	0.0158	
ENSG00000138449	SLC40A1	0.6972	0.0157	WP2007
ENSG00000185052	SLC24A3	1.5009	0.0157	
ENSG00000153395	LPCAT1	0.9931	0.0153	
ENSG00000186834	HEXIM1	0.7936	0.015	
ENSG00000143344	RGL1	0.8529	0.015	
ENSG00000242612	DECR2	0.5837	0.0144	
ENSG00000154277	UCHL1	2.1589	0.0143	WP2371, WP183
ENSG00000139508	SLC46A3	0.7748	0.0137	
ENSG00000204397	CARD16	1.0486	0.0137	
ENSG00000144136	SLC20A1	0.6101	0.0129	
ENSG00000106819	ASPN	0.9978	0.0125	
ENSG00000276023	DUSP14	0.9644	0.012	
ENSG00000101084	C20orf24	0.6724	0.0119	
ENSG00000162520	SYNC	1.5354	0.0115	
ENSG00000145423	SFRP2	2.0476	0.0113	
ENSG00000118640	VAMP8	1.1648	0.0113	
ENSG00000162511	LAPTM5	0.8666	0.0112	
ENSG00000136235	GPNMB	0.8049	0.011	
ENSG00000181649	PHLDA2	1.9661	0.0108	
ENSG00000184840	TMED9	0.6254	0.0108	

ENSG00000182578	CSF1R	1.4583	0.0107	WP2848, WP2946
ENSG00000000971	CFH	1.2333	0.0106	WP558
ENSG00000030582	GRN	0.7749	0.01	WP1984
ENSG00000110880	CORO1C	0.6943	0.0099	
ENSG00000103811	CTSH	1.9262	0.0098	
ENSG00000168701	TMEM208	0.6566	0.0088	
ENSG00000170458	CD14	1.5349	0.0088	WP2877, WP2272, WP1449, WP75, WP382, WP51
ENSG00000172724	CCL19	1.2847	0.0088	WP2328
ENSG00000166033	HTRA1	1.0165	0.0084	
ENSG00000159674	SPON2	0.9787	0.0074	
ENSG00000042493	CAPG	1.0849	0.0073	
ENSG00000197165	SULT1A2	1.5137	0.007	WP694, WP692, WP702
ENSG00000013364	MVP	1.0135	0.0068	
ENSG00000110324	IL10RA	1.3782	0.0066	
ENSG00000129038	LOXL1	0.8141	0.0064	
ENSG00000100600	LGMN	1.3405	0.0062	
ENSG00000100979	PLTP	1.0775	0.0056	WP2878, WP430
ENSG00000272761	NA	0.9716	0.0056	
ENSG00000173372	C1QA	1.9594	0.0052	WP545, WP558
ENSG00000173267	SNCG	1.7679	0.005	
ENSG00000142686	C1orf216	0.7373	0.0049	
ENSG00000124491	F13A1	1.7751	0.0045	
ENSG00000180353	HCLS1	1.2566	0.0044	WP2272, WP23
ENSG00000165457	FOLR2	1.4635	0.0043	WP176
ENSG00000235505	RP11-693N9.2	0.9294	0.0041	
ENSG00000120885	CLU	1.0283	0.004	WP558
ENSG00000197629	MPEG1	1.7734	0.004	WP179

Capítulo II – Artigo 1

ENSG00000181458	TMEM45A	0.8847	0.0037	
ENSG00000130429	ARPC1B	0.8258	0.0035	WP2272
ENSG00000067225	PKM	0.8578	0.0035	WP534
ENSG00000176788	BASP1	0.7315	0.0029	
ENSG00000159403	C1R	0.8923	0.0028	WP545, WP558
ENSG00000121064	SCPEP1	1.0227	0.0028	
ENSG00000164733	CTSB	0.8349	0.0025	
ENSG00000082781	ITGB5	0.7324	0.0024	WP2911, WP306, WP2118, WP185
ENSG00000158869	FCER1G	1.9048	0.0024	
ENSG00000102265	TIMP1	1.5563	0.0023	WP129, WP2865, WP364
ENSG00000156471	PTDSS1	0.7031	0.0023	WP2533
ENSG00000173369	C1QB	2.2126	0.0022	WP545, WP558, WP2431
ENSG00000204136	GGTA1P	1.3431	0.0022	
ENSG00000090382	LYZ	1.4265	0.002	
ENSG00000177363	LRRN4CL	0.9874	0.0015	
ENSG00000148468	FAM171A1	1.0006	0.0015	
ENSG00000117410	ATP6V0B	1.0605	0.0015	
ENSG00000115380	EFEMP1	1.0468	0.0015	
ENSG00000119681	LTBP2	2.0145	0.0014	
ENSG00000179163	FUCA1	1.22	0.0013	
ENSG00000186340	THBS2	1.2701	0.0012	WP2911, WP306
ENSG00000260314	MRC1	1.8806	0.0012	
ENSG00000189129	PLAC9	1.2818	0.001	
ENSG00000164128	NPY1R	1.4675	0.001	WP24, WP455, WP2197
ENSG00000184060	ADAP2	1.4439	0.0008	
ENSG00000159189	C1QG	1.8043	0.0007	WP545, WP558
ENSG00000119655	NPC2	0.7704	0.0007	

Capítulo II – Artigo 1

ENSG00000242574	HLA-DMB	1.1358	0.0006	WP2328
ENSG00000154589	LY96	1.145	0.0006	WP2272, WP1449, WP75
ENSG00000198759	EGFL6	5.5782	0.0006	
ENSG00000133321	RARRES3	0.9684	0.0005	
ENSG00000155659	VSIG4	2.2766	0.0004	
ENSG00000196154	S100A4	1.0437	0.0004	WP2877
ENSG00000064205	WISP2	1.9547	0.0004	
ENSG00000111341	MGP	1.1557	0.0004	WP474
ENSG00000011600	TYROBP	2.1594	0.0004	
ENSG00000110852	CLEC2B	0.7014	0.0002	
ENSG00000164932	CTHRC1	2.6684	0.0002	
ENSG00000103187	COTL1	1.4285	0.0002	
ENSG00000204472	AIF1	1.8106	0.0002	WP2431
ENSG00000223865	HLA-DPB1	2.0608	0.0001	WP2328
ENSG00000132357	CARD6	0.7339	0.0001	WP1433
ENSG00000148908	RGS10	1.5962	0	WP536, WP289

The genes are ranked by p-value

Table S4 – Downregulated genes

<i>ENSG_ID</i>	<i>Gene name</i>	<i>logFC</i>	<i>p-value</i>	<i>Pathways</i>
ENSG00000118596	SLC16A7	-1.0991	0.0495	
ENSG00000099804	CDC34	-0.6062	0.0494	WP2877
ENSG00000184601	C14orf180	-1.2367	0.0491	
ENSG00000205765	C5orf51	-0.734	0.0488	
ENSG00000133317	LGALS12	-1.1325	0.0486	
ENSG00000102287	GABRE	-1.2193	0.0479	
ENSG00000125968	ID1	-0.8418	0.0471	WP2877, WP53, WP2064
ENSG00000137944	CCBL2	-0.6435	0.047	
ENSG00000186205	MARCH1	-1.16	0.0458	
ENSG00000162496	DHRS3	-0.6144	0.0456	WP716
ENSG00000092607	TBX15	-0.581	0.0448	
ENSG00000148737	TCF7L2	-0.6472	0.044	WP2118, WP710, WP363, WP399
ENSG00000215105	TTC3P1	-0.8796	0.0439	
ENSG00000094963	FMO2	-0.8704	0.0429	WP688, WP702
ENSG00000175567	UCP2	-0.684	0.0425	WP111
ENSG00000211445	GPX3	-1.158	0.0424	WP176, WP702, WP2884, WP408, WP100, WP15, WP28
ENSG00000221869	CEBPD	-0.7171	0.0421	WP236, WP2112
ENSG00000167434	CA4	-1.0506	0.0419	
ENSG00000198786	MT-ND5	-0.6552	0.0418	WP623, WP111
ENSG00000063587	ZNF275	-0.7344	0.0415	
ENSG00000235387	LINC00961	-0.6516	0.0398	
ENSG00000128309	MPST	-0.7571	0.0397	WP2333
ENSG00000099875	MKNK2	-0.5938	0.0393	WP2637
ENSG00000224958	PGM5-AS1	-1.4806	0.0382	

Capítulo II – Artigo 1

ENSG00000147601	TERF1	-0.5937	0.0377	
ENSG00000176171	BNIP3	-0.8252	0.0374	WP1772
ENSG00000189067	LITAF	-0.5976	0.0361	
ENSG00000163637	PRICKLE2	-0.7121	0.0361	
ENSG00000175183	CSRP2	-0.9593	0.0359	
ENSG00000100075	SLC25A1	-0.9673	0.0354	
ENSG00000112964	GHR	-0.7937	0.0354	WP474
ENSG00000155906	RMND1	-0.7024	0.0349	
ENSG00000006625	GGCT	-0.9861	0.0349	
ENSG00000009950	MLXIPL	-0.8054	0.0345	
ENSG00000131016	AKAP12	-0.7623	0.0345	WP35
ENSG00000106537	TSPAN13	-0.6577	0.0344	
ENSG00000107372	ZFAND5	-1.1014	0.034	
ENSG00000182118	FAM89A	-1.2827	0.0336	
ENSG00000162407	PPAP2B	-0.9831	0.0326	WP325
ENSG00000108551	RASD1	-0.9697	0.0308	
ENSG00000128052	KDR	-0.8767	0.0287	WP1539, WP2406, WP306
ENSG00000117791	MARCH2	-0.7798	0.0286	
ENSG00000255717	SNHG1	-0.5889	0.0283	
ENSG00000092621	PHGDH	-1.2548	0.0278	WP2525
ENSG00000104765	BNIP3L	-0.9089	0.0273	WP254
ENSG00000138593	SECISBP2L	-0.6181	0.0268	
ENSG00000116954	RRAGC	-0.7325	0.0263	WP1471
ENSG00000124383	MPHOSPH10	-0.6507	0.0259	
ENSG00000100889	PCK2	-0.8917	0.0248	WP236, WP710
ENSG00000106853	PTGR1	-0.8258	0.0248	WP2884
ENSG00000172270	BSG	-0.8314	0.0248	WP129

Capítulo II – Artigo 1

ENSG00000154153	FAM134B	-0.5925	0.0239	
ENSG00000102738	MRPS31	-0.6232	0.0236	
ENSG00000113580	NR3C1	-0.7209	0.0235	WP236, WP170, WP734, WP2853, WP706
ENSG00000116350	SRSF4	-0.6579	0.0233	WP411
ENSG00000131831	RAI2	-0.8663	0.0224	
ENSG00000189058	APOD	-0.6613	0.0218	
ENSG00000166473	PKD1L2	-1.2432	0.0218	
ENSG00000166347	CYB5A	-1.1811	0.0215	WP450
ENSG00000177666	PNPLA2	-0.6776	0.0208	WP143, WP325
ENSG00000134072	CAMK1	-0.6072	0.0204	WP2380, WP536
ENSG00000103335	PIEZO1	-0.8579	0.0203	
ENSG00000174307	PHLDA3	-0.7186	0.0203	
ENSG00000149809	TM7SF2	-1.133	0.0199	
ENSG00000150907	FOXO1	-0.6201	0.0197	WP2877, WP236, WP2875, WP2035, WP1984, WP2034, WP673, WP23, WP3303, WP481, WP3286, WP2261, WP437, WP138, WP2324
ENSG00000153207	AHCTF1	-0.7516	0.0194	WP2363
ENSG00000149485	FADS1	-1.6672	0.0192	
ENSG00000112559	MDFI	-1.211	0.0186	
ENSG00000146085	MUT	-0.5992	0.0173	WP1533
ENSG00000179241	LDLRAD3	-0.7422	0.0173	
ENSG00000100077	ADRBK2	-1.0859	0.017	WP2355
ENSG00000141428	C18orf21	-0.7293	0.0169	
ENSG00000163597	SNHG16	-0.7716	0.0169	
ENSG00000260260	SNHG19	-0.7027	0.0167	
ENSG00000073712	FERMT2	-0.6651	0.0165	
ENSG00000164167	LSM6	-0.9769	0.0165	
ENSG00000119986	AVPI1	-0.7397	0.016	

Capítulo II – Artigo 1

ENSG00000169418	NPR1	-0.6569	0.0148	
ENSG00000164104	HMGB2	-0.8978	0.0142	WP2946, WP2446, WP2858
ENSG00000132471	WBP2	-0.5866	0.014	
ENSG00000165507	C10orf10	-1.1338	0.0138	
ENSG00000186350	RXRA	-0.6725	0.0122	WP2879, WP2877, WP1531, WP236, WP2875, WP716, WP2884, WP170, WP2874, WP2878, WP2377
ENSG00000111077	TNS2	-0.8114	0.0119	
ENSG00000081760	AACS	-1.5225	0.0118	
ENSG00000005810	MYCBP2	-0.6466	0.0113	WP1984
ENSG00000050426	LETMD1	-0.6505	0.0108	
ENSG00000117479	SLC19A2	-1.69	0.0104	
ENSG00000111058	ACSS3	-1.1056	0.0104	
ENSG00000131069	ACSS2	-0.9911	0.0103	WP357, WP521, WP143
ENSG00000135390	ATP5G2	-0.6868	0.0097	WP623, WP111
ENSG00000088766	CRLS1	-0.9998	0.0095	WP2533
ENSG00000173276	ZBTB21	-0.7983	0.0092	
ENSG00000117592	PRDX6	-0.6183	0.0088	WP2884
ENSG00000123612	ACVR1C	-1.9351	0.0086	WP382
ENSG00000076555	ACACB	-0.7896	0.0083	WP357, WP1403, WP2034, WP2380
ENSG00000265972	TXNIP	-0.8315	0.0081	
ENSG00000250479	CHCHD10	-0.7323	0.0079	
ENSG00000167969	ECI1	-0.6782	0.0078	WP143, WP368
ENSG00000100814	CCNB1IP1	-0.9488	0.0075	WP1984
ENSG00000169252	ADRB2	-0.9151	0.0074	WP117, WP2877, WP455, WP58, WP536
ENSG00000244734	HBB	-1.0033	0.0072	WP176, WP1533, WP15
ENSG00000196616	ADH1B	-1.1223	0.0068	WP206
ENSG00000134463	ECHDC3	-1.6402	0.0063	WP357

ENSG00000131771	PPP1R1B	-2.0589	0.0062	WP1602
ENSG00000119711	ALDH6A1	-0.9693	0.0061	
ENSG00000165810	BTNL9	-0.7756	0.0061	
ENSG00000078399	HOXA9	-0.5828	0.0058	
ENSG00000165113	GKAP1	-0.7419	0.0054	
ENSG00000180530	NRIP1	-1.8594	0.0053	WP2877, WP236, WP34, WP2586
ENSG00000164849	GPR146	-0.7814	0.0052	
ENSG00000109929	SC5D	-1.7496	0.005	WP197
ENSG00000123636	BAZ2B	-0.646	0.0049	
ENSG00000119801	YPEL5	-0.7539	0.0048	
ENSG00000176194	CIDEA	-2.2534	0.0046	WP2875
ENSG00000170145	SIK2	-0.9998	0.0046	
ENSG00000176720	BOK	-1.2676	0.0045	WP1742, WP254, WP1772
ENSG00000256235	SMIM3	-1.0746	0.0045	
ENSG00000160862	AZGP1	-2.2053	0.0043	
ENSG00000154359	LONRF1	-1.4289	0.0038	
ENSG00000053438	NNAT	-1.8523	0.0034	
ENSG00000122691	TWIST1	-1.3377	0.0034	WP236, WP2064, WP437
ENSG00000069122	GPR116	-0.7737	0.0026	WP117
ENSG00000185950	IRS2	-1.3015	0.0026	WP2879, WP236, WP585, WP2380, WP244, WP481, WP395, WP581
ENSG00000151474	FRMD4A	-0.5828	0.0025	
ENSG00000116273	PHF13	-1.1825	0.0024	
ENSG00000100281	HMGXB4	-0.7545	0.0021	
ENSG00000134324	LPIN1	-0.8101	0.002	WP236, WP2533, WP1982
ENSG00000121210	KIAA0922	-1.4816	0.002	
ENSG00000170525	PFK2	-1.0762	0.0016	WP1403
ENSG00000121310	ECHDC2	-0.9135	0.0014	WP357

Capítulo II – Artigo 1

ENSG00000187840	EIF4EBP1	-1.0484	0.0013	WP1403, WP2035, WP585, WP516, WP2034, WP1471, WP2380, WP673, WP244, WP3303, WP481, WP107, WP437
ENSG00000152642	GPD1L	-1.505	0.0013	WP706
ENSG00000138796	HADHSC	-1.2282	0.001	WP357, WP143, WP368, WP465, WP2203
ENSG00000124615	MOCS1	-1.3128	0.0009	
ENSG00000100417	PMM1	-1.0107	0.0009	
ENSG00000171862	PTEN	-0.7038	0.0009	WP1971, WP2583, WP1984, WP2034, WP306, WP481, WP313, WP3286, WP710, WP2038, WP2261, WP437, WP2377, WP138, WP615
ENSG00000148730	EIF4EBP2	-0.6565	0.0007	WP107
ENSG00000181234	TMEM132C	-1.3695	0.0004	
ENSG00000164879	CA3	-3.9654	0.0001	
ENSG00000185100	ADSSL1	-1.6902	0.0001	
ENSG00000135821	GLUL	-1.3955	0.0001	WP231
ENSG00000197442	MAP3K5	-1.3807	0.0001	WP1971, WP400, WP481, WP1772, WP2447, WP382, WP2355, WP231, WP2377
ENSG00000166123	GPT2	-1.5813	0.0001	

The genes are ranked by p-value

Table S5 – GO-Elite analysis for genes differentially expressed in obese subcutaneous adipose tissue.

<i>Ontology ID</i>	<i>Ontology name</i>	<i>Ontology type</i>	<i>Percent changed</i>	<i>Z-score</i>	<i>p-value</i>
GO:0002504	antigen processing and presentation of peptide or polysaccharide antigen via MHC class II	Biological process	85.71	7.6113	0.0000
GO:0051047	positive regulation of secretion	Biological process	41.38	6.6812	0.0000
GO:0006956	complement activation	Biological process	58.33	6.4613	0.0000
GO:0042517	positive regulation of tyrosine phosphorylation of Stat3 protein	Biological process	100	5.8947	0.0005
GO:0009749	response to glucose stimulus	Biological process	35.71	5.4516	0.0000
GO:0006629	lipid metabolic process	Biological process	16.08	4.9861	0.0000
GO:0050996	positive regulation of lipid catabolic process	Biological process	75	4.9587	0.0010
GO:0046689	response to mercury ion	Biological process	75	4.9587	0.0020
GO:0070301	cellular response to hydrogen peroxide	Biological process	42.86	4.8366	0.0005
GO:0018108	peptidyl-tyrosine phosphorylation	Biological process	42.86	4.8366	0.0010
GO:0015711	organic anion transport	Biological process	57.14	4.8148	0.0015
GO:0006775	fat-soluble vitamin metabolic process	Biological process	57.14	4.8148	0.0005
GO:0009725	response to hormone stimulus	Biological process	16.58	4.561	0.0000
GO:0032760	positive regulation of tumor necrosis factor production	Biological process	50	4.4004	0.0020
GO:0007565	female pregnancy	Biological process	50	4.4004	0.0015
GO:0006952	defense response	Biological process	17.91	4.3466	0.0000
GO:0008284	positive regulation of cell proliferation	Biological process	17.6	4.0617	0.0005
GO:0002768	immune response-regulating cell surface receptor signaling pathway	Biological process	33.33	3.9902	0.0015
GO:0009888	tissue development	Biological process	18.27	3.9492	0.0000
GO:0046824	positive regulation of nucleocytoplasmic transport	Biological process	35.71	3.8469	0.0025
GO:0033189	response to vitamin A	Biological process	35.71	3.8469	0.0040

Capítulo II – Artigo 1

GO:0006111	regulation of gluconeogenesis	Biological process	50	3.8098	0.0070
GO:0009653	anatomical structure morphogenesis	Biological process	14.23	3.7766	0.0005
GO:0001944	vasculature development	Biological process	40	3.7509	0.0020
GO:0045765	regulation of angiogenesis	Biological process	25.81	3.6907	0.0020
GO:0031294	lymphocyte costimulation	Biological process	33.33	3.6409	0.0050
GO:0043408	regulation of MAPKKK cascade	Biological process	20	3.6245	0.0030
GO:0001933	negative regulation of protein phosphorylation	Biological process	28.57	3.5029	0.0050
GO:0048513	organ development	Biological process	14.15	3.4446	0.0005
GO:0071456	cellular response to hypoxia	Biological process	42.86	3.4165	0.0175
GO:0060397	JAK-STAT cascade involved in growth hormone signaling pathway	Biological process	42.86	3.4165	0.0095
GO:0048871	multicellular organismal homeostasis	Biological process	42.86	3.4165	0.0140
GO:0034311	diol metabolic process	Biological process	42.86	3.4165	0.0155
GO:0003014	renal system process	Biological process	42.86	3.4165	0.0115
GO:0090101	negative regulation of transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signaling pathway	Biological process	27.27	3.36	0.0050
GO:0008217	regulation of blood pressure	Biological process	25	3.3477	0.0035
GO:0090316	positive regulation of intracellular protein transport	Biological process	29.41	3.2782	0.0065
GO:0030199	collagen fibril organization	Biological process	33.33	3.2551	0.0110
GO:0010811	positive regulation of cell-substrate adhesion	Biological process	33.33	3.2551	0.0150
GO:0050900	leukocyte migration	Biological process	24.14	3.2351	0.0065
GO:0030178	negative regulation of Wnt receptor signaling pathway	Biological process	26.09	3.2251	0.0055
GO:0007186	G-protein coupled receptor protein signaling pathway	Biological process	18.75	3.2229	0.0065
GO:0008629	induction of apoptosis by intracellular signals	Biological process	23.33	3.1273	0.0090
GO:0071346	cellular response to interferon-gamma	Biological process	27.78	3.1168	0.0100

GO:0045931	positive regulation of mitotic cell cycle	Biological process	37.5	3.0923	0.0235
GO:0044236	multicellular organismal metabolic process	Biological process	37.5	3.0923	0.0185
GO:0031623	receptor internalization	Biological process	37.5	3.0923	0.0170
GO:0002449	lymphocyte mediated immunity	Biological process	37.5	3.0923	0.0220
GO:0051896	regulation of protein kinase B signaling cascade	Biological process	30.77	3.0462	0.0175
GO:0046888	negative regulation of hormone secretion	Biological process	30.77	3.0462	0.0200
GO:0019637	organophosphate metabolic process	Biological process	18.03	2.9362	0.0085
GO:0032787	monocarboxylic acid metabolic process	Biological process	15.69	2.931	0.0090
GO:0006805	xenobiotic metabolic process	Biological process	21.88	2.9245	0.0100
GO:0031331	positive regulation of cellular catabolic process	Biological process	23.08	2.8611	0.0175
GO:0019748	secondary metabolic process	Biological process	28.57	2.8571	0.0150
GO:0051101	regulation of DNA binding	Biological process	25	2.8259	0.0170
GO:2000106	regulation of leukocyte apoptosis	Biological process	33.33	2.8178	0.0270
GO:0048639	positive regulation of developmental growth	Biological process	33.33	2.8178	0.0290
GO:0045923	positive regulation of fatty acid metabolic process	Biological process	33.33	2.8178	0.0310
GO:0045668	negative regulation of osteoblast differentiation	Biological process	33.33	2.8178	0.0260
GO:0014066	regulation of phosphatidylinositol 3-kinase cascade	Biological process	33.33	2.8178	0.0260
GO:0006103	2-oxoglutarate metabolic process	Biological process	33.33	2.8178	0.0330
GO:0032844	regulation of homeostatic process	Biological process	18.75	2.7845	0.0150
GO:0060548	negative regulation of cell death	Biological process	13.75	2.7764	0.0100
GO:0003006	developmental process involved in reproduction	Biological process	17.86	2.7622	0.0120
GO:0031668	cellular response to extracellular stimulus	Biological process	22.22	2.7513	0.0155
GO:0009611	response to wounding	Biological process	15.73	2.7481	0.0105
GO:0048469	cell maturation	Biological process	23.81	2.6939	0.0270
GO:0070167	regulation of biomineral tissue development	Biological process	26.67	2.6846	0.0295
GO:0040014	regulation of multicellular organism growth	Biological process	26.67	2.6846	0.0250

Capítulo II – Artigo 1

GO:0002819	regulation of adaptive immune response	Biological process	26.67	2.6846	0.0230
GO:0051250	negative regulation of lymphocyte activation	Biological process	30	2.5805	0.0390
GO:0045913	positive regulation of carbohydrate metabolic process	Biological process	30	2.5805	0.0365
GO:0035335	peptidyl-tyrosine dephosphorylation	Biological process	30	2.5805	0.0430
GO:0010876	lipid localization	Biological process	30	2.5805	0.0340
GO:0007631	feeding behavior	Biological process	30	2.5805	0.0290
GO:0002792	negative regulation of peptide secretion	Biological process	30	2.5805	0.0470
GO:0071241	cellular response to inorganic substance	Biological process	22.73	2.5695	0.0265
GO:0048015	phosphatidylinositol-mediated signaling	Biological process	22.73	2.5695	0.0255
GO:0046942	carboxylic acid transport	Biological process	20.69	2.5459	0.0245
GO:0001568	blood vessel development	Biological process	21.74	2.4519	0.0340
GO:0007600	sensory perception	Biological process	18.42	2.3985	0.0290
GO:0060070	canonical Wnt receptor signaling pathway	Biological process	27.27	2.372	0.0480
GO:0000737	DNA catabolic process, endonucleolytic	Biological process	27.27	2.372	0.0495
GO:0055085	transmembrane transport	Biological process	13.89	2.3172	0.0325
GO:0014070	response to organic cyclic compound	Biological process	17.02	2.3139	0.0220
GO:0051707	response to other organism	Biological process	16.07	2.2642	0.0335
GO:0015672	monovalent inorganic cation transport	Biological process	16.67	2.2473	0.0330
GO:0045598	regulation of fat cell differentiation	Biological process	22.22	2.2434	0.0445
GO:0042445	hormone metabolic process	Biological process	22.22	2.2434	0.0455
GO:0009636	response to toxin	Biological process	20	2.2345	0.0355
GO:0019318	hexose metabolic process	Biological process	14.49	2.0286	0.0415
GO:0042613	MHC class II protein complex	Cellular component	83.33	6.8299	0.0000
GO:0005576	extracellular region	Cellular component	17.89	6.4802	0.0000
GO:0044421	extracellular region part	Cellular component	18.63	5.8117	0.0000
GO:0005740	mitochondrial envelope	Cellular component	40	3.7509	0.0055

Capítulo II – Artigo 1

GO:0042383	sarcolemma	Cellular component	28	3.7182	0.0005
GO:0031226	intrinsic to plasma membrane	Cellular component	15.86	3.5975	0.0010
GO:0043235	receptor complex	Cellular component	24.24	3.4754	0.0050
GO:0044437	vacuolar part	Cellular component	17.24	2.6371	0.0155
GO:0005764	lysosome	Cellular component	16.67	2.517	0.0150
GO:0004888	transmembrane receptor activity	Molecular function	25	5.7026	0.0000
GO:0016878	acid-thiol ligase activity	Molecular function	50	3.8098	0.0110
GO:0016505	apoptotic protease activator activity	Molecular function	50	3.8098	0.0075
GO:0004033	aldo-keto reductase (NADP) activity	Molecular function	50	3.8098	0.0045
GO:0016628	oxidoreductase activity, acting on the CH-CH group of donors, NAD or NADP as acceptor	Molecular function	40	3.7509	0.0060
GO:0016782	transferase activity, transferring sulfur-containing groups	Molecular function	42.86	3.4165	0.0105
GO:0008301	DNA bending activity	Molecular function	37.5	3.0923	0.0285
GO:0005201	extracellular matrix structural constituent	Molecular function	24	2.9764	0.0115
GO:0030170	pyridoxal phosphate binding	Molecular function	28.57	2.8571	0.0215
GO:0004252	serine-type endopeptidase activity	Molecular function	28.57	2.8571	0.0145
GO:0019838	growth factor binding	Molecular function	20	2.8327	0.0130
GO:0005178	integrin binding	Molecular function	21.21	2.8289	0.0145
GO:0046982	protein heterodimerization activity	Molecular function	16.18	2.5319	0.0160
GO:0022891	substrate-specific transmembrane transporter activity	Molecular function	14.05	2.5241	0.0150
GO:0042803	protein homodimerization activity	Molecular function	13.53	2.4269	0.0215

Table S6 – Biological processes associated with obesity, relevant disorders and metabolism.

Ontology ID	Ontology name	Genes name
<i>Cardiovascular disorders</i>		
GO:0001568	blood vessel development	↑ COL1A2,COL5A1 ↓ FOXO1,PPAP2B,TCF7L2
GO:0001944	vasculature development	↑ HEG1,SFRP2 ↓ ZFAND5,ID1
GO:0008217	regulation of blood pressure	↑ LEP,COL1A2,NPY1R,ID2 ↓ ADRB2,HBB,NPR1
GO:0003014	renal system process	↑ AQP1 ↓ ADRB2,NPR1
GO:0045765	regulation of angiogenesis	↑ AQP1,CTSH,SFRP2,THBS2 ↓ TWIST1,NPR1,ID1,KDR
<i>Obesity</i>		
GO:0007631	feeding behavior	↑ LEP,NPY1R,UCHL1
<i>Oxidative stress</i>		
GO:0070301	cellular response to hydrogen peroxide	↑ AQP1 ↓ BNIP3,GPX3,HBB,MAP3K5,PRDX6
<i>Glucose metabolism</i>		
GO:0009749	response to glucose stimulus	↑ COL6A2,CTSB ↓ AACS,ACVR1C,GLUL,IRS2,MLXIPL,NNAT,TCF7L2,UCP2
GO:0006111	regulation of gluconeogenesis	↑ LEP ↓ FOXO1,NR3C1
<i>Lipids disorders</i>		
GO:0006629	lipid metabolic	↑ AKR1C3,CLU,CSF1R,GLB1,LEP,LGMN,LPCAT1,NUAK,PLTP,PTDSS1,RARRES3,SCPEP1,SULT1A1,SULT1A2

Capítulo II – Artigo 1

	process	↓ AACS,ACACB,ACSS2,APOD,AZGP1,CIDEA,CRLS1,DHRS3,ECHDC2,ECI1,FADS1,GHR,HADH,LGMN,LPIN1,MKNK2, MUT,NR3C1,NUAK1,PNPLA2,PPAP2B,PRDX6,PTEN,PTGR1,RGL1,RXRA,SLC25A1,SULT1A2,TM7SF2
GO:0010876	lipid localization	↓ ACVR1C,CIDEA,NRIP1
GO:0019318	hexose metabolic process	↑ FUCA1,GLB1,LEP,NPY1R,PKM2 ↓ IRS2,PCK2,PFKFB3,PMM1,SLC25A1
GO:0045923	positive regulation of fatty acid metabolic process	↓ IRS2,MLXIPL,TWIST1
GO:0050996	positive regulation of lipid catabolic process	↓ IRS2,PNPLA2,TWIST1
<i>Inflammation/immune response</i>		
GO:0002449	lymphocyte mediated immunity	↑ CTSH,FCER1G,PTPN6
GO:0002819	regulation of adaptive immune response	↑ CCL19,FCER1G,HLA-DQB1,PTPN6
GO:0006952	defense response	↑ AIF1,C1QA,C1QB,C1QC,C1S,CCL19,CD14,CFH,CLU,COTL1,CSF1R,FCER1G,LY96,LYZ,PTPN6,SPON2,TYROBP,VSIG4 ↓ APOD,BNIP3,BNIP3L,MAP3K5,RXRA
GO:0031294	lymphocyte costimulation	↑ CCL19,HLA-DPA1,HLA-DPB1,HLA-DRB1,PTPN6
GO:0032760	positive regulation of tumor necrosis factor production	↑ CCL19,CD14,FCER1G ↓ TWIST1
GO:0050900	leukocyte migration	↑ CCL19,COL1A2,FCER1G,GAS6,JAM2,PTPN6 ↓ BSG

Capítulo II – Artigo 1

GO:0051250	negative regulation of lymphocyte activation	↑ ID2,PTPN6,VSIG4
GO:0071346	cellular response to interferon-gamma	↑ HLA-DPA1,HLA-DPB1,HLA-DQB1,HLA-DRB1,PTPN6
GO:2000106	regulation of leukocyte apoptosis	↑ CCL19 ↓ IRS2,PTEN
<i>Apoptosis process</i>		
GO:0008629	induction of apoptosis by intracellular signals	↑ CLU ↓ BNIP3,BOK,CIDEA,LGALS12,MAP3K5,PHLDA3
GO:0060548	negative regulation of cell death	↑ AIF1,AQP1,CCL19,CLU,CTSB,CTSH,FCER1G,FTH1,GAS6,LEP,LGMN,SFRP2,TIMP1 ↓ BNIP3,BNIP3L,CIDEA,FOXO1,IRS2,KDR,NR3C1,PTEN,TCF7L2
<i>Adipogenesis</i>		
GO:0030178	negative regulation of Wnt receptor signaling pathway	↑ CTHRC1,SFRP2,TLE2 ↓ HMGXB4,MDFI,TCF7L2
GO:0045598	regulation of fat cell differentiation	↑ ID2,SFRP2 ↓ LPIN1,TCF7L2
GO:0060070	canonical Wnt receptor signaling pathway	↓ PPAP2B,PTEN,TCF7L2
<i>Vitamin metabolism</i>		
GO:0006775	fat-soluble vitamin metabolic process	↑ LGMN,PLTP,SCPEP1 ↓ DHRS3
GO:0033189	response to vitamin A	↑ AQP1,CTSH,LEP ↓ FADS1,RXRA

Table S7 – Genes differentially expressed in pathways linked with selected genes in adipogenesis pathways.

	ENSG_ID	Gene name	logFC	p-value	
WP34	<i>Ovarian infertility genes</i>				
	ENSG00000180530	NRIP1	-1.8594	0.0053	**
WP170	<i>Nuclear receptors</i>				
	ENSG00000132170	PPARG	-1.1406	0.1439	
	ENSG00000025434	NR1H3	-0.7676	0.1741	
	ENSG00000113580	NR3C1	-0.7209	0.0235	*
	ENSG00000186350	RXRA	-0.6725	0.0122	*
WP236	<i>Adipogenesis</i>				
	ENSG00000100889	PCK2	-0.8917	0.0248	*
	ENSG00000113580	NR3C1	-0.7209	0.0235	*
	ENSG00000122691	TWIST1	-1.3377	0.0034	**
	ENSG00000134324	LPIN1	-0.8101	0.0020	**
	ENSG00000150907	FOXO1	-0.6201	0.0197	*
	ENSG00000174697	LEP	1.1143	0.0283	*
	ENSG00000180530	NRIP1	-1.8594	0.0053	**
	ENSG00000185950	IRS2	-1.3015	0.0026	**
	ENSG00000186350	RXRA	-0.6725	0.0122	*
	ENSG00000221869	CEBPD	-0.7171	0.0421	*
WP244	<i>Alpha 6 beta 4 signaling pathway</i>				
	ENSG00000145675	PIK3R1	-0.6490	0.0563	
	ENSG00000185950	IRS2	-1.3015	0.0026	**
	ENSG00000187840	EIF4EBP1	-1.0484	0.0013	**
	ENSG00000196878	LAMB3	0.7227	0.0783	
WP395	<i>IL-4 signaling pathway</i>				

	ENSG00000111679	PTPN6	0.8908	0.0374	*
	ENSG00000145675	PIK3R1	-0.6490	0.0563	
	ENSG00000185950	IRS2	-1.3015	0.0026	**
	ENSG00000196924	FLNA	0.6900	0.2959	
	ENSG00000245848	CEBPA	-0.6036	0.3046	
WP437	<i>EGF/EGFR signaling pathway</i>				
	ENSG00000122691	TWIST1	-1.3377	0.0034	**
	ENSG00000136158	SPRY2	-1.0464	0.1629	
	ENSG00000145675	PIK3R1	-0.6490	0.0563	
	ENSG00000150907	FOXO1	-0.6201	0.0197	*
	ENSG00000171862	PTEN	-0.7038	0.0009	***
	ENSG00000187840	EIF4EBP1	-1.0484	0.0013	**
WP481	<i>Insulin signaling</i>				
	ENSG00000142949	PTPRF	-0.7103	0.0504	
	ENSG00000145675	PIK3R1	-0.6490	0.0563	
	ENSG00000150907	FOXO1	-0.6201	0.0197	*
	ENSG00000171862	PTEN	-0.7038	0.0009	***
	ENSG00000185950	IRS2	-1.3015	0.0026	**
	ENSG00000187840	EIF4EBP1	-1.0484	0.0013	**
	ENSG00000197442	MAP3K5	-1.3807	0.0001	***
WP581	<i>EPO receptor signaling</i>				
	ENSG00000185950	IRS2	-1.3015	0.0026	**
WP585	<i>Interferon type 1 signaling pathways</i>				
	ENSG00000111679	PTPN6	0.8908	0.0374	*
	ENSG00000145675	PIK3R1	-0.6490	0.0563	
	ENSG00000185950	IRS2	-1.3015	0.0026	**
	ENSG00000187840	EIF4EBP1	-1.0484	0.0013	**

WP706	<i>SIDS susceptibility pathway</i>			
	ENSG00000005249	PRKAR2B	-1.2490	0.0649
	ENSG00000113580	NR3C1	-0.7209	0.0235 *
	ENSG00000117054	ACADM	-0.6589	0.0887
WP716	ENSG00000152642	GPD1L	-1.5050	0.0013 **
	<i>Vitamin A and carotenoid metabolism</i>			
	ENSG00000162496	DHRS3	-0.6144	0.0456 *
	ENSG00000175445	LPL	-0.8835	0.0715
WP734	ENSG00000186350	RXRA	-0.6725	0.0122 *
	ENSG00000196502	SULT1A1	1.1064	0.0194 *
	<i>Serotonin receptor 4/6/7 and NR3C signalling</i>			
	ENSG00000113580	NR3C1	-0.7209	0.0235 *
WP1531	<i>Vitamin D metabolism</i>			
	ENSG00000186350	RXRA	-0.6725	0.0122 *
WP1982	<i>SREBP signalling</i>			
	ENSG00000099194	SCD	-0.7348	0.3263
	ENSG00000119927	GPAM	-0.9893	0.1286
	ENSG00000132170	PPARG	-1.1406	0.1439
	ENSG00000134324	LPIN1	-0.8101	0.0020 **
WP2034	ENSG00000175445	LPL	-0.8835	0.0715
	<i>Leptin signalling pathway</i>			
	ENSG00000076555	ACACB	-0.7896	0.0083 **
	ENSG00000110092	CCND1	0.8903	0.0568
	ENSG00000145675	PIK3R1	-0.6490	0.0563
	ENSG00000150907	FOXO1	-0.6201	0.0197 *
	ENSG00000152270	PDE3B	-0.7355	0.1033
	ENSG00000174697	LEP	1.1143	0.0283 *

	ENSG00000185950	IRS2	-1.3015	0.0026	**
	ENSG00000187840	EIF4EBP1	-1.0484	0.0013	**
WP2064	<i>Neural crest differentiation</i>				
	ENSG00000122691	TWIST1	-1.3377	0.0034	**
	ENSG00000125968	ID1	-0.8418	0.0471	*
	ENSG00000163132	MSX1	0.8771	0.0542	
WP2112	<i>IL17 signaling pathway</i>				
	ENSG00000221869	CEBPD	-0.7171	0.0421	*
WP2380	<i>BDNF signalling pathway</i>				
	ENSG00000073969	NSF	0.6676	0.0354	*
	ENSG00000076555	ACACB	-0.7896	0.0083	**
	ENSG00000134072	CAMK1	-0.6072	0.0204	*
	ENSG00000142949	PTPRF	-0.7103	0.0504	
	ENSG00000145675	PIK3R1	-0.6490	0.0563	
	ENSG00000185950	IRS2	-1.3015	0.0026	**
	ENSG00000187840	EIF4EBP1	-1.0484	0.0013	**
WP2431	<i>Spinal cord injury</i>				
	ENSG00000038427	VCAN	0.6848	0.1588	
	ENSG00000110092	CCND1	0.8903	0.0568	
	ENSG00000113328	CCNG1	-0.7276	0.1413	
	ENSG00000173369	C1QB	2.2126	0.0022	**
	ENSG00000174697	LEP	1.1143	0.0283	*
	ENSG00000188257	PLA2G2A	-0.9341	0.2216	
	ENSG00000204472	AIF1	1.8106	0.0002	***
	ENSG00000240583	AQP1	1.1739	0.0165	*
WP2853	<i>Endoderm differentiation</i>				
	ENSG00000113580	NR3C1	-0.7209	0.0235	*

	ENSG00000148908	RGS10	1.5962	0.0000	***
	ENSG00000150907	FOXO1	-0.6201	0.0197	*
WP2874	<i>Liver X receptor pathway</i>				
	ENSG00000025434	NR1H3	-0.7676	0.1741	
	ENSG00000099194	SCD	-0.7348	0.3263	
	ENSG00000186350	RXRA	-0.6725	0.0122	*
WP2875	<i>Constitutive androstane receptor pathway</i>				
	ENSG00000150907	FOXO1	-0.6201	0.0197	*
	ENSG00000186350	RXRA	-0.6725	0.0122	*
	ENSG00000196502	SULT1A1	1.1064	0.0194	*
WP2877	<i>Vitamin D receptor pathway</i>				
	ENSG00000049656	CLPTM1L	0.6394	0.0556	
	ENSG00000099804	CDC34	-0.6062	0.0494	*
	ENSG00000110092	CCND1	0.8903	0.0568	
	ENSG00000123080	CDKN2C	-1.0156	0.0616	
	ENSG00000125968	ID1	-0.8418	0.0471	*
	ENSG00000146674	IGFBP3	-0.6598	0.1089	
	ENSG00000150907	FOXO1	-0.6201	0.0197	*
	ENSG00000169252	ADRB2	-0.9151	0.0074	**
	ENSG00000170458	CD14	1.5349	0.0088	**
	ENSG00000180530	NRIP1	-1.8594	0.0053	**
	ENSG00000186350	RXRA	-0.6725	0.0122	*
	ENSG00000186458	DEFB132	-1.4203	0.0972	
	ENSG00000196126	HLA-DRB1	0.7603	0.0216	*
	ENSG00000196154	S100A4	1.0437	0.0004	***
	ENSG00000245848	CEBPA	-0.6036	0.3046	
WP2878	<i>PPAR alpha pathway</i>				

	ENSG00000025434	NR1H3	-0.7676	0.1741	
	ENSG00000100979	PLTP	1.0775	0.0056	**
	ENSG00000110092	CCND1	0.8903	0.0568	
	ENSG00000117054	ACADM	-0.6589	0.0887	
	ENSG00000186350	RXRA	-0.6725	0.0122	*
WP2879	<i>Farnesoid X receptor pathway</i>				
	ENSG00000185950	IRS2	-1.3015	0.0026	**
	ENSG00000186350	RXRA	-0.6725	0.0122	*
WP2884	<i>NRF2 pathway</i>				
	ENSG00000106853	PTGR1	-0.8258	0.0248	*
	ENSG00000117592	PRDX6	-0.6183	0.0088	**
	ENSG00000130821	SLC6A8	-0.6264	0.0581	
	ENSG00000167996	FTH1	0.6249	0.0366	*
	ENSG00000181019	NQO1	1.5861	0.0179	*
	ENSG00000186350	RXRA	-0.6725	0.0122	*
	ENSG00000211445	GPX3	-1.1580	0.0424	*

The significant difference between obese and lean subjects was obtained after statistical analysis on ArrayAnalysis.org, and the genes expression is demonstrated as logFC. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$. In bold genes differentially expressed in adipogenesis pathway.

Capítulo III

Artigo 2:

*Papel da vitamina D3 na adipogênese em células SGBS: novos achados na
proliferação de pré-adipócitos*

*(Role of vitamin D3 on adipogenesis in SGBS cells: new insights in human
preadipocytes proliferation)*

Artigo a ser submetido a revista *PLOS ONE* (eISSN: 1932-6203)

**Papel da vitamina D3 na adipogênese em células SGBS: novos achados na
proliferação de pré-adipócitos**

(Role of vitamin D3 on adipogenesis in SGBS cells: new insights in human
preadipocytes proliferation)

Ingrid Felicidade¹, Pamela Fischer-Posovszky², Simone Cristine Semprebon³, Andressa
Megumi Niwa³, Gláucia Fernanda Rocha D'Epiro³, Bruna Isabela Biazi³, Lilian Areal
Marques³, Martin Wabitsch², Susan LM Coort⁴, Chris T. Evelo⁴, Mário Sérgio
Mantovani³, Lúcia Regina Ribeiro¹.

1 – Department of Pathology, Medical School of Botucatu (FMB), São Paulo State
University (UNESP), Botucatu, Brazil

2 – Department of Pediatrics and Adolescent Medicine, Division of Pediatric
Endocrinology and Diabetology, Ulm, Germany

3 – Department of General Biology, State University of Londrina (UEL), Londrina,
Brazil.

4 – Department of Bioinformatics - BiGCaT, Maastricht University, Maastricht, The
Netherlands

Autor correspondente:

Ingrid Felicidade

Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Geral, Laboratório de
Genética Toxicológica, Universidade Estadual de Londrina.

Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445 Km 380, Campus Universitário. CEP 86057-970,
Londrina/PR, Brasil.

Telefone/Fax: +55 43 3371-4977

E-mail: ingrid.felicidade@gmail.com

Conflitos de interesse: Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

26 **Resumo**

27 **Introdução:** Indivíduos obesos, normalmente, possuem mais vitamina D (VitD)
28 armazenada no tecido adiposo do que indivíduos eutróficos. A expressão gênica do
29 receptor da vitamina (VDR) no tecido adiposo pode influenciar na adipogênese, sendo,
30 portanto, uma via alvo de interesse para mais estudos. O presente estudo teve como
31 objetivo avaliar o papel da VitD na proliferação e diferenciação de pré-adipócitos
32 humanos.

33 **Metodologia:** Análise celular em tempo real (RTCA), ensaios de atividade metabólica e
34 proliferação celular foram utilizados para mensurar os efeitos da VitD na proliferação e
35 diferenciação adipogênica de células SGBS (síndrome de Simpson-Golabi-Behmel)
36 tratadas com VitD 10nM e 100nM. Análises de apoptose e ciclo celular foram, ainda,
37 realizadas, seguidas por quantificação de triglicerídeos e expressão gênica por RT-
38 qPCR.

39 **Resultados:** Em pré-adipócitos, o tratamento com VitD 100nM apresentou um índice
40 celular maior do que o controle, enquanto houve uma diminuição no metabolismo
41 mitocondrial e concentração lipídica, em conjunto com parada no ciclo celular em G1,
42 sem morte ou apoptose, e com aumento da regulação dos genes *BCL2*, *VDR*, *C/EBPα* e
43 *C/EBPβ*. Em relação à atividade metabólica, os resultados foram, ainda, mantidos até o
44 final do experimento, demonstrando que células tratadas somente no estágio de pré-
45 adipócitos, com 100nM, tiveram uma diminuição no metabolismo mitocondrial
46 enquanto que, a partir do 12º dia após a diferenciação, células tratadas com 10nM
47 também apresentaram diminuição metabólica. Após 16 dias de diferenciação, as células
48 demonstraram morfologia de adipócitos maduros com aumento nas concentrações de
49 lipídios, especialmente quando tratadas com VitD.

50 **Discussão:** Os pré-adipócitos demonstraram ser mais sensíveis à VitD do que os

adipócitos. Concentrações elevadas de VitD apresentaram ação durante a proliferação, além do aumento na expressão gênica do *VDR*, com manutenção dos resultados após a diferenciação. Além disso, a VitD causou parada no ciclo celular, em G1, e, possivelmente, uma resistência à apoptose por meio do aumento da regulação do gene *BCL2*, em pré-adipócitos.

Conclusão: Entender o papel da VitD no tecido adiposo tem se tornado um importante tópico no campo multidisciplinar do tratamento e prevenção da obesidade, além de garantir a utilização segura da VitD também por indivíduos obesos.

INTRODUÇÃO

A vitamina D é sintetizada na pele em resposta à luz ultravioleta B (UV-B) e, posteriormente, convertida no fígado em 25-hidroxivitamina D, a qual é um pró-hormônio para a produção renal do hormônio $1\alpha,25$ -dihidroxivitamina D3 (VitD) (1). O metabólito ativo da vitamina D age como um hormônio esteroide que se liga ao receptor da vitamina D (*VDR*) com alta afinidade (2). O *VDR* ativado pelo seu ligante VitD, forma um heterodímero com o gene receptor retinoide X (*RXR*). Esse complexo pode se ligar ao elemento responsivo à VitD (VDRE) que está presente na região promotora de diversos genes, e essa ligação é responsável por causar ativação ou repressão transcricional desses genes, em diversos tecidos (3).

Evidências sugerem que há uma forte associação entre deficiência de VitD e obesidade, ao redor do mundo (4). A VitD, e seus metabólitos, são lipofílicos e, dessa forma, são armazenados no tecido adiposo, sendo esse evento a possível causa para baixos níveis séricos de VitD em indivíduos obesos (5-6). Recentemente, Didriksen et al. (7), demonstraram que o tecido adiposo de indivíduos obesos com tolerância à glicose diminuída (IGT) e/ou glicose em jejum alterada (IFG) apresentaram níveis de vitamina D3 no tecido adiposo seis vezes maiores do que o grupo placebo, após intervenção com

20.000 UI/semana por 3-5 anos. No âmbito celular, a expansão do tecido adiposo durante o desenvolvimento da obesidade envolve aumento no volume celular de adipócitos pré-existentes (hipertrofia) e aumento no número de células (hiperplasia), mediado pelo aumento na proliferação e diferenciação de pré-adipócitos (8-9). Entender os mecanismos que controlam a proliferação de pré-adipócitos e sua diferenciação em adipócitos, pode fornecer novas perspectivas para o estudo da etiologia e prevenção da obesidade e comorbidades associadas (10).

Frente à pandemia da obesidade, há um aumento no interesse de como é possível modular os fatores que envolvem a adipogênese, como os fatores de transcrição (11). Recentemente, Clemente-Postigo et al. (12), demonstraram que o tecido adiposo de indivíduos obesos mórbidos possuía uma maior expressão do gene *VDR* do que o tecido de indivíduos eutróficos. Esse aumento da disponibilidade do fator de transcrição *VDR* durante a adipogênese, e a sua relação com a obesidade, pode permitir a influência da VitD nessa via e processo (4;13).

O objetivo desse estudo foi, portanto, estudar os efeitos da VitD durante a proliferação e diferenciação de pré-adipócitos humanos. Utilizou-se a linhagem celular, finita, SGBS (síndrome de Simpson-Golabi-Behmel) como sistema modelo, para tratamento com duas concentrações de VitD, comumente usadas na literatura.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cultura celular

Células de pré-adipócitos humanos SGBS, gentilmente doadas pelo Prof. Dr. Martin Wabistch (Department of Pediatrics and Adolescent Medicine, Division of Pediatric Endocrinology and Diabetology, Ulm, Germany), foram cultivadas e diferenciadas em adipócitos maduros, por 16 dias, como descrito previamente (14-15). A fim de determinar a densidade celular ideal para os experimentos, realizou-se o ensaio de

titulação em sistema fechado de análise celular em tempo real *xCELLigence* (RTCA) (Roche Applied Science, Alemanha) (Dado suplementar S1). A densidade celular de 2.000 células/poço, em placas de cultura de 96 poços, foi definida, sendo essa taxa utilizada em todos os ensaios.

Delineamento experimental

Todas as células foram semeadas 24h *a priori* dos experimentos e tratadas de acordo com o ensaio. As células foram cultivadas e diferenciadas da mesma forma, diferindo somente no tempo em que receberam o tratamento com VitD, realizado conjuntamente com o respectivo meio de cultura para o estágio celular.

Análise celular em tempo real (RTCA) via sistema xCELLigence

O ensaio de RTCA permite um monitoramento em tempo real de células vivas, por meio de análise de impedância elétrica. Placas de cultura celular projetadas com microelétrodos de ouro, na base de cada poço, permitem avaliar a impedância elétrica de um ponto do experimento (Z_i) em relação à leitura basal (Z_0). A impedância elétrica foi usada para calcular a unidade arbitrária denominada índice celular (IC) ($CI = \frac{Z_i \cdot Z_0}{30}$) (16). Sendo a normalização pela leitura inicial do tratamento, denominada de índice celular normalizado (ICN). A impedância elétrica pode ser afetada pela morfologia, adesão celular, mobilidade de células aderentes e conteúdo celular, incluindo lipídios.

O ensaio RTCA foi realizado de acordo com as instruções do fabricante, em placas de 96 poços *E-plates* (Roche, Alemanha) com solução de adesão (fibronectina [1mg/mL] e gelatina [0,05%]). Embora ensaios prévios demonstraram que após 24h, o perfil celular com a solução de adesão foi similar ao de células sem a solução de adesão (Dado suplementar S1), utilizou-se a solução de adesão devido ao fato do ensaio perdurar por 19 dias, em uma mesma placa de cultura.

Os tratamentos foram realizados em células em diferentes estágios, além de tratamentos

126 únicos e contínuos. Os grupos são descritos abaixo e representados na Figura S1.

127 Grupo I: Tratamento único em pré-adipócitos (Pré) – tratamento por 48h, após o
128 período de estabilização celular;

129 Grupo II: Contínuo – desde o estágio de pré-adipócitos (Pré-T_{avaliaçãofinal}) e a partir do
130 estágio de diferenciação (T0h-T_{avaliaçãofinal}), onde o tratamento iniciou-se juntamente
131 com o meio de diferenciação celular no T0h;

132 Grupo III: Tratamentos únicos em células diferenciadas – somente no estágio de
133 diferenciação (T4d) ou após 4 (T8d), 8 (T12d) e 12 (T16d) dias após a diferenciação;

134 Grupo IV: Controle – sem tratamento

135 *Ensaio do MTT*

136 O ensaio celular do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio)
137 foi realizado de acordo com protocolo descrito por Mosmann (17), com modificações. O
138 método é amplamente utilizado como um ensaio citotóxico, estudo da viabilidade,
139 proliferação celular e metabolismo mitocondrial, através de valores de absorbância.

140 Seguindo o mesmo delineamento experimental do ensaio do RTCA, as placas foram
141 divididas de modo a ter, juntamente com os tratamentos alvo (pré-adipócitos, T4d, T8d,
142 T12d e T16d), os grupos I, II e IV, sendo acrescido um veículo por tratamento e o
143 branco. Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços, sem tratamento com
144 solução de adesão. Após o período de tratamento, todo o conteúdo dos poços foi
145 removido e 100µL de MTT 0,5 mg/mL, diluído em meio de cultura DMEM sem soro,
146 foi adicionado. As células foram incubadas a 37°C por 4h, seguido por remoção do
147 MTT e adição de 100µL de DMSO. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro
148 (Themoplate) a 540nm. As avaliações foram realizadas em três replicatas biológicas.

149 *Ensaio de azul de tripano*

150 O ensaio de azul de tripano foi realizado em pré-adipócitos com o objetivo de elucidar o

padrão de resposta encontrado nos ensaios do RTCA e MTT. O ensaio foi realizado somente no estágio de pré-adipócitos, com tratamentos de VitD ou veículo, por 48h, em placas de cultura de 6 poços. O número celular foi determinado por meio do corante azul de tripano em contador celular automatizado (Countess[®], Invitrogen). O ensaio foi realizado em três replicatas biológicas.

Análise de apoptose e ciclo celular

As amostras foram analisadas por citometria de fluxo (Accuri C6, BD Pharmingen[™]) usando o *software* BD Accuri C6, de acordo com as instruções do fabricante. Para análise de apoptose e ciclo celular, as células receberam um tratamento único, VitD ou veículo, em pré-adipócitos (Pré), T0h (T0h_T_{avaliaçãofinal}) e no 11º dia após a diferenciação (T12d). Ademais, para a análise de ciclo celular, o tratamento T12d, assim como a análise em T12d após os tratamentos únicos, em pré-adipócitos e T0h, não foram realizados, pois nos ensaios pilotos nenhuma alteração de ciclo celular foi observada em adipócitos maduros (dados não apresentados). Após os tratamentos, as células foram analisadas como descrito a seguir: i) tratamento único em pré-adipócitos: após 48h de tratamento (Pré), em pré-adipócitos, e 24h (Pré_T24h), 48h (Pré_48h) e 12 dias após a diferenciação (Pré-T12d); ii) T0h: analisados após 4h (T0h_T4h), 24h (T0h_T24h), 48h (T0h_T48h) e 12 dias após a diferenciação (T0h_T12d) e iii) T12d: após 24h de tratamento em adipócitos diferenciados por 11 dias (T12d).

Após o período de tratamentos, as análises de apoptose foram realizadas usando o kit Annexin V-PE Apoptosis Detection (BD, Pharmigen), de acordo com o protocolo do fabricante. Três populações celulares foram definidas de acordo com a marcação por fluorocromos: células viáveis (Anexina V/7-AAD negativos); apoptose inicial (Anexina V positiva/7-AAD negativa); apoptose final/necrose (AnexinaV/7-AAD ambos positivos e Anexina V negativa/7-AAD positiva).

Para análise do ciclo celular, após o período de tratamento, as células foram tripsinizadas (Gibco, Life Technologies), centrifugadas (2000 rpm por 5 min) e ressuspensas em PBS. As amostras foram tratadas com RNase (0,1mg/mL; QIAGEN), por 30 min a 37°C, e, então, adicionou-se uma solução fluorocrômica hipotônica (50 mg/mL de iodeto de propídio, 0,1% de citrato de sódio, 0,1% de Triton X-100), e colocadas em gelo, no escuro, por 30 minutos (18). Posteriormente, as porcentagens de células nas diferentes fases (G1, S e G2/M) foram estimadas, de acordo com a intensidade de fluorescência do iodeto de propídio pela citometria de fluxo.

Um total de 10.000 eventos foram adquiridos para cada amostra, e três replicatas biológicas foram realizadas, em ambas as análises.

Análise colorimétrica e quantificação de lipídios

As análises de microscopia e quantificação de triglicerídeos em pré-adipócitos e adipócitos tratados com VitD foram realizadas usando AdipoRed™, um corante vermelho nilo hidrofílico que, quando particionado em um ambiente hidrofóbico, se torna fluorescente. O ensaio foi realizado seguindo as instruções do fabricante e as leituras foram conduzidas em espectrofotômetro de microplacas (excitação 485nm e emissão 535/25nm, Victor, Perkin Elmer). Dois momentos foram escolhidos para quantificação de lipídios, Grupo I e tratamento contínuo desde o estágio de pré-adipócito (Grupo II; Pré_T16d).

As análises de microscopia foram realizadas em microscópio invertido, em objetiva de 20x com ampliação ótica de 460x, em luz convencional e fluorescente (filtro verde, excitação 482/18nm e emissão 532/59nm, FLoid® Cell Imaging Station, Life Technologies).

Expressão gênica em RT-qPCR

Para avaliar a expressão gênica de mRNA, a reação em cadeia da polimerase

quantitativa em tempo real (RT-qPCR) foi utilizada. Os pré-adipócitos foram tratados com veículo ou VitD, de acordo com os grupos descritos a seguir: i) tratamento único em pré-adipócitos (Pré), por 48h; ii) tratamento em pré-adipócitos durante o estágio de diferenciação, por 4h (T0h_4h) e 24h (T0h_24h) e iii) tratamento único em adipócitos 11 dias após a diferenciação (T12d), por 24h.

Os genes selecionados foram: *VDR*, *C/EBP α* , *C/EBP β* , *C/EBP δ* , *PPAR γ* , *CAPN1*, *BCL2*, *CASP3*, *CASP9* e *CDKN1A (P21)*, e tendo o *RPL13A* como gene constitutivo. As sequências dos *primers* e os detalhes são descritos na Tabela S1, e *C/EBP α* , *C/EBP β* , *C/EBP δ* e *CASP9* não foram avaliados no T12d. O RNA total foi extraído e, a concentração e integridade avaliadas de acordo com Baranoski et al. (19), seguido por síntese de cDNA (20). O RT-qPCR foi realizado usando Platinum SYBR Green qPCR SupermixUDG (Invitrogen) em CFX96 Real-Time System BIO-RAD (19), de acordo com as condições especificadas na Tabela S1, em três replicatas biológicas.

Análise estatística

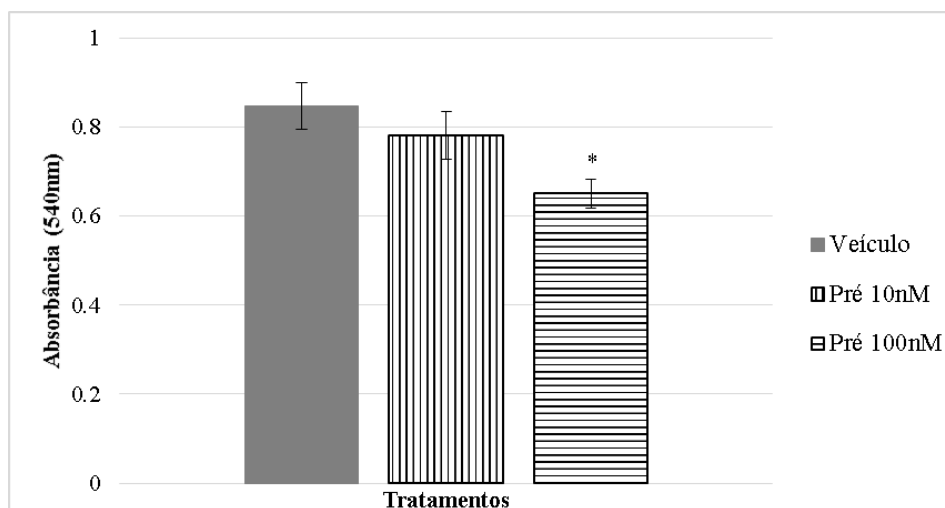
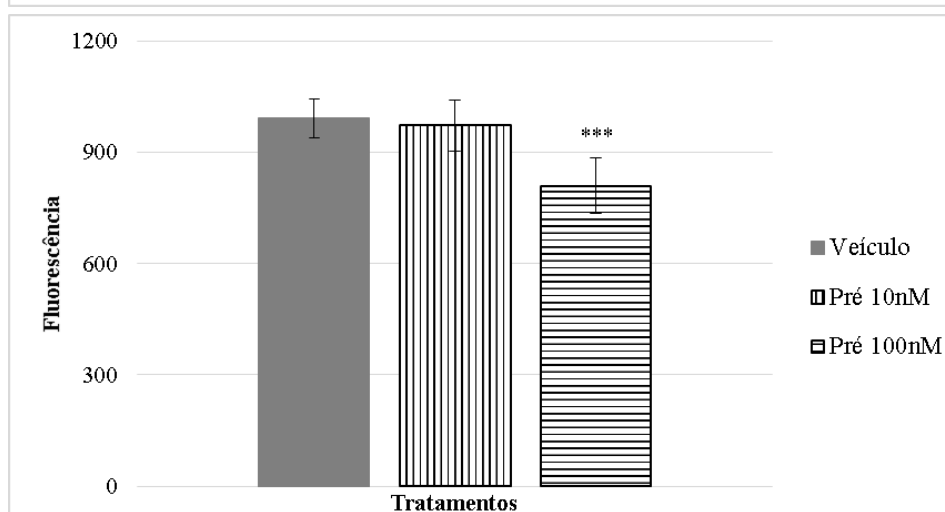
Os resultados são apresentados como Médias $\pm$ SEM. Dados dos ensaios RTCA, MTT e azul de tripiano, análise de apoptose e ciclo celular, e quantificação de lipídios foram analisados por análise de variância (ANOVA), seguida por Dunnett, comparando os tratamentos com VitD ao controle, ou veículo, usando GraphPad Prism1 Software version 5.00 (GraphPad Software, San Diego, California, USA). *Fold changes* do RT-qPCR foram normalizadas e calculadas de acordo com Pfaffl et al. (21), usando o *Pairwise Method Fixed Reallocation Randomization Test inserted into the REST software* (M. Pfaffl, Munich, Germany; QIAGEN, 2009, Germany). O teste t de Student foi utilizado para testar as diferenças entre os tratamentos nas análises de apoptose e ciclo celular e RT-qPCR, e entre os pré-adipócitos e adipócitos maduros, na quantificação de lipídios. Para todas as análises estatísticas foi considerado significativo

um $p < 0,05$.

RESULTADOS

Tratamento com VitD em células de pré-adipócitos humanos

O tratamento com VitD 100nM diminuiu a atividade metabólica mitocondrial e lipídios intracelular (Figura 1A-B) enquanto aumentou o ICN (Figura 1C). Na Figura 1D é observada uma diminuição no metabolismo mitocondrial nos tratamentos com VitD e uma, sutil, diferença na morfologia celular, comparado com o controle, o qual é compatível com o aumento no ICN. O ensaio de proliferação não apresentou nenhuma diferença entre os tratamentos e o veículo (Figura S2).

**A****B**

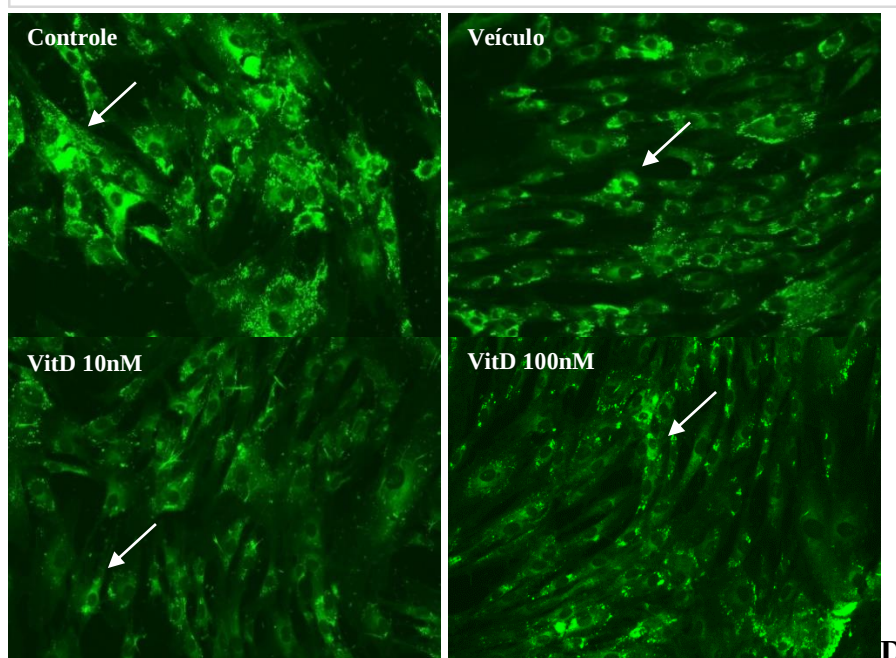
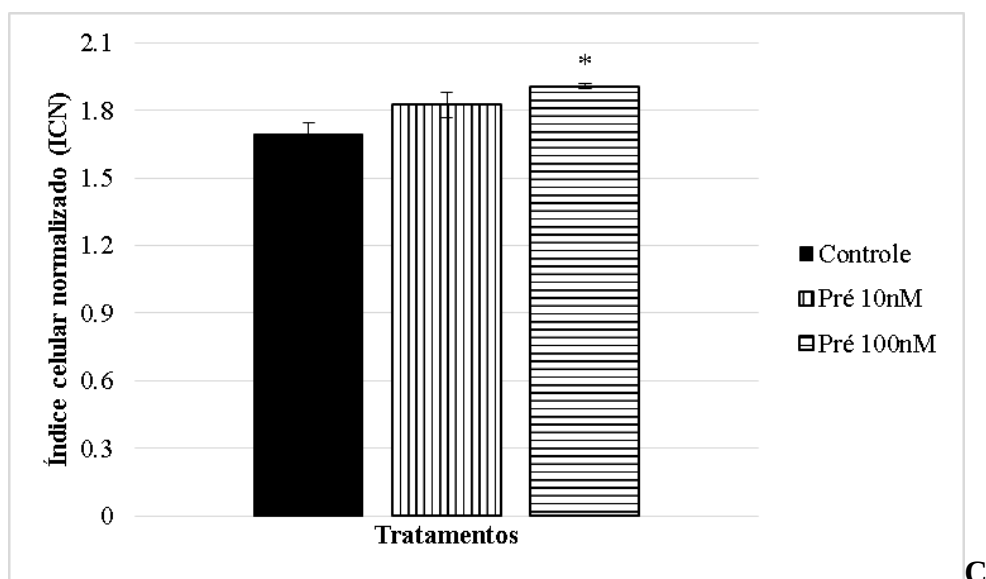
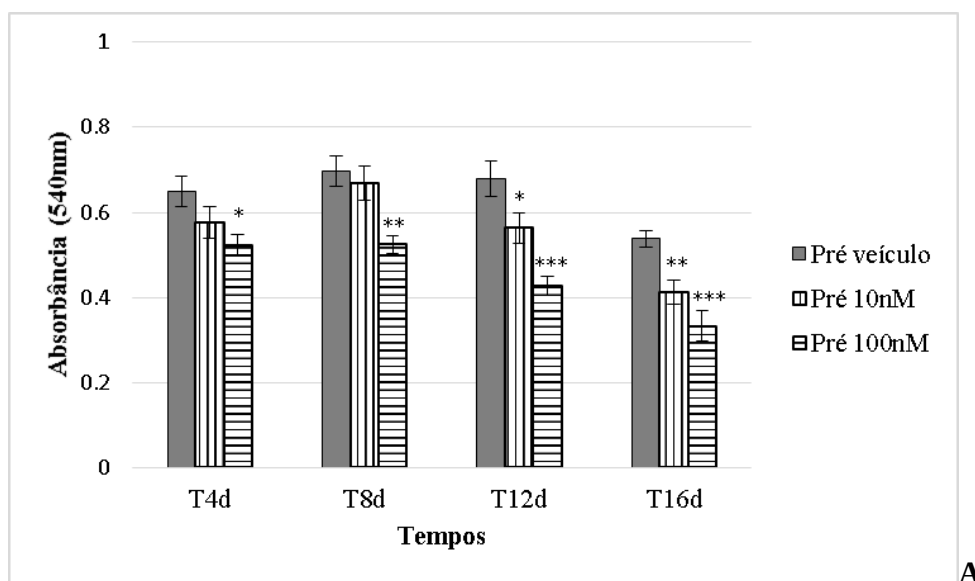


Figura 1 – Tratamento com vitamina D em pré-adipócitos humanos tratados por 48h. (A) Metabolismo mitocondrial, via MTT, com base nos valores de absorbância; (B) quantificação de lipídios; (C) índice celular normalizado, via RTCA; e (D) análise de microscopia de fluorescência em pré-adipócitos. Os dados estão apresentados como Média $\pm$ SEM. Setas indicam a presença de vacúolos de lipídios. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, em relação ao controle ou veículo.

Como a VitD demonstrou ser efetiva em pré-adipócitos, avaliou-se se esses resultados

248 poderiam ser também observados em adipócitos, quanto ao metabolismo mitocondrial e
 249 ao padrão de ICN. Foi observado que um tratamento único com VitD 100nM em pré-
 250 adipócitos foi capaz de induzir alterações nas células, sendo os efeitos visualizados
 251 mesmo após 16 dias de diferenciação, enquanto o tratamento com VitD 10nM
 252 demonstrou diminuir o metabolismo mitocondrial somente nos T12d e T16d,
 253 comparados com o veículo (Figura 2A). O perfil ICN foi similar aos tratamentos únicos
 254 com VitD após 4 dias de diferenciação, com um efeito oposto observado no T12d e
 255 T16d (Figura 2B). Nenhum efeito foi observado no ICN no T8d (Figura S3B).
 256 Em adição, VitD, em ambas as concentrações, promoveram parada no ciclo celular em
 257 G1/S, sem alterações na expressão do *CDKN1A* (*P21*) e sem morte ou apoptose celular.



A

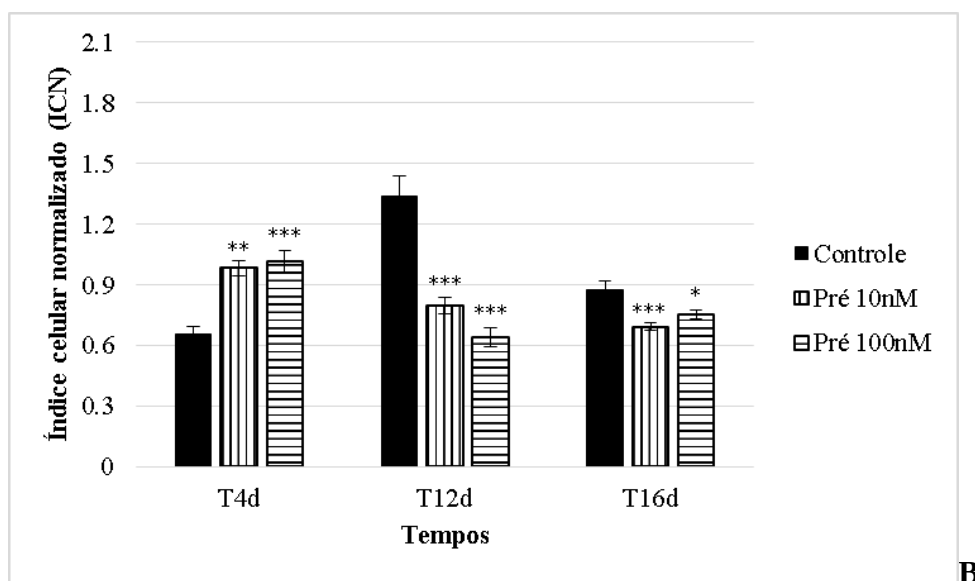
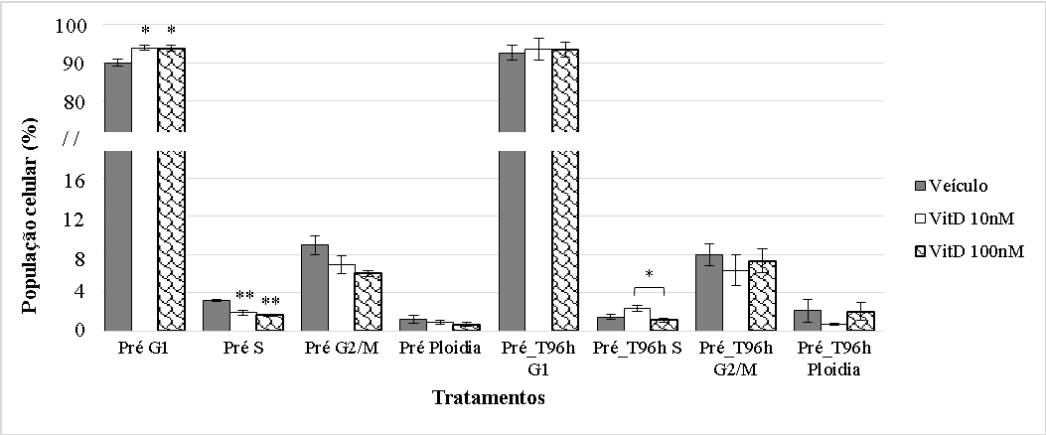
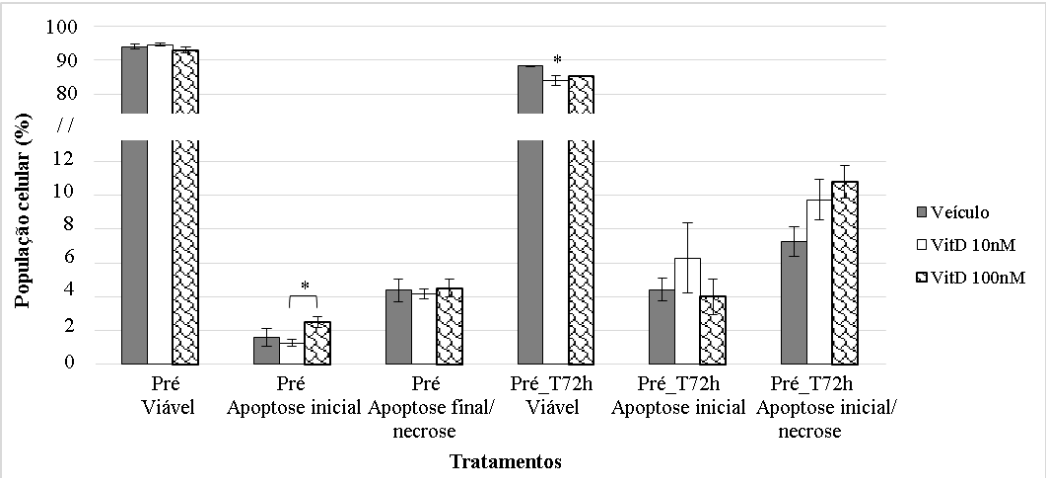


Figura 2 – Pré-adipócitos induzidos à diferenciação após tratamento único com vitamina D. (A) Metabolismo mitocondrial, via MTT, com base nos valores de absorbância, e (B) índice celular normalizado, via RTCA, em pré-adipócitos humanos. Os dados estão apresentados como Média $\pm$ SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, em relação ao controle ou veículo.

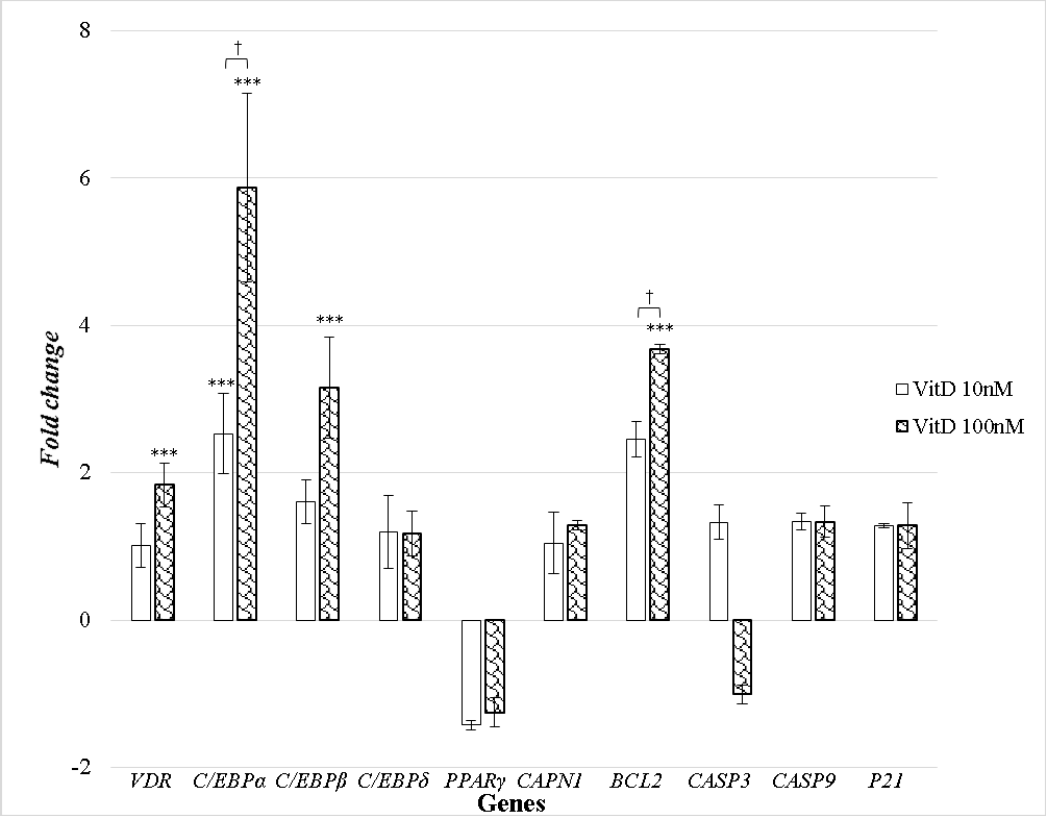
A VitD 100nM demonstrou um aumento na porcentagem de células em apoptose inicial, comparada com VitD 10nM, e aumento da regulação de *BCL2* (Figura 3). Além disso, na análise de apoptose (Figura S4), o tratamento único com VitD 10nM, comparado com veículo, demonstrou uma diminuição na porcentagem da população de células viáveis, após 72h de indução da diferenciação (Pré_T72h) (Figura 3B). Tratamento com VitD 10nM também demonstrou um aumento na porcentagem da população celular na fase S, comparado com VitD 100nM, 96h após a diferenciação (Pré_T96h) (Figura 3A). Ainda, o tratamento com VitD demonstrou ação em pré-adipócitos por meio do aumento da regulação do gene *VDR*, seguido por *C/EBP α* e *C/EBP β* (Figura 3C).



A



B



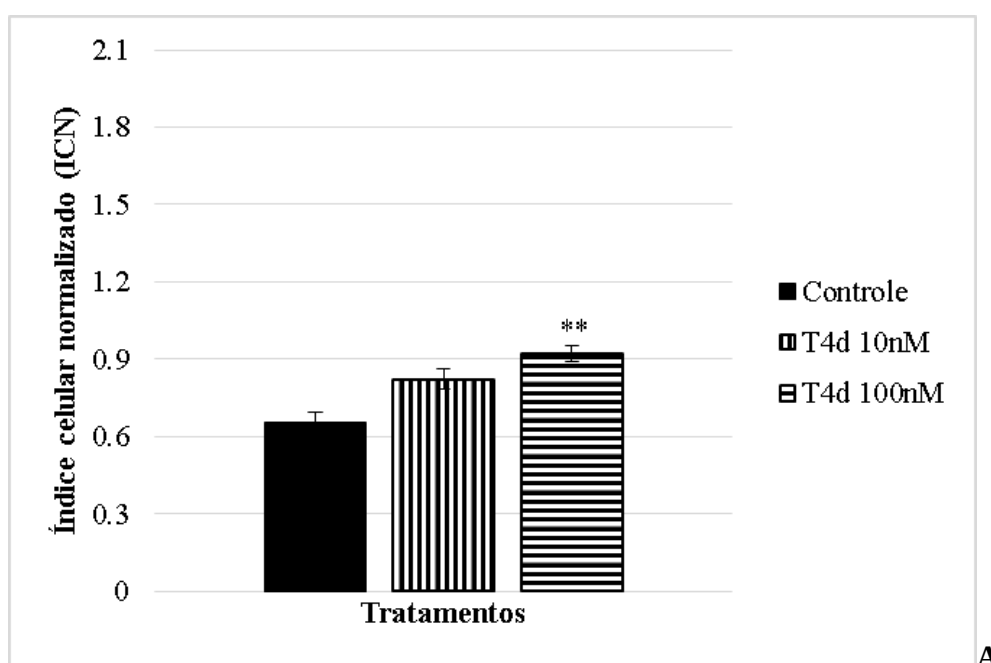
C

Figura 3 – Efeitos da vitamina D em pré-adipócitos humanos. Os dados são

apresentados como Média $\pm$ SEM para análises de (A) ciclo e (B) apoptose celular, baseadas na porcentagem da população celular estudada, e (C) do *fold change*, em relação ao veículo, da expressão gênica por RT-qPCR. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e † $p \leq 0,065$.

Tratamento com VitD durante o estágio de diferenciação

Tratamentos com VitD durante o estágio de diferenciação (T0h_T4d) não induziram alterações no metabolismo mitocondrial (Figura S6A), assim como na apoptose e ciclo celular (Figura S4 e S5). Entretanto, a VitD 100nM aumento o ICN (Figura 4A). Após 4h de tratamento, a expressão gênica não apresentou alterações significativas, embora o VDR e C/EBP δ tenham demonstrado diminuição na regulação gênica (Figura S7A). Ao passo que, após 24h de tratamento e diferenciação, a expressão gênica do VDR tenha continuado com uma diminuição da regulação, não significativa, para ambas as concentrações de VitD, enquanto C/EBP α apresentou um aumento na regulação gênica, significativo, para VitD 10nM ($p=0,037$) e uma tendência para VitD 100nM ($p=0,063$) (Figura 4B).



A

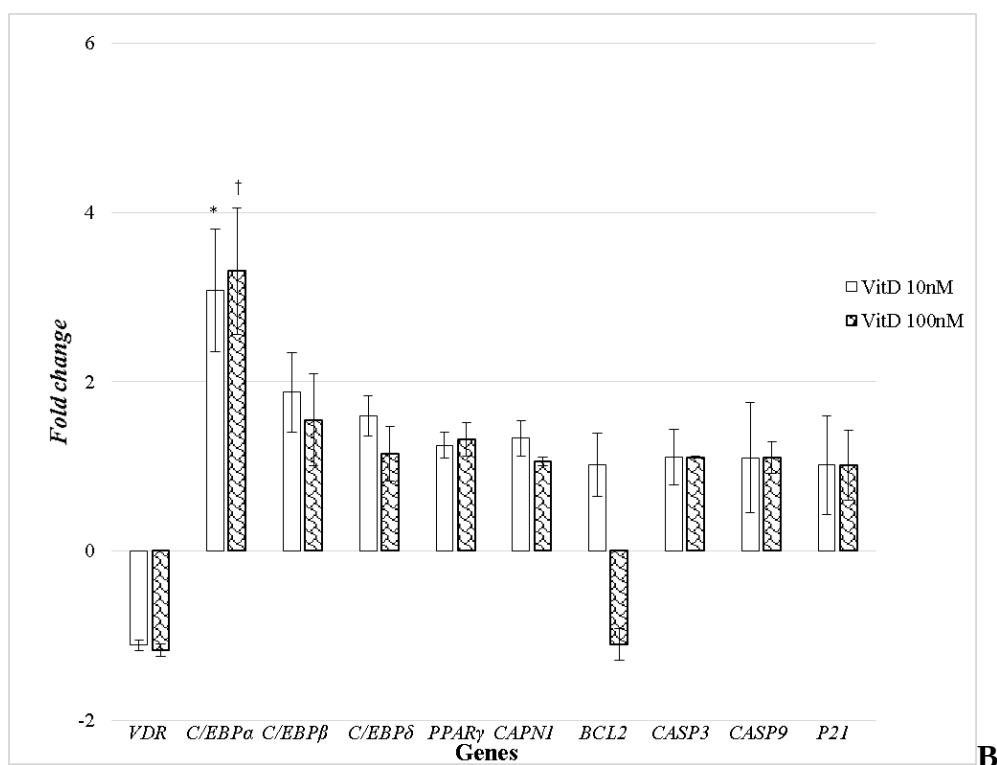


Figura 4 – Tratamento com vitamina D em pré-adipócitos durante o estágio de diferenciação. (A) índice celular normalizado, via RTCA após 4 dias de diferenciação e tratamento, e (B) *fold change*, em relação ao veículo, da expressão gênica por RT-qPCR, após 24h de diferenciação e tratamento com VitD. Os dados estão apresentados como Média $\pm$ SEM * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e † $p \leq 0,065$.

Em geral, as células SGBS apresentaram um aumento na porcentagem de células na fase G2 do ciclo celular após 4h de diferenciação, sendo esse período o qual obteve maior porcentagem de células nessa fase durante todos os tempos estudados (Figura S5), fato associado à expansão clonal mitótica, comumente encontrada em células de roedores.

Tratamento com VitD em adipócitos

Adipócitos após 4, 8 e 12 dias de diferenciação apresentaram diminuição na sensibilidade ao tratamento da VitD. Observou-se que adipócitos tratados com VitD, 8 dias após a diferenciação, apresentaram diminuição no metabolismo mitocondrial,

comparado com o veículo (Figura 5A). No ensaio do RTCA, no 16º dia, o tratamento com VitD 10nM diminuiu o perfil de ICN comparado com o controle (Figura 5B).

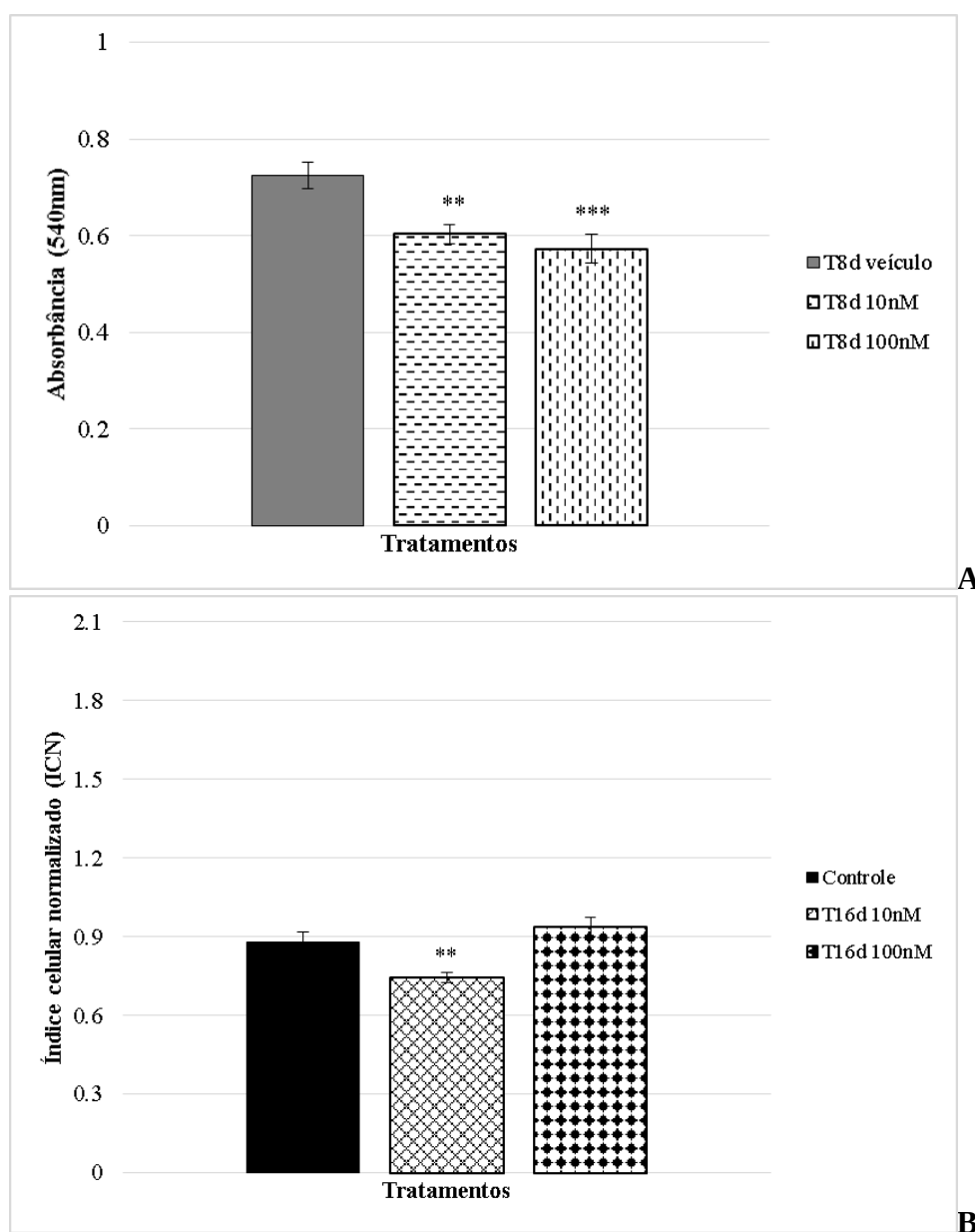


Figura 5 – Tratamento com vitamina D em adipócitos induzidos à diferenciação.

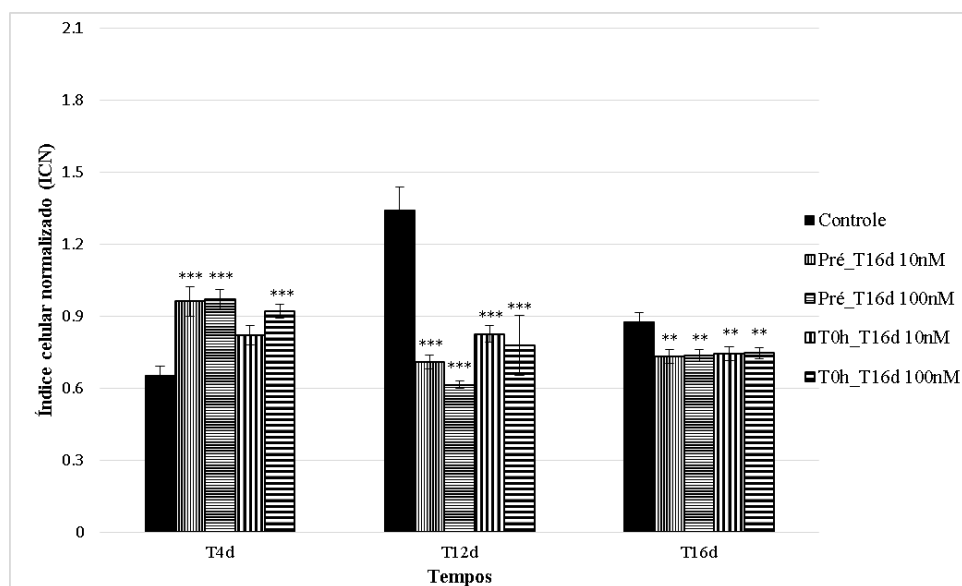
(A) Metabolismo mitocondrial, via MTT com base nos valores de absorbância, em adipócitos tratados com VitD 4 dias após a diferenciação, por 4 dias, e (B) índice celular normalizado, via RTCA, em adipócitos tratados com VitD 12 dias após a diferenciação, por 4 dias. Os dados estão apresentados como Média $\pm$ SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Ademais, nenhum efeito foi observado na análise de apoptose e ciclo celular, assim como na expressão gênica 12 dias após a diferenciação (Figura S4, S5 e S7B).

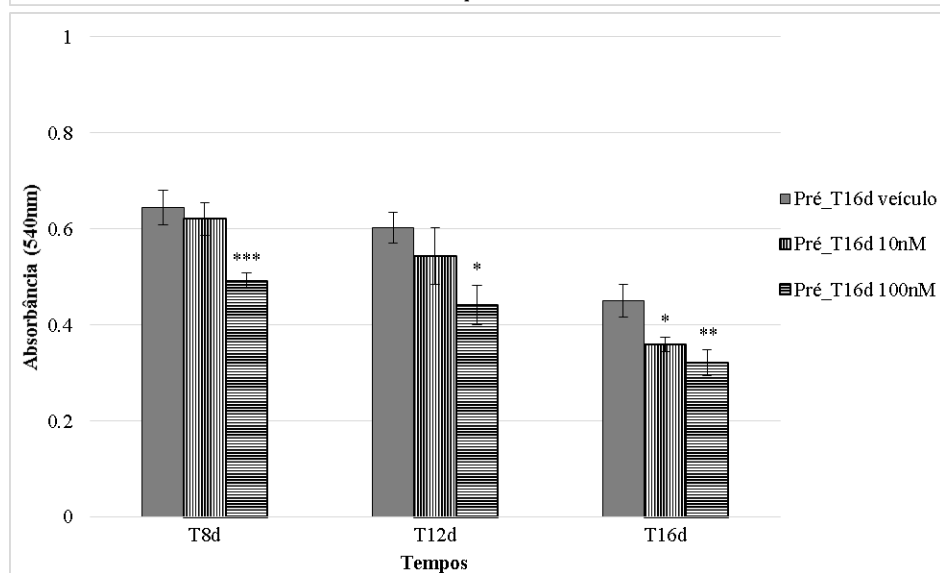
Tratamento contínuo com VitD desde pré-adipócitos e a partir do estágio de diferenciação (T0h)

Como os tratamentos com VitD demonstraram ser mais efetivos durante a proliferação e diferenciação, talvez devido ao fato da expressão gênica do *VDR* ser atribuída somente durante a adipogênese, foi testado o tratamento contínuo com VitD nesses períodos. O mesmo perfil de ICN do tratamento único foi observado em pré-adipócitos continuamente tratados (Figura 2B e Figura 6A), assim como em pré-adipócitos tratados a partir do T0h. Não foram observados efeitos no metabolismo mitocondrial quando os pré-adipócitos foram tratados continuamente a partir do estágio de diferenciação (T0h) (Figura S6). Já os efeitos do tratamento contínuo com VitD desde o estágio de pré-adipócitos demonstraram efeitos similares ao tratamento único em pré-adipócitos, no metabolismo mitocondrial, enquanto no T16d o tratamento com VitD 10nM também apresentou diferenças significativas quando comparado ao veículo, sugerindo um efeito cumulativo (Figura 2A e 6B).

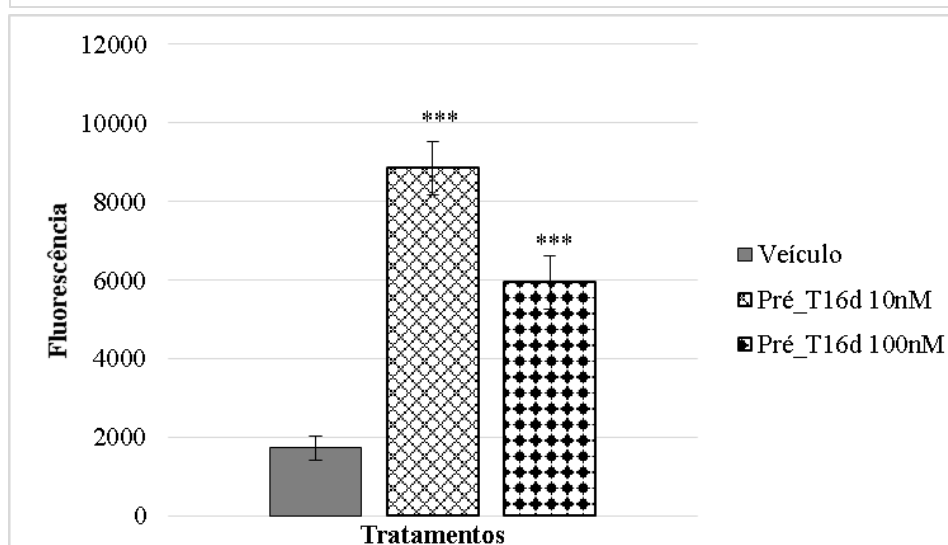
O tratamento contínuo, desde o estágio de pré-adipócitos, demonstrou um incremento na quantificação de lipídios após 16 dias de diferenciação, sendo o efeito mais proeminente visualizado no tratamento com VitD 10nM (Figura 6C).



A



B



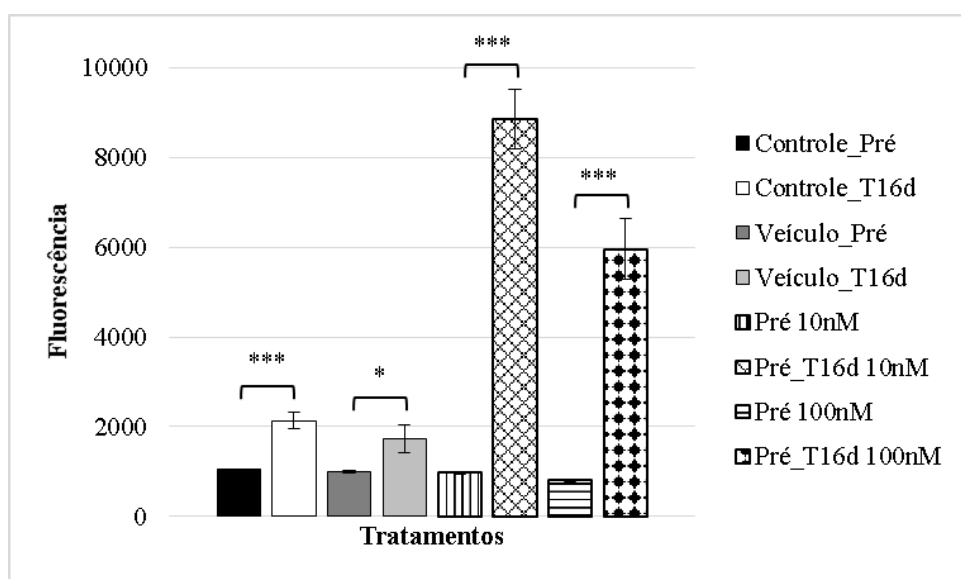
C

Figura 6 – Tratamento contínuo com vitamina D em pré-adipócitos humanos. (A)

índice celular normalizado, via RTCA, em pré-adipócitos, induzidos à diferenciação, tratados continuamente desde o estágio de pré-adipócitos ou a partir do T0h, por 16 dias; (B) metabolismo mitocondrial, via MTT com base nos valores de absorbância, e (C) quantificação de lipídios, a partir da fluorescência, em pré-adipócitos, induzidos à diferenciação, tratados continuamente desde o estágio de pré-adipócitos por 16 dias. Os dados estão apresentados como Média $\pm$ SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Diferenciação de células de pré-adipócitos humanos SGBS em adipócitos

Os resultados confirmaram a diferenciação de pré-adipócitos humanos em adipócitos, assim como a eficiência do protocolo utilizado em induzir a diferenciação. O aumento na quantificação de lipídios é um resultado bem estabelecido para a confirmação da diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos maduros e, no presente estudo, observou-se um aumento na quantificação de lipídios intracelular em todos os tratamentos avaliados (controle, veículo, e tratamentos contínuos de VitD) (Figura 7A). Ainda, a microscopia de luz em adipócitos humanos demonstrou células diferenciadas com diversos vacúolos intracelular, confirmando a presença de lipídios (Figura 7B).



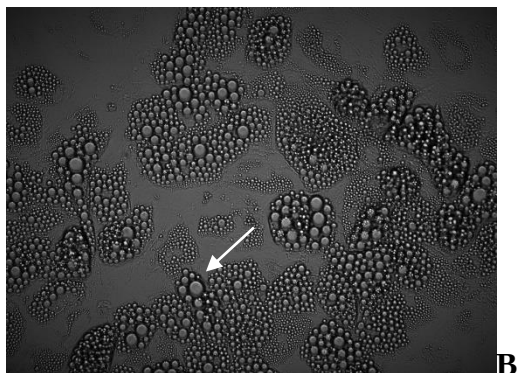


Figura 7 – Adipócitos humanos após diferenciação celular. (A) Quantificação de lipídios em pré-adipócitos e adipócitos tratados com VitD, baseada em fluorescência, por 48h e 16 dias contínuos, respectivamente; (B) microscopia de luz, com aumento de 460x, de adipócitos maduros após 16 de diferenciação. Setas indicam a presença de vacúolos de lipídios. Os dados estão apresentados como Média $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$.

DISCUSSÃO

Tecido adiposo subcutâneo (SAT, *subcutaneous adipose tissue*) é o maior tecido adiposo humano e local preferencial para armazenamento de gordura e órgão alvo para VitD (22). Recentemente, obesidade tem disso demonstrada ser um fator de risco para deficiência de VitD enquanto a situação oposta tem demonstrado pouco impacto (23-24). Essa deficiência pode ser resultado do sequestro ou diluição volumétrica da VitD no tecido adiposo (25-26). Como o tecido adiposo expressa VDR, principalmente durante a diferenciação, assim como enzimas metabolizadoras, como *CYP27B1* e *CYP24A1*, o estudo do papel da VitD em adipócitos humanos, em diferentes estágios, é um tópico relevante, especialmente nesse momento, onde deficiência de VitD e obesidade alcançam valores epidêmicos (13; 22; 27-28).

A diferenciação de adipócitos tem disso estudada, preferencialmente, em células imortalizadas de pré-adipócitos de roedores, as quais são aneuplóides, e podem não

representar a complexidade dos mecanismos encontrados em células diploides de humanos. Pré-adipócitos primários, recém isolados, também são utilizados, mas, apesar da diploidia, demonstram variabilidade doador dependente e viabilidade limitada (10). Com o objetivo de solucionar esses problemas, os efeitos da VitD foram estudados na proliferação e diferenciação de pré-adipócitos em células SGBS. Essas são de uma linhagem celular humana não imortalizada e não processada, mas com alta homogeneidade entre as passagens (15).

Confirmou-se que o modelo celular SGBS é adequado para o estudo da adipogênese, demonstrando características celulares essenciais para cada estágio, ploidia e expansão clonal. Os resultados também demonstraram que o protocolo para diferenciação induziu maturação celular e, após 16 dias, as células demonstraram um aumento significativo de lipídios intracelular, independentemente do tratamento.

Nesse estudo, foi investigado os efeitos da 1 α ,25-dihidroxitamina D3 em pré-adipócitos e adipócitos humanos SGBS, assim como durante o processo da adipogênese (proliferação e diferenciação). O estudo foi capaz de confirmar que a VitD também possui um papel na proliferação de pré-adipócitos, sendo, nesse estudo, o principal alvo. Os tratamentos com VitD demonstraram diferentes efeitos, de acordo com o estágio celular, resultando em um modo de ação diferente entre a proliferação e diferenciação. Embora o estágio de diferenciação seja bem estudado, principalmente em modelo animal *in vivo* e *in vitro*, a proliferação de pré-adipócitos é ainda pouco investigada (10).

As células foram semeadas em uma densidade pré-estabelecida, por meio do ensaio de RTCA, em um estudo piloto (Dado suplementar S1), o qual demonstrou uma taxa de proliferação apropriada para avaliação do estágio de proliferação, corroborando com os dados de Dahl (29). O presente estudo, pela primeira vez, também avaliou a proliferação

e diferenciação de pré-adipócitos humanos em tempo real usando o sistema *xCELLigence*, provando ser um ensaio capaz de mensurar alterações em pré-adipócitos durante a adipogênese e a ação do tratamento com VitD (Figura S8).

Em pré-adipócitos, tratamentos com VitD induziram parada de ciclo celular em G1, com consequente diminuição na porcentagem da população celular na fase S, em ambas as concentrações, sem alteração na expressão do gene *CDKN1A (P21)*. A parada no ciclo celular foi acompanhada de diminuição no metabolismo mitocondrial e concentração de lipídios, no tratamento VitD 100nM, e alterações na morfologia celular poderiam explicar o aumento na superfície celular, com consequente aumento no ICN. Além disso, o aumento no ICN e a diminuição no metabolismo mitocondrial, não foram induzidos por alterações na proliferação ou apoptose/morte celular, especialmente confirmado pela expressão gênica que não demonstrou alterações na expressão das caspases (*CASP3* e *CASP9*) enquanto o gene *BCL2* apresentou significativo aumento na expressão, para VitD 100nM. Ademais, foi demonstrado que pré-adipócitos humanos também expressam *VDR*, embora isso pareça ocorrer somente para altas doses de VitD, que também induziu *C/EBP α* e *C/EBP β* , com diminuição da regulação gênica, não significativamente, de *PPAR γ* .

Durante o estágio de diferenciação, pouco efeito da VitD foi observado, incluindo expressão gênica do *VDR* e *PPAR γ* , embora *C/EBP α* apresentou um aumento na regulação gênica. Em adição, foi observado que o ICN estava aumentado para VitD 100nM, sem qualquer alteração no metabolismo mitocondrial. Adipócitos diferenciados demonstraram ser menos sensíveis ao tratamento com VitD, como esperado, e isso pode ser um resultado da conhecida diminuição da expressão do *VDR* em adipócitos (11).

A habilidade da VitD em induzir parada de crescimento celular é conhecida em células de câncer, como células de câncer de ovário, próstata, mama e gástrico (30-33), mas é a

primeira vez que a parada de ciclo celular induzida pela VitD é demonstrada em pré-adipócitos humanos.

Pré-adipócitos humanos são células do tipo fibroblasto e consistem em 15-50% das células do tecido adiposo (15; 34-35). O principal papel dos pré-adipócitos é diferenciar-se em adipócitos maduros funcionais para melhorar a sensibilidade a insulina e evitar o armazenamento de gordura ectópica, relacionada com resistência à insulina, síndrome metabólica e doenças cardiovasculares (36). Obesidade e envelhecimento são responsáveis por induzir senescência em pré-adipócitos, através do estresse celular e excesso de replicação, respectivamente, conduzindo à uma diminuição na adipogênese e à um perfil pró-inflamatório (34).

Senescência celular é um estado essencialmente permanente, quando sem manipulação experimental, de parada da proliferação em resposta à diversos estímulos para prevenir a proliferação de células com dano e estressadas, enquanto permanecem metabolicamente ativas e secretando diversas proteínas, incluindo interleucinas e quimiocinas (37-38). O principal marcador para senescência celular é a parada no ciclo celular, normalmente na fase G1, e, devido à sua inabilidade de continuar no ciclo celular, acompanhada pela diminuição de células na fase S (10; 37). Além disso, especialmente para fibroblastos, a parada no ciclo é acompanhada de resistência à apoptose e alterações na expressão gênica, especialmente de genes ligados ao ciclo celular como *CDKN1A (P21)* e *CDKN2A (P16)*, embora o mecanismo também possa ser independente desses genes (37), conforme encontrado no estudo.

A diminuição nos valores de absorbância demonstra uma diminuição no metabolismo mitocondrial, já que a absorbância não estava relacionada com morte/apoptose ou diminuição na proliferação celular. Como a redução do sal de tetrazólio (MTT) é NADH e NAD(P)H dependente, uma diminuição na atividade metabólica é

acompanhada por uma taxa de redução comprometida, e senescência, embora mantenha a atividade metabólica, usualmente apresenta uma diminuição nas taxas metabólicas (19), como verificado pela incapacidade de incorporação de lipídios nos pré-adipócitos tratados com VitD 100nM. Com base nesse mecanismo, o aumento no ICN é também resultado de uma possível senescência celular, onde alterações em genes da matriz extracelular (ECM) e o aumento da massa celular, particularmente organelas, são característicos desse estado celular (38-39). Ademais, foi possível observar uma sutil diferença na morfologia entre células tratadas com VitD e os controles, enquanto a diferença na fluorescência foi mais pronunciada.

Embora os resultados demonstrem ser compatíveis com a senescência celular, em pré-adipócitos, não foi observado alterações na expressão gênica do *CDKN1A* (*P21*). No entanto, Narvaez et al. (13), após tratamento de pré-adipócitos humanos primários derivados de células tronco (hASC) com VitD 10nM, observou uma redução na proliferação e, após análises em sua lista de genes, observou-se que *RASSF2* (*fold change*= 2,15) e *IER3* (*fold change* = -3.14) apresentavam-se diferentemente expressos, comparados com o tratamento veículo. *RASSF2* é um gene da família das oncoproteínas Ras, responsável por promover parada de ciclo celular e apoptose (40).

A indução da senescência celular também ocorre em resposta à ativação de oncogenes, classificada como senescência induzida por oncogenes (OIS). *C/EBPβ* possui um papel crucial na OIS e é reprimido por *C/EBPγ*, na ausência de *C/EBPα* (41-42). Durante o aumento na expressão de *C/EBPβ* e *C/EBPα*, os genes que regulam a transição G1-S são silenciados (43). Sendo que, um aumento no nível de sinalização de Ras tem sido demonstrado ser essencial para a manutenção da expressão de *C/EBPβ* e parada do ciclo celular (44). Também, *IER3*, um gene alvo da VitD com ação apoptótica e de progressão do ciclo celular, apresentou baixa regulação em Narvaez et al. (13; 45-46).

485 Além disso, a expressão de *VDR* parece ter ação sobre esses genes.

486 Com base no delineamento experimental, não foi possível confirmar estudos prévios

487 que relatavam um aumento da diferenciação em pré-adipócitos humanos tratados com

488 VitD (13; 28), especialmente devido ao fato de não ter se observado qualquer alteração

489 gênica nesse estágio. Contudo, realizou-se um tratamento contínuo a partir do estágio de

490 pré-adipócitos e desde o T0h, e o mais pronunciado efeito foi observado no tratamento a

491 partir de pré-adipócitos, o qual VitD 100nM demonstrou os mesmos efeitos no

492 metabolismo mitocondrial do que o tratamento único em pré-adipócitos.

493 Mitterberger et al. (47) confirmaram que o coquetel adipogênico foi capaz de induzir a

494 diferenciação em hASC senescentes, embora a expressão gênica estava diminuída,

495 comparada com células normais, corroborando com os resultados apresentados, já que o

496 coquetel adipogênico foi capaz de induzir diferenciação de pré-adipócitos previamente

497 tratados com VitD, e provavelmente senescentes, enquanto aumentou as gotículas de

498 gordura após a diferenciação. A quantificação de triglicerídeos intracelular estava em

499 concordância com a atividade metabólica, demonstrando que a maior concentração de

500 VitD apresentava menor quantidade de lipídios do que o tratamento com VitD 10nM.

501 Em adição, os resultados não desqualificam o mecanismo de senescência proposto, já

502 que as gotículas de lipídios estão relacionadas com a via de sinalização da insulina, a

503 qual a VitD tem demonstrado aumentar, além de ser um dos hormônios utilizados para

504 indução e manutenção de adipócitos diferenciados (47).

505 Pela primeira vez, foi demonstrado que a VitD induziu parada de ciclo celular, sendo

506 que, com base nesses resultados, e em dados de *microarray* disponíveis publicamente, é

507 possível concluir que essa parada pode ser resultado de um estado de senescência

508 celular. Além disso, foi proposto um mecanismo pelo qual a VitD pode agir em pré-

509 adipócitos. Os pré-adipócitos são células importantes para a homeostase corporal e

entender o papel da VitD nestes, é um passo essencial para assegurar a suplementação de VitD para todos os indivíduos, incluindo indivíduos obesos. Mais estudos são necessários em pré-adipócitos humanos tratados com VitD para confirmar os mecanismos propostos e descobrir o exato modo de ação da vitamina D no tecido adiposo.

AGRADECIMENTOS

Suporte financeiro da CAPES e CNPq.

REFERÊNCIAS

1-Drezner MK, Harrelson JM. Newer knowledge of vitamin D and its metabolites in health and disease. Clin Orthop Relat Res 1979; 139: 206-31.

2-Whitfield GK, Hsieh JC, Jurutka PW, Selznick SH, Haussler CA, MacDonald PN, et al. Genomic actions of 1,25-dihydroxyvitamin D3. J Nutr 1995; 125(6):1690S-1694S.

3-Carlberg C, Molnar F. Current Status of Vitamin D Signaling and Its Therapeutic Applications. Curr Top Med Chem 2012; 12(6): 528-47.

4-Wood RJ. Vitamin D and adipogenesis: new molecular insights. Nutr Rev 2008; 66(1): 40-46.

5-Kamei Y, Kawada T, Kazuki R, Ono T, Kato S, Sugimoto E. Vitamin D receptor gene expression is up-regulated by 1, 25-dihydroxyvitamin D3 in 3T3-L1 preadipocytes. Biochem Biophys Res Commun 1993; 193(3): 948-55.

6-Marcotorchino J, Tourniaire F, Landrier JF. Vitamin D, adipose tissue, and obesity. Horm Mol Biol Clin Investig 2013; 15(3): 123-8.

7-Didriksen A, Burild A, Jakobsen J, Fuskevåg OM, Jorde R. Vitamin D3 increases in abdominal subcutaneous tissue after supplementation with vitamin D3. Eur J Endocrinol 2015; 172(3): 235-41.

8-Chawla A, Nguyen KD, Goh YP. Macrophage-mediated inflammation in metabolic

- disease. *Nat Rev Immunol* 2011; 11(11): 738-49.
- 9-Moreno-Navarrete JM, Fernández-Real JM. *Adipose tissue biology: Adipocyte differentiation*. Springer New York 2012: 17-28.
- 10-Alvarez MS, Fernandez-Alvarez A, Cucarella C, Casado M. Stable SREBP 1a knockdown decreases the cell proliferation rate in human preadipocyte cells without inducing senescence. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 447(1): 51-6.
- 11-Lahnalampi M, Heinäniemi M, Sinkkonen L, Wabitsch M, Carlberg C. Time-resolved expression profiling of the nuclear receptor superfamily in human adipogenesis. *PLoS One* 2010; 5(9): e12991.
- 12-Clemente-Postigo M, Muñoz-Garach A, Serrano M, Garrido-Sánchez L, Bernal-López MR, Fernández-García D, Moreno-Santos I, Garriga N, Castellano-Castillo D, Camargo A, Fernández-Real JM, Cardona F, Tinahones FJ, Macías-González M Serum 25-Hydroxyvitamin D and Adipose Tissue Vitamin D Receptor Gene Expression: Relationship With Obesity and Type 2 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015; 100(4):E591-5.
- 13-Narvaez CJ, Simmons KM, Brunton J, Salinero A, Chittur SV, Welsh JE. Induction of STEAP4 correlates with 1,25-dihydroxyvitamin D3 stimulation of adipogenesis in mesenchymal progenitor cells derived from human adipose tissue. *J Cell Physiol* 2013; 228(10): 2024-36.
- 14-Fischer-Posovszky P, Newell FS, Wabitsch M, Tornqvist HE. Human SGBS cells - a unique tool for studies of human fat cell biology. *Obes Facts* 2008; 1(4):184-9.
- 15-Wabitsch M, Brenner RE, Melzner I, Braun M, Möller P, Heinze E, et al.. Characterization of a human preadipocyte cell strain with high capacity for adipose differentiation. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001; 25(1): 8-15.
- 16-Kramer AH, Joos-Vandewalle J, Edkins AL, Frost CL, Prinsloo E. Real-time

560 monitoring of 3T3-L1 preadipocyte differentiation using a commercially available
561 electric cell-substrate impedance sensor system. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;
562 443(4): 1245-50.

563 17-Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application
564 to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65 (1-2): 55-63.

565 18- Savio AL, da Silva GN, de Camargo EA, Salvadori DM. Cell cycle kinetics,
566 apoptosis rates, DNA damage and TP53 gene expression in bladder cancer cells treated
567 with allyl isothiocyanate (mustard essential oil). *Mutation research. Fundamental and*
568 *molecular mechanisms of mutagenesis* 2014; 762: 40-46.

569 19-Baranoski A, Tempesta Oliveira M, Semprebon SC, Niwa AM, Ribeiro
570 LR, Mantovani MS. Effects of sulfated and non-sulfated β -glucan extracted from
571 *Agaricus brasiliensis* in breast adenocarcinoma cells - MCF-7. *Toxicol Mech*
572 *Methods* 2015; 13: 1-8.

573 20-Felicidade I, Marcarini JC, Carreira CM, Amarante MK, Afman LA, Mantovani
574 MS, et al. Changes in gene expression in PBMCs profiles of PPAR α target genes in
575 obese and non-obese individuals during fasting. *Ann Nutr Metab* 2015; 66(1): 19-25.

576 21-Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST $\circledR$) for
577 group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time
578 PCR. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: e36.

579 22-Holick MF. The vitamin D epidemic and its health consequences. *J Nutr* 2005;
580 135(11): 2739S-48S.

581 23- Pourshahidi LK. Vitamin D and obesity: current perspectives and future directions.
582 *Proc Nutr Soc* 2015; 74(2): 115-24.

583 24-Vimaleswaran KS, Berry DJ, Lu C, Tikkanen E, Pilz S, Hiraki LT, et al. Causal
584 relationship between obesity and vitamin D status: bi-directional Mendelian

- 585 randomization analysis of multiple cohorts. PLoS Med 2013; 10(2): e1001383.
- 586 25-Wortsman J, Matsuoka LY, Chen TC, Lu Z, Holick MF. Decreased bioavailability
587 of vitamin D in obesity. Am J Clin Nutr 2000; 72(3): 690-3.
- 588 26-Drincic AT, Armas LA, Van Diest EE, Heaney RP. Volumetric dilution, rather than
589 sequestration best explains the low vitamin D status of obesity. Obesity (Silver
590 Spring) 2012; 20(7): 1444-8.
- 591 27-Wamberg L, Christiansen T, Paulsen SK, Fisker S, Rask P, Rejnmark L, et al..
592 Expression of vitamin D-metabolizing enzymes in human adipose tissue -- the effect of
593 obesity and diet-induced weight loss. Int J Obes (Lond) 2013; 37(5): 651-7.
- 594 28-Nimitphong H, Holick MF, Fried SK, Lee MJ. 25-hydroxyvitamin D₃ and 1,25-
595 dihydroxyvitamin D₃ promote the differentiation of human subcutaneous preadipocytes.
596 PLoS One 2012; 7(12): e52171.
- 597 29-Dahl RC. Establishment of an adipocyte cell-based model to investigate the effect of
598 short-chain fatty acids, especially butyrate, on insulin sensitivity and glucose
599 homeostasis in fat tissue. Thesis - Aarhus University, Faculty of Science and
600 Technology, Department of Animal Science, Denmark, 2013.
- 601 30-Zhang Z, Zhang H, Hu Z, Wang P, Wan J, Li B. Synergy of 1,25-dihydroxyvitamin
602 D₃ and carboplatin in growth suppression of SKOV-3 cells. Oncol Lett 2014; 8(3):
603 1348-1354.
- 604 31-Li HX, Gao JM, Liang JQ, Xi JM, Fu M, Wu YJ. Vitamin D₃ potentiates
605 the growth inhibitory effects of metformin in DU145 human prostate cancer cells
606 mediated by AMPK/mTOR signalling pathway. Clin Exp Pharmacol Physiol 2015;
607 42(6): 711-7.
- 608 32-Pickholtz I, Saadyan S, Keshet GI, Wang VS, Cohen R, Bouwman P, et al..
609 Cooperation between BRCA1 and vitamin D is critical for histone acetylation of the

- 610 p21waf1 promoter and growth inhibition of breast cancer cells and cancer stem-like
611 cells. *Oncotarget* 2014; 5(23): 11827-46.
- 612 33-Bao A, Li Y, Tong Y, Zheng H, Wu W, Wei C. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ and
613 cisplatin synergistically induce apoptosis and cell cycle arrest in gastric cancer cells. *Int*
614 *J Mol Med* 2014; 33(5): 1177-84.
- 615 34-Tchkonia T, Morbeck DE, Von Zglinicki T, Van Deursen J, Lustgarten J, Scrable H,
616 et al. Fat tissue, aging, and cellular senescence. *Aging Cell* 2010; 9(5): 667-84.
- 617 35-Ali AT, Hochfeld WE, Myburgh R, Pepper MS. Adipocytes and adipogenesis. *Eur J*
618 *Cell Biol* 2013; 92(6-7): 229-36.
- 619 36-Zamboni M, Rossi AP, Fantin F, Zamboni G, Chirumbolo S, Zoico E, et al. Adipose
620 tissue, diet and aging. *Mech Ageing Dev* 2014; 136-137: 129-37.
- 621 37-Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to
622 good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8(9): 729-40.
- 623 38-Pawlikowski JS, Adams PD, Nelson DM. Senescence at a glance. *J Cell Sci* 2013;
624 126(Pt 18): 4061-7.
- 625 39-Kim YM, Shin HT, Seo YH, Byun HO, Yoon SH, Lee IK, et al. Sterol regulatory
626 element-binding protein (SREBP)-1-mediated lipogenesis is involved in
627 cell senescence. *J Biol Chem* 2010; 285(38): 29069-77.
- 628 40-Vos MD, Ellis CA, Elam C, Ulku AS, Taylor BJ, Clark GJ. RASSF2 is a novel K-
629 Ras specific effector and potential tumor suppressor. *J Biol Chem* 2003; 278(30):
630 28045-51.
- 631 41-Alberich-Jordà M, Wouters B, Balastik M, Shapiro-Koss C, Zhang H, Di Ruscio
632 A, et al. C/EBP γ deregulation results in differentiation arrest in acute myeloid leukemia.
633 *J Clin Invest* 2012; 122(12): 4490-504.
- 634 42-Huggins CJ, Malik R, Lee S, Salotti J, Thomas S, Martin N, et al. C/EBP γ

- 635 Suppresses Senescence and Inflammatory Gene Expression by Heterodimerizing with
636 C/EBP β . Mol Cell Biol 2013; 33(16): 3242-58.
- 637 43-Sebastian T, Johnson PF. Stop and Go: Anti-Proliferative and Mitogenic Functions
638 of the Transcription Factor C/EBP β . Cell Cycle 2006; 5(9): 953-7.
- 639 44-Lee S, Shuman JD, Guszczynski T, Sakchaisri K, Sebastian T, Copeland TD, et al.
640 RSK-Mediated Phosphorylation in the C/EBP β Leucine Zipper Regulates DNA
641 Binding, Dimerization, and Growth Arrest Activity. Mol Cell Biol 2010; 30(11): 2621-
642 35.
- 643 45- Kumar R, Pittelkow MR, Salisbury JL, Grande JP, Im HJ, Feldmann KA, et al. A
644 Novel Vitamin D-Regulated Immediate-Early Gene, IEX-1, Alters Cellular Growth and
645 Apoptosis. Recent Results Cancer Res 2003; 164: 123-34.
- 646 46-Ravaud C, Esteve D, Villageois P, Bouloumie A, Dani C, Ladoux A. IER3 Promotes
647 Expansion of Adipose Progenitor Cells in Response to Changes in Distinct
648 Microenvironmental Effectors. Stem Cells 2015; 33(8): 2564-73.
- 649 47-Mitterberger MC, Lechner S, Mattesich M, Zwerschke W. Adipogenic
650 Differentiation Is Impaired in Replicative Senescent Human Subcutaneous Adipose-
651 Derived Stromal/Progenitor Cells. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 2014; 69(1): 13-24.

INFORMAÇÃO SUPLEMENTAR

Dado suplementar S1

Ensaio de titulação

A fim de se obter uma densidade celular ideal para os experimentos, onde a presença de, pelo menos, um ciclo celular completo durante o período de proliferação, no estágio de pré-adipócitos, foi requerido, o ensaio de titulação em tempo real foi realizado (*xCELLigence* RTCA, Roche).

A titulação foi realizada com densidades celulares seriadas, a partir de 6000 a 1000 células (6000, 3000 e 1500 células; 5000, 2500 e 1250 células, e 4000, 2000 e 1000 células), usando *E-plates* (Roche), na presença e ausência da solução de adesão, como descrito abaixo.

Para o ensaio da titulação, o sistema RTCA *xCELLigence* foi inicializado, de acordo com as orientações do fabricante. Antes do início do experimento, foi adicionado 100 µL de meio de cultura de crescimento, em cada poço da *E-plate*, a qual foi colocada na estação de placa única, alocada em uma estufa de cultura celular umidificada a 37°C com 5% CO₂ atmosférico (Ultrasafe HF 212 UV), para estabelecimento da leitura basal. O procedimento foi realizado subsequentemente ao tratamento dos poços designados à solução de adesão, por 30 min.

Células foram contadas e a viabilidade avaliada por meio do azul de tripano (Countess®, Invitrogen), e semeada de acordo com as densidades propostas, por poço, em alíquotas de 100 µL, em triplicata. Foi esperado 30 min, fora da estufa, para sedimentação celular, antes de retornar a *E-plate* à estação de placa única. A proliferação celular foi monitorada através da avaliação da impedância elétrica usando o índice celular (IC), por 72h. Onde, após 24h de estabilização, as próximas 48h foram mensuradas. Os valores de IC foram, também, utilizados para calcular o *doubling time* teórico do experimento, embora esses valores possam ser afetados por propriedades da célula, como adesão, motilidade e mudanças morfológicas (1).

O objetivo do experimento foi encontrar uma densidade celular que apresentasse um IC médio maior do que 1,0 (2) com, pelo menos, um ciclo celular completo, durante o tempo avaliado.

Na primeira hora do experimento, os valores de IC estavam significativamente diferentes entre os poços tratados com solução de adesão, comparados com os não tratados, excluindo a densidade de 4000 células/poço (Figura 1A). Após 24h, período denominado estabilização, não foi encontrada diferenças entre os poços com a presença ou ausência de solução de adesão (Figura 1B). Dessa forma, as análises seguintes foram realizadas fundindo o IC de ambas as situações avaliadas, e então selecionou-se o IC médio superior a 1,0 (Figura 1C).

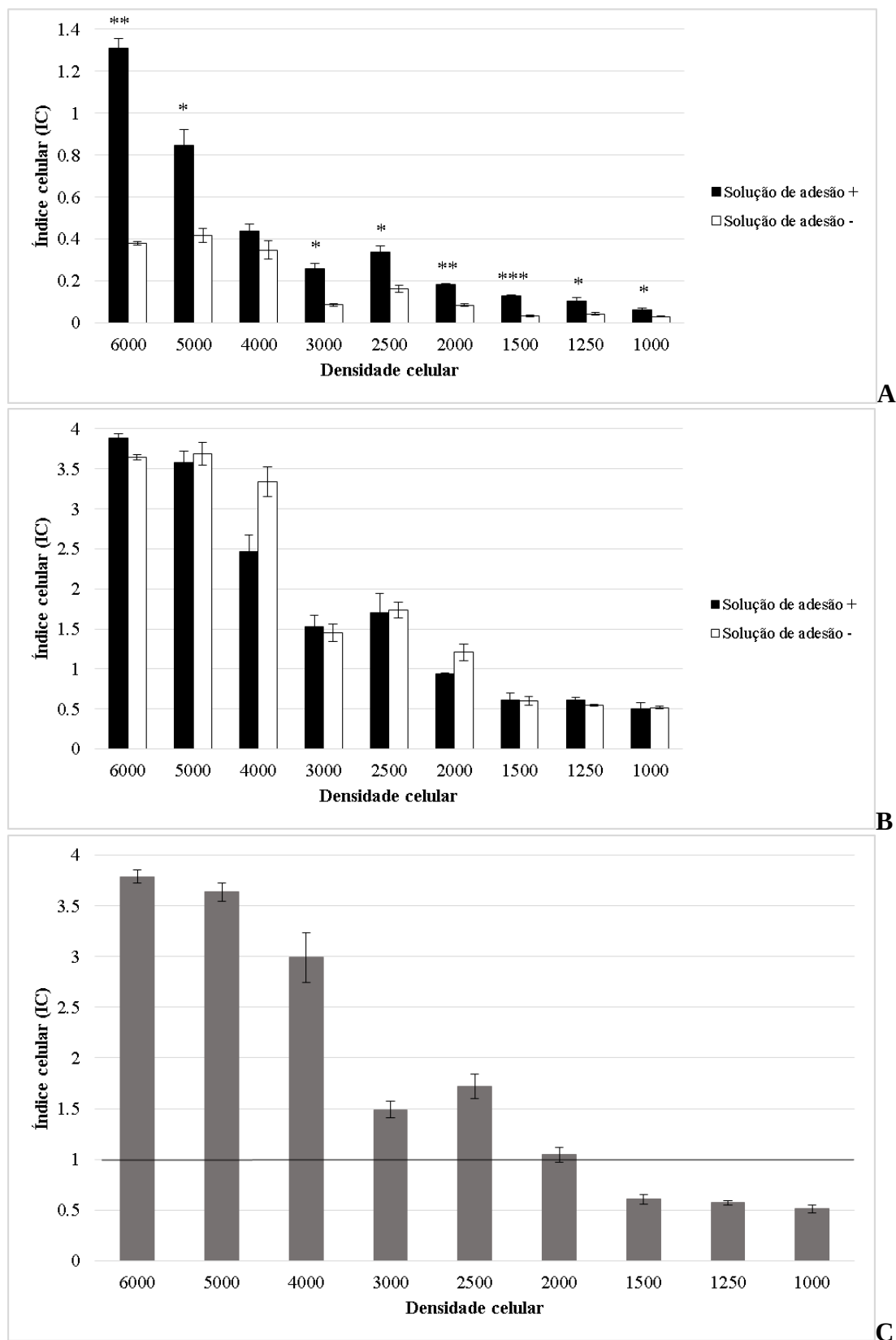


Figura 1 – Índice celular para diferentes densidades celulares. (A) IC após 1h e (B) após 24h de experimento, na presença (+) ou ausência (-) de solução de adesão. (C) IC associado, entre presença ou ausência de solução de adesão, após 24h de experimento. Os dados estão apresentados como Média $\pm$ SEM. (A)(B) Teste t de Student foi realizado para testar as diferenças entre as culturas de SGBS semeadas na presença ou

ausência de solução de adesão. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$.

A partir da análise do *doubling time* das densidades selecionadas, a densidade de 2000 células/poço foi escolhida, baseada no *doubling time* médio de 48.20h (Tabela 1), em adição ao perfil de curva da proliferação que demonstrou crescimento exponencial mesmo após 72h de experimento, enquanto nas densidades maiores o perfil de curva começava a decair (Figura 2).

Tabela 1 - Média do *doubling time* para diferentes densidades celulares.

Densidade celular	<i>Doubling time</i> (h)	
	Média $\pm$ SD	
6000	121.82	3.89
5000	86.94	2.03
4000	91.91	1.86
3000	50.03	0.29
2500	52.56	0.36
2000	48.20	0.44

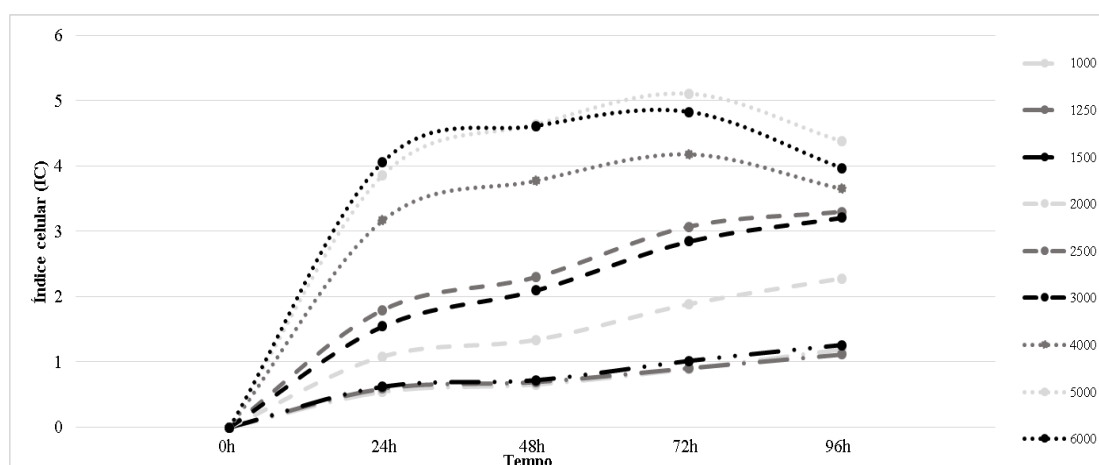


Figura 2 – Curva de proliferação em pré-adipócitos humanos SGBS, em diferentes densidades celulares, durante 96h de experimento

A literatura aponta (2-3) que o tratamento da superfície de cultura celular com soluções de adesão favorece a proliferação celular. Observou-se uma maior eficiência, no que tange a adesão celular, também em pré-adipócitos SGBS, sendo indispensável para experimentos que realizam tratamentos concomitantemente a semeadura celular, o tratamento prévio com solução de adesão. Contudo, salienta-se que após 24h de estabilização celular, nenhuma diferença foi encontrada.

REFERÊNCIAS

1-Atienzar FA, Tilmant K, Gerets HH, Toussaint G, Speeckaert S, Hanon E, Depelchin O, Dhalluin S. The use of real time cell analyzer technology in drug discovery: defining optimal cell culture conditions and assay reproducibility with different adherent cellular models. J Biomol Screen. 2011; 16(6): 575-87.

2-Kramer AH, Joos-Vandewalle J, Edkins AL, Frost CL, Prinsloo E. Real-time

monitoring of 3T3-L1 preadipocyte differentiation using a commercially available electric cell-substrate impedance sensor system. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014; 443(4): 1245-50.

3-Martinez-Serra J, Gutierrez A, Muñoz-Capó S, Navarro-Palou M, Ros T, Amat JC, Lopez B, Marcus TF, Fueyo L, Suquia AG, Gines J, Rubio F, Ramos R, Besalduch J. xCELLigence system for real-time label free monitoring of growth and viability of cell lines from hematological malignancies. *Onco Targets Ther.* 2014; 7: 985-94.

Tabela suplementar S1 – Sequência dos *primers* e detalhes das condições do ciclo e temperatura de anelamento.

Gene	Forward primer (5' → 3')	Reverse primer (5' → 3')	Condições do ciclo	Temperatura de melting (T_m)
<i>VDR</i> ¹ receptor da vitamina D ENSG0000011142	AGATGACCCTTCTGTGACCC	AGCTTCTTCAGTCCCACCTG	95°C por 15s 60°C por 15s 72°C por 20s	Forward: 59°C Reverse: 59°C
<i>C/EBPα</i> ² proteína ligante do amplificador CCAAT, alfa ENSG00000245848	AGCCTTGTTTGTACTGTATG	AAAATGGTGGTTTAGCAGAG	95°C por 15s 60°C por 15s 72°C por 20s	Forward: 54.3°C Reverse: 58.3°C
<i>C/EBPβ</i> ² proteína ligante do amplificador CCAAT, beta ENSG00000172216	ATAAACTCTCTGCTTCTCCC	CCGTAGGAACATCTTTAAGC	95°C por 15s 60°C por 15s 72°C por 20s	Forward: 56.6°C Reverse: 57.9°C
<i>C/EBPδ</i> ² proteína ligante do amplificador CCAAT, delta ENSG00000221869	CAGACTTTTCAGACAAACCC	TTTCGATTTCAAATGCTGC	95°C por 15s 60°C por 15s 72°C por 20s	Forward: 58.8°C Reverse: 61.4°C
<i>PPARγ</i> ¹ receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama ENSG00000132170	CGACCAAGTAACTCTCCTCA	GTTCCGTGACAATCTGTCTG	95°C por 15s 60°C por 15s 72°C por 20s	Forward: 55°C Reverse: 57°C
<i>CAPN1</i> ² m-calpaína 1 ENSG00000014216	AGACCATGTTCCGATTTTTC	TGCAACCACTTAAACAAGTC	95°C por 15s 60°C por 15s 72°C por 20s	Forward: 60.4°C Reverse: 57.8°C
<i>BCL2</i> ² linfoma de células B2 ENSG00000171791	GATTGTGGCCTTCTTTGAG	GTTCCACAAAGGCATCC	95°C por 15s 60°C por 15s 72°C por 20s	Forward: 59.8°C Reverse: 59°C
<i>CASP3</i> ³ caspase 3 ENSG00000164305	GTGCTACAATGCCCCTGGAT	GCCCATTCAATTTATTGCTTTCC	95°C por 15s 60°C por 15s 72°C por 20s	Forward: 59.3°C Reverse: 54.2°C

<i>CASP9</i> ² caspase 9 ENSG00000132906	CTCTACTTTCCCAGGTTT	TTTCACCGAAACAGCATT	95°C por 15s 60°C por 15s 72°C por 20s	Forward: 60.4°C Reverse: 57.8°C
<i>CDKN1A (P21)</i> ² inibidor de quinase dependente de ciclina 1 ^a ENSG00000124762	CAGCATGACAGATTTCTACC	CAGGGTATGTACATGAGGAG	95°C por 15s 60°C por 15s 72°C por 20s	Forward: 57.3°C Reverse: 57°C
<i>RPL13A</i> ⁴ proteína ribossomal L13a ENSG00000142541	CCTGGAGGAGAAGAGGAAAGGA	TTGAGGACCTCTGTGTATTTGTCAA	95°C por 15s 60°C por 15s 72°C por 20s	Forward: 62°C Reverse: 63°C

¹ Lahnalampi M, Heinäniemi M, Sinkkonen L, Wabitsch M, Carlberg C. Time-resolved expression profiling of the nuclear receptor superfamily in human adipogenesis. PLoS One 2010; 5(9): e12991.

² KiCqStart™ SYBR® Green Primers, Sigma-Aldrich Co. LLC, USA.

³ Aquino I, Tsuboy MS, Marcarini JC, Mantovani MS, Perazzo FF, Maistro EL. Genotoxic evaluation of the antimalarial drugs artemisinin and artesunate in human HepG2 cells and effects on CASP3 and SOD1 gene expressions. Genetics and molecular research : GMR 2013; 12: 2517-2527.

⁴ Brandimarto, Jeffrey Alan. Molecular regulation of insulin-like growth factor binding protein-5 by signaling molecules downstream of the IGF-I receptor in mammary epithelial cells. Disponível em: <http://dx.doi.org/doi:10.7282/T32J6C4V>

Figuras

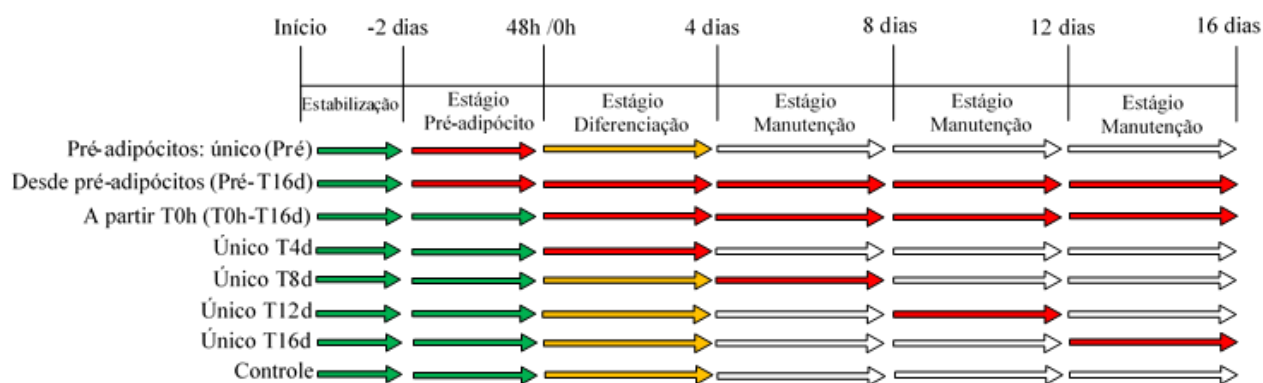


Figura suplementar S1 – Delineamento experimental RTCA. As setas indicam tratamentos, onde: verdes indicam estabilização com meio de cultura de crescimento, amarelas indicam meio de cultura de diferenciação (Quickdiff), brancas meio cultura de manutenção (3FC) e vermelhas indicam tratamento com VitD (10nM e 100nM) associado com o respectivo meio de cultura para o estágio.

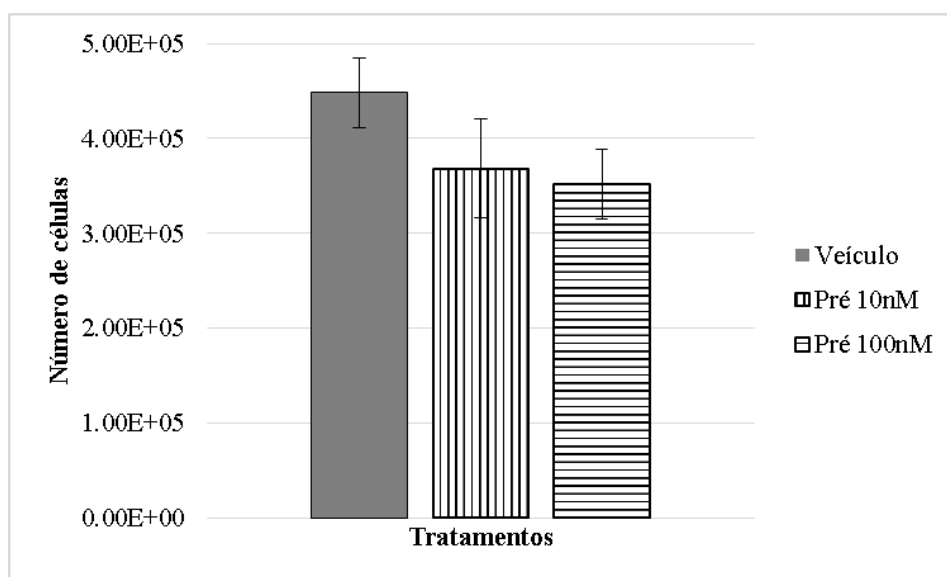
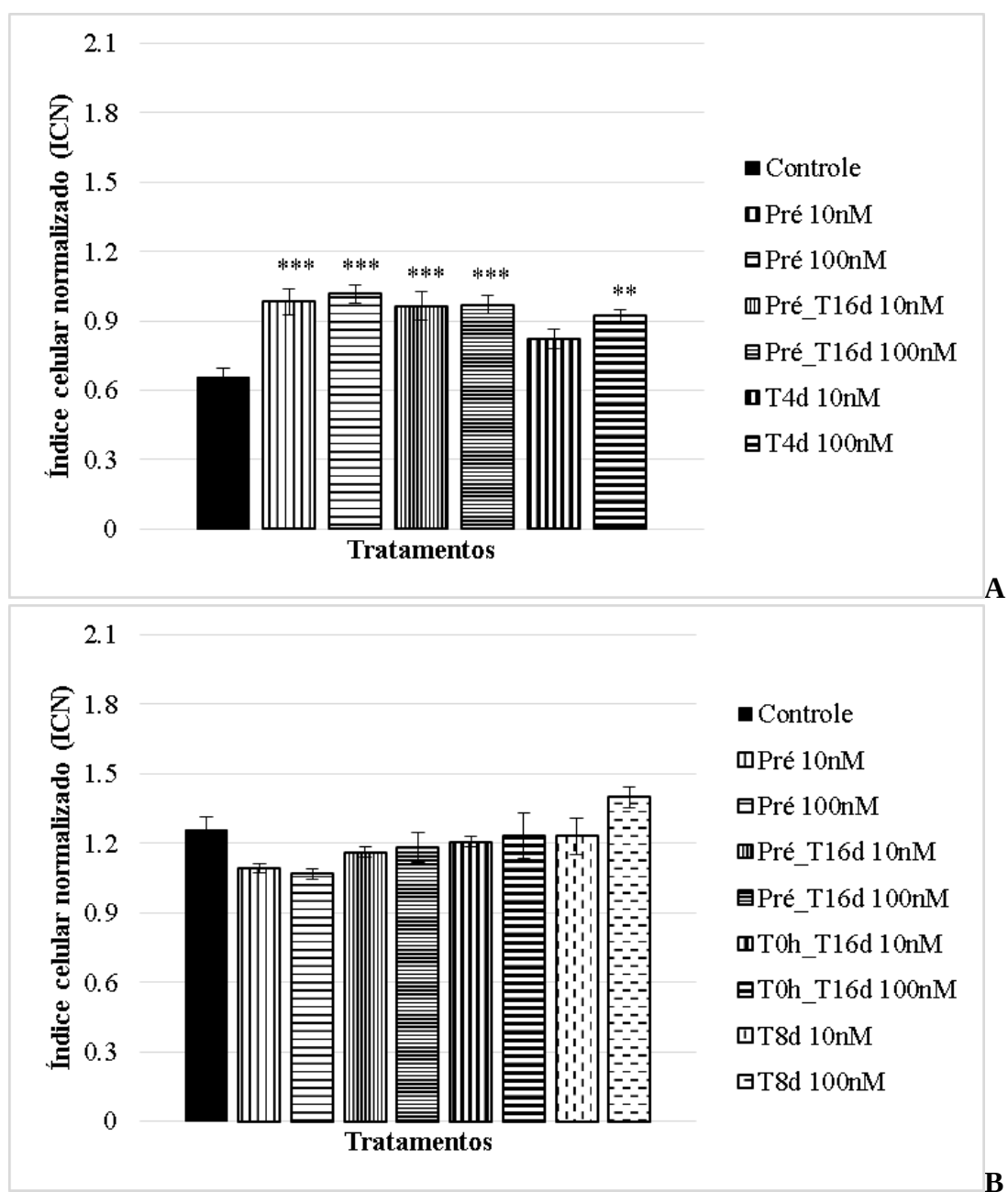


Figura suplementar S2 – Ensaio de proliferação em pré-adipócitos SGBS. Os dados estão apresentados como Média $\pm$ SEM. Análise estatística ANOVA foi utilizada para testar as diferenças significativas entre os tratamentos.



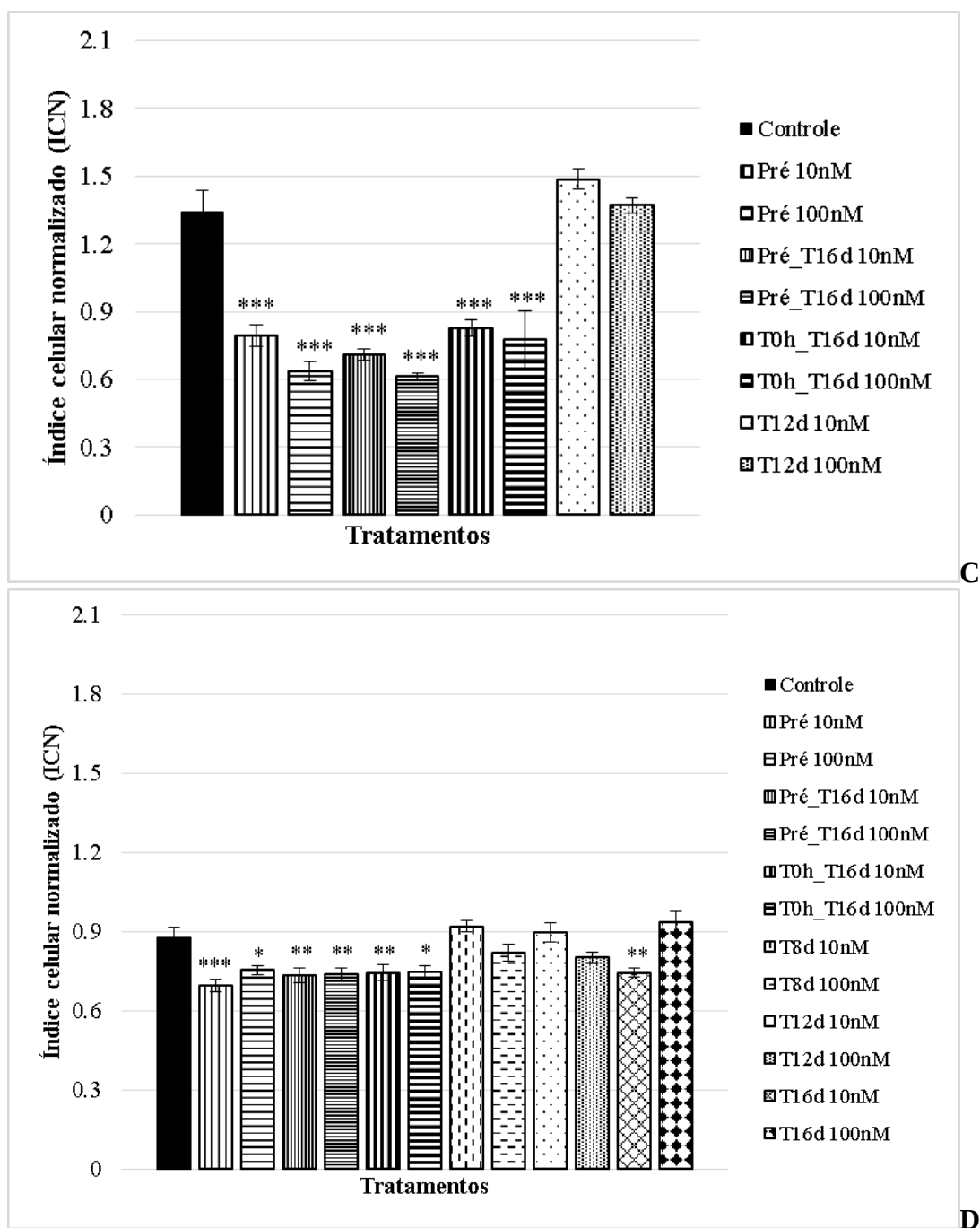


Figura suplementar S3 – Análise celular em tempo real (RTCA) em adipócitos humanos. Dados são apresentados como Média $\pm$ SEM, em adipócitos (A) 4 dias, (B) 8 dias, (C) 12 dias e (D) 16 dias após a diferenciação. Análise estatística ANOVA foi utilizada para testar as diferenças significativas entre os tratamentos, seguida por Dunnet para comparação com o controle. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

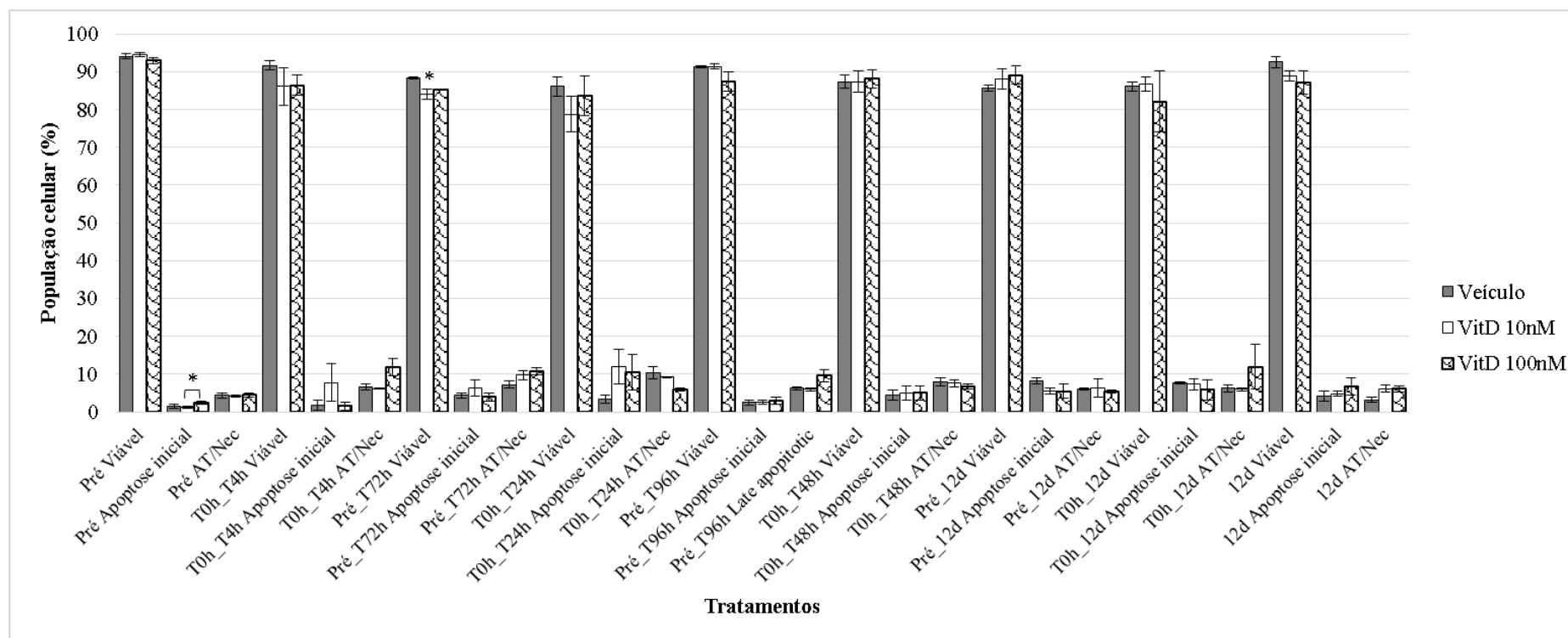


Figura suplementar S4 – Análise de apoptose celular por citometria de fluxo. Dados são apresentados como Média $\pm$ SEM. Análise estatística ANOVA foi utilizada para testar as diferenças significativas entre os tratamentos, seguida por Dunnet para comparação com o veículo. Teste t de Student foi realizado para testar as diferenças entre os tratamentos com VitD 10nM e 100nM. * $p < 0,05$. AT: Apoptose tardia; Nec: Necrose.

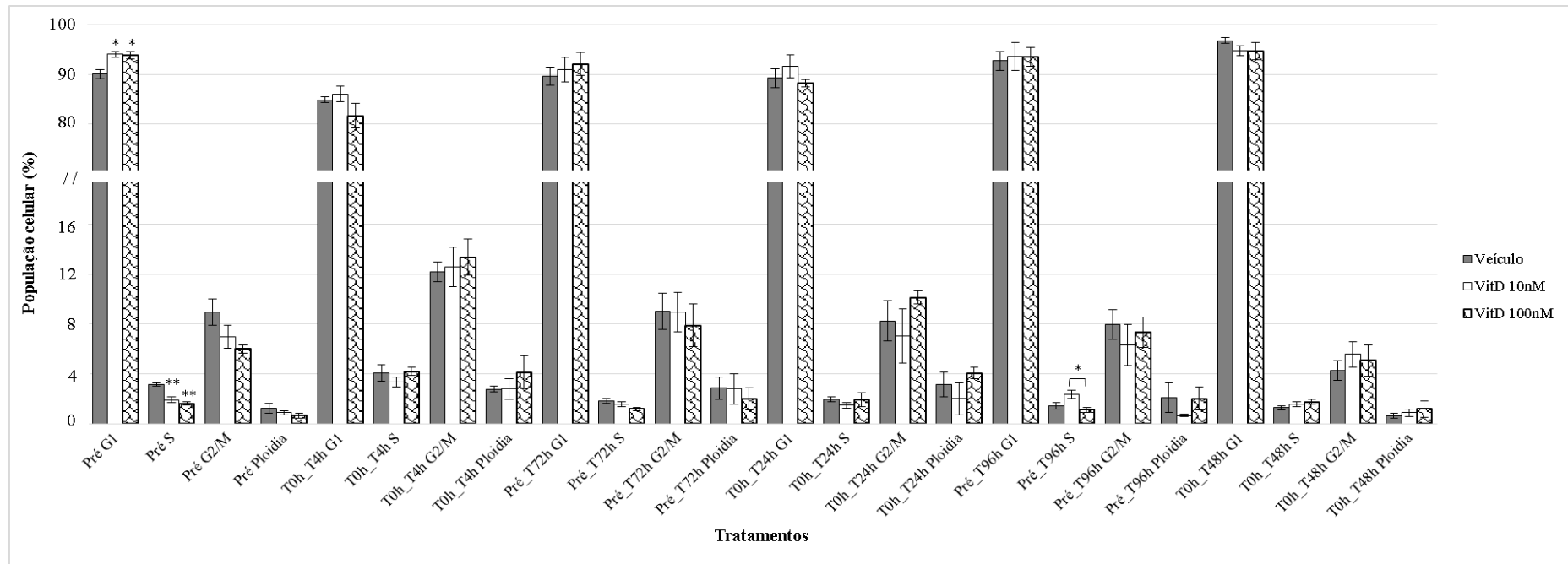
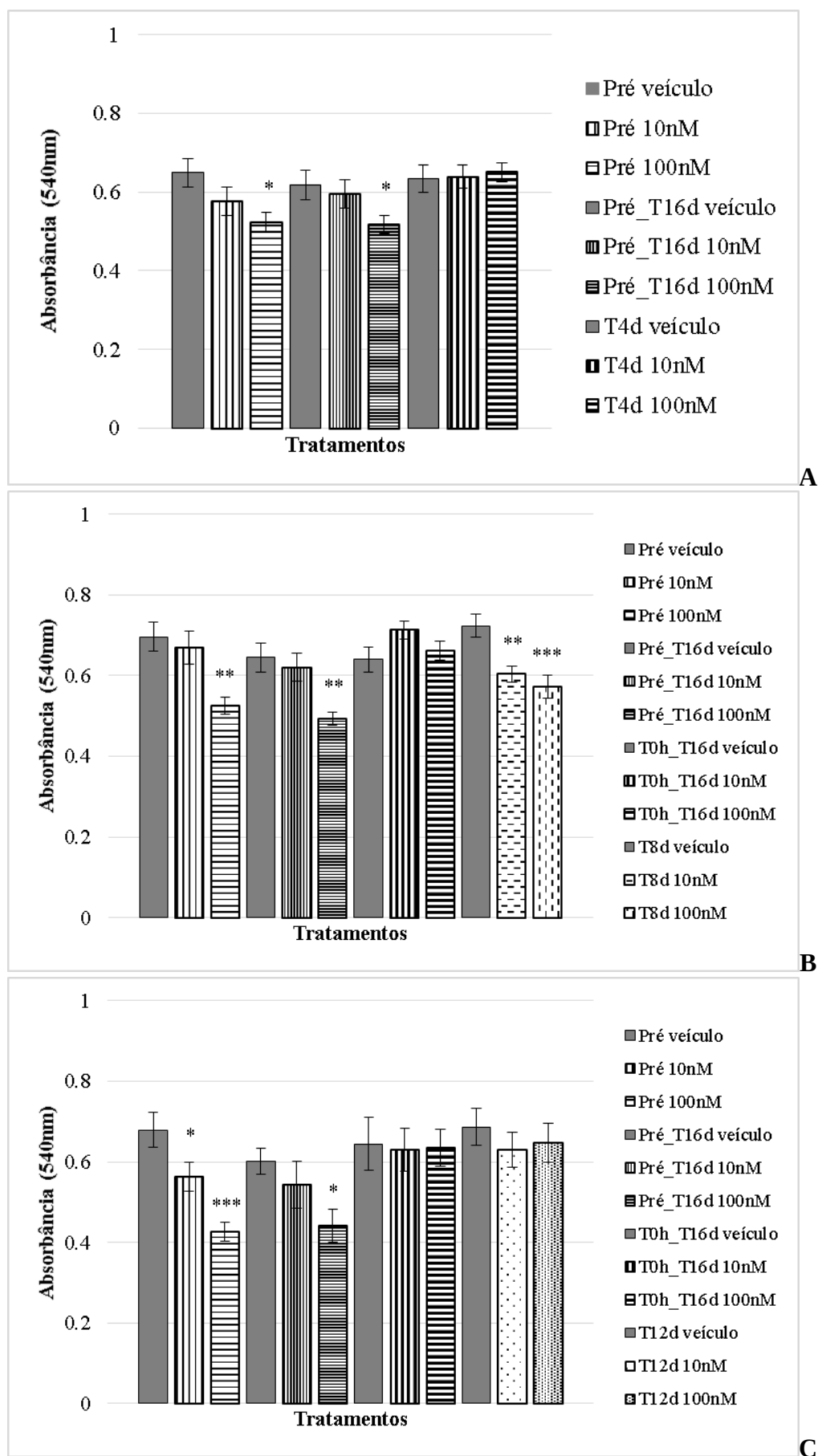


Figura suplementar S5 - Análise de ciclo celular por citometria de fluxo. Dados são apresentados como Média $\pm$ SEM. Análise estatística ANOVA foi utilizada para testar as diferenças significativas entre os tratamentos, seguida por Dunnet para comparação com o veículo. Teste t de Student foi realizado para testar as diferenças entre os tratamentos com VitD 10nM e 100nM. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.



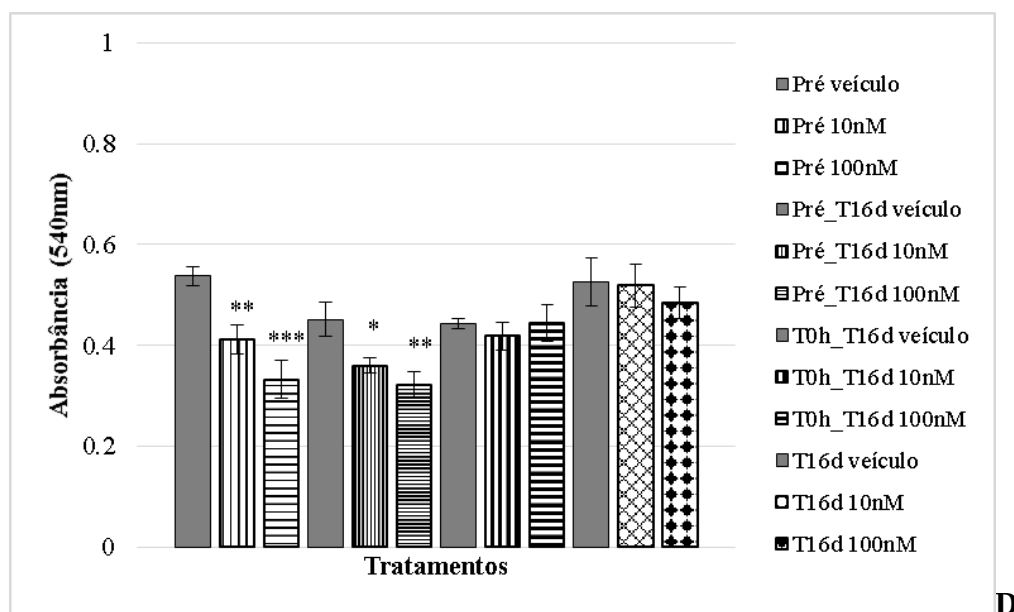


Figura suplementar S6 – Análise de metabolismo mitocondrial, via MTT, em adipócitos SGBS. Os dados são apresentados como Média ± SEM, em adipócitos (A) 4 dias, (B) 8 dias, (C) 12 dias e (D) 16 dias após a diferenciação. Análise estatística ANOVA foi utilizada para testar as diferenças significativas entre os tratamentos, seguida por Dunnet para comparação com o veículo. * $p<0,05$, ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$.

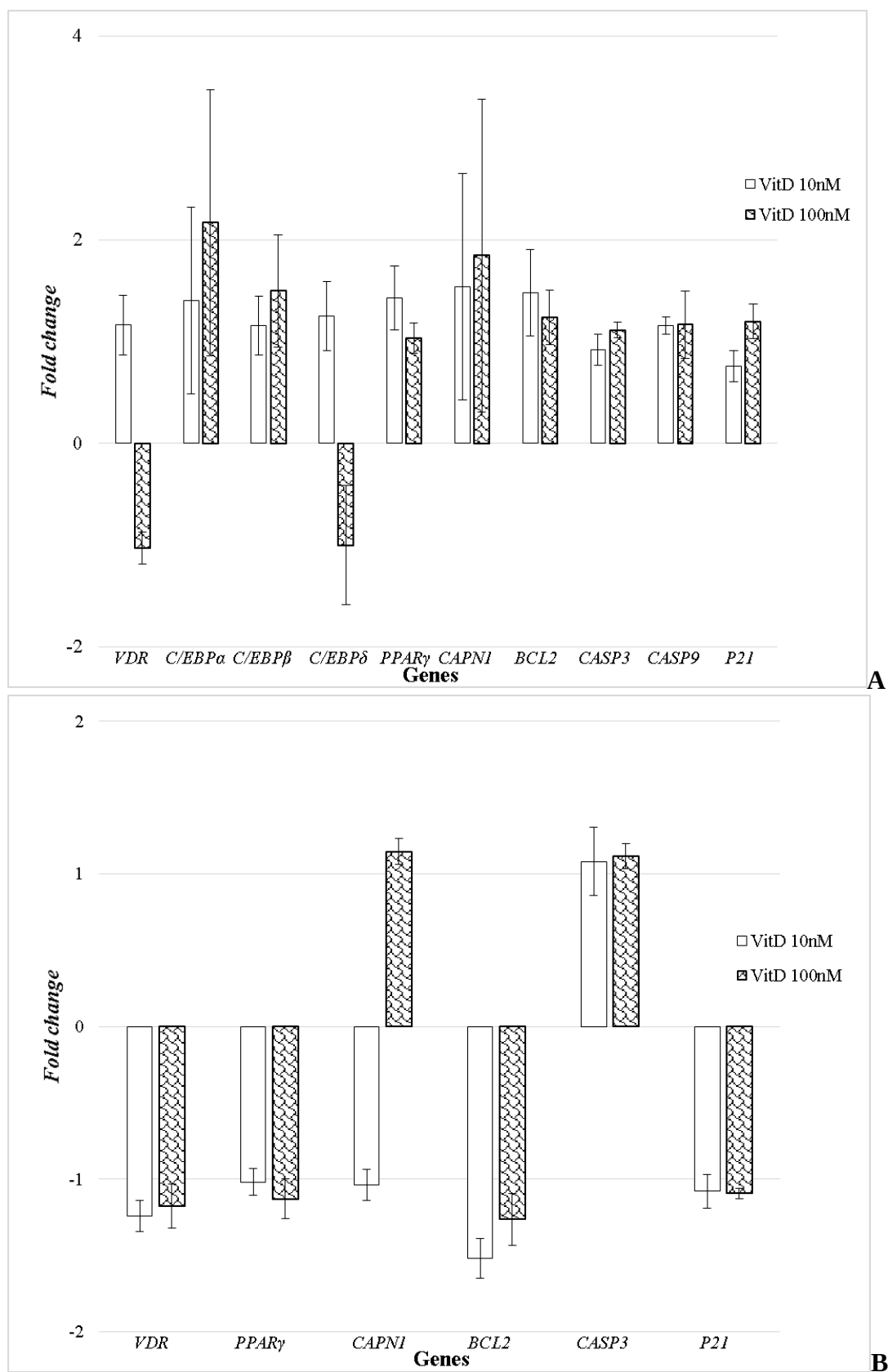
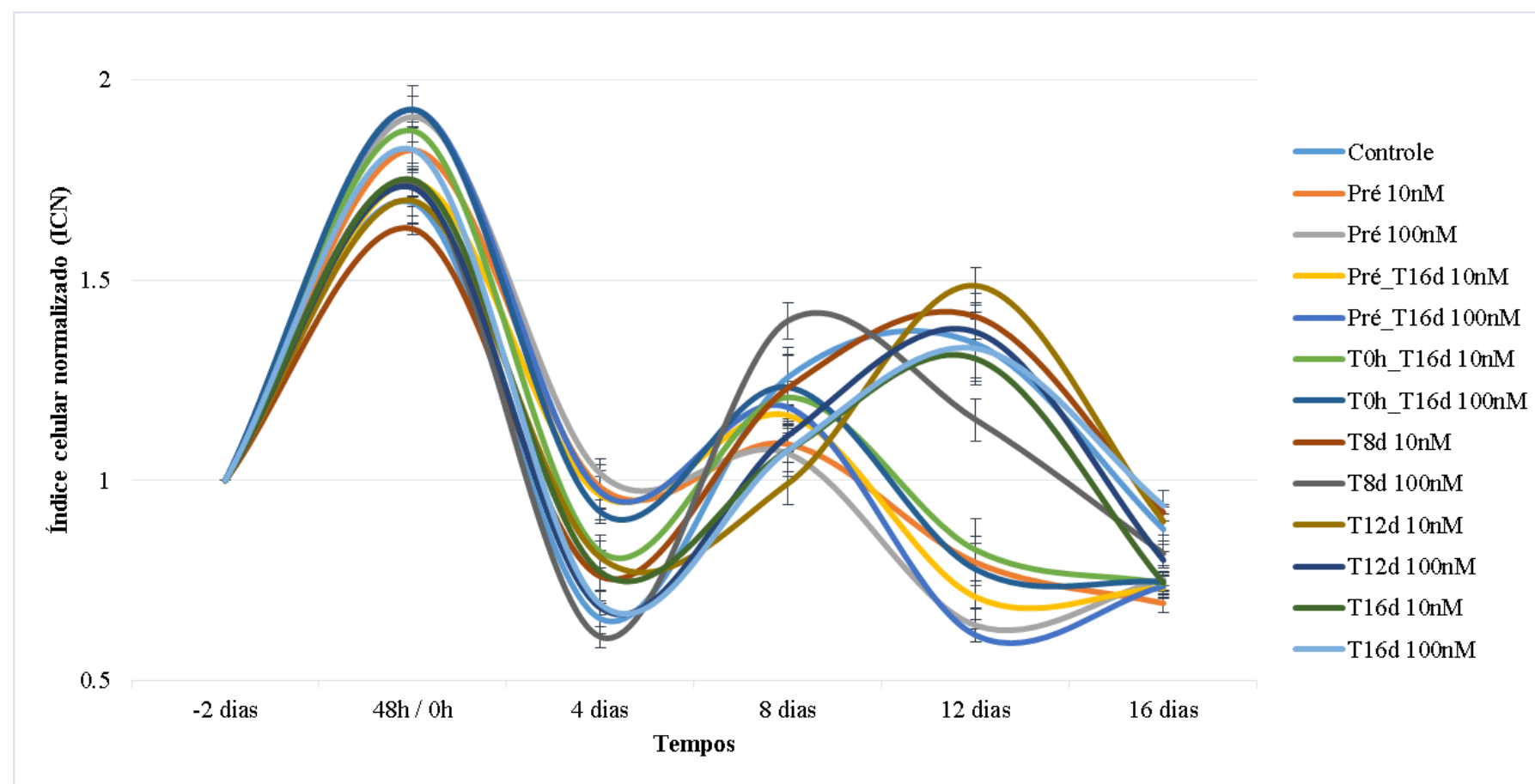
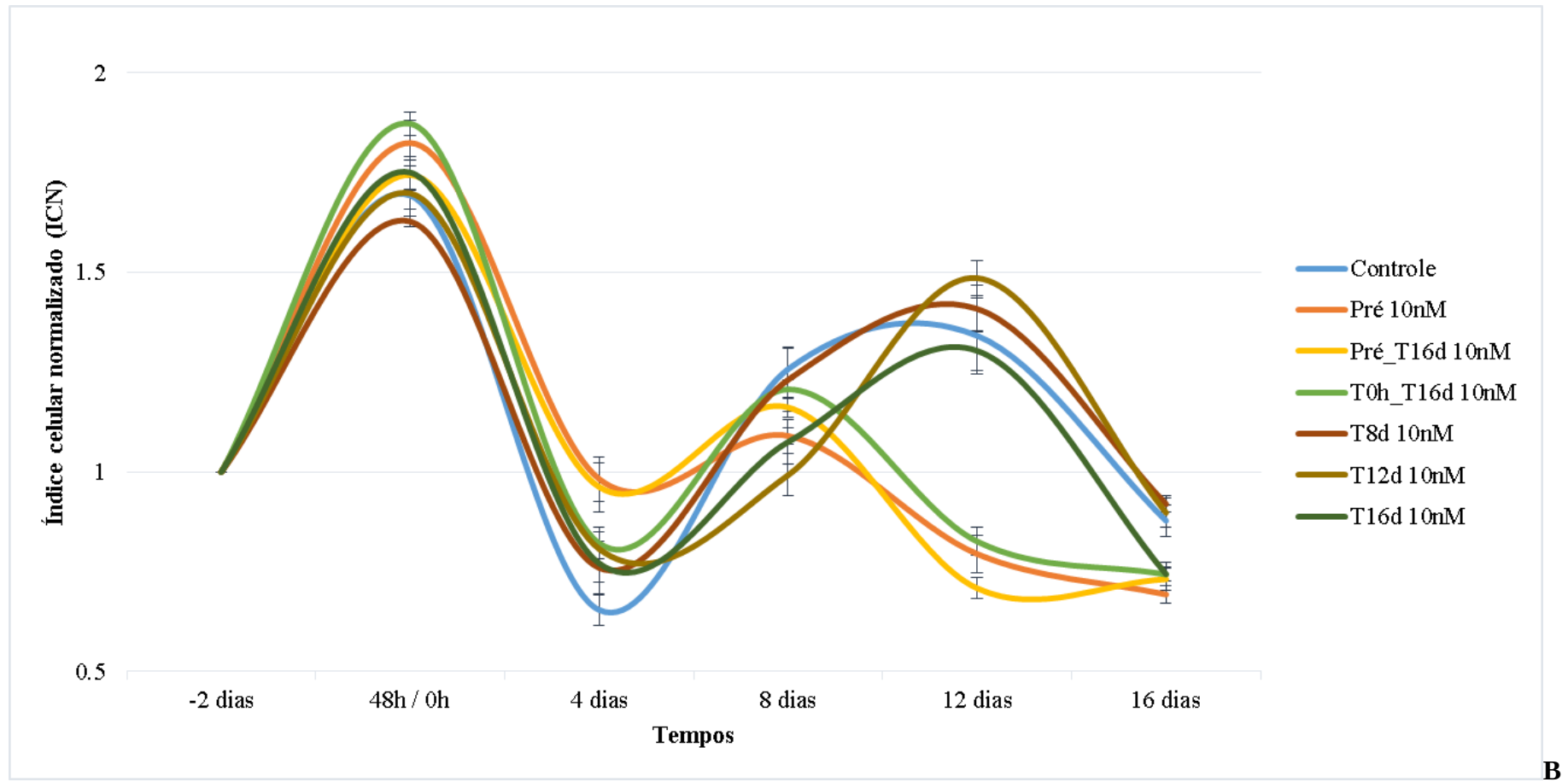


Figura suplementar S7 – Expressão gênica RT-qPCR. Expressão gênica em pré-adipócitos humanos após (A) 4h e (B) 12 dias de indução à diferenciação tratados com VitD 10nM e 100nM. Colunas representam as médias de, pelo menos, 3 experimentos independentes e as barras indicam SEM.



A



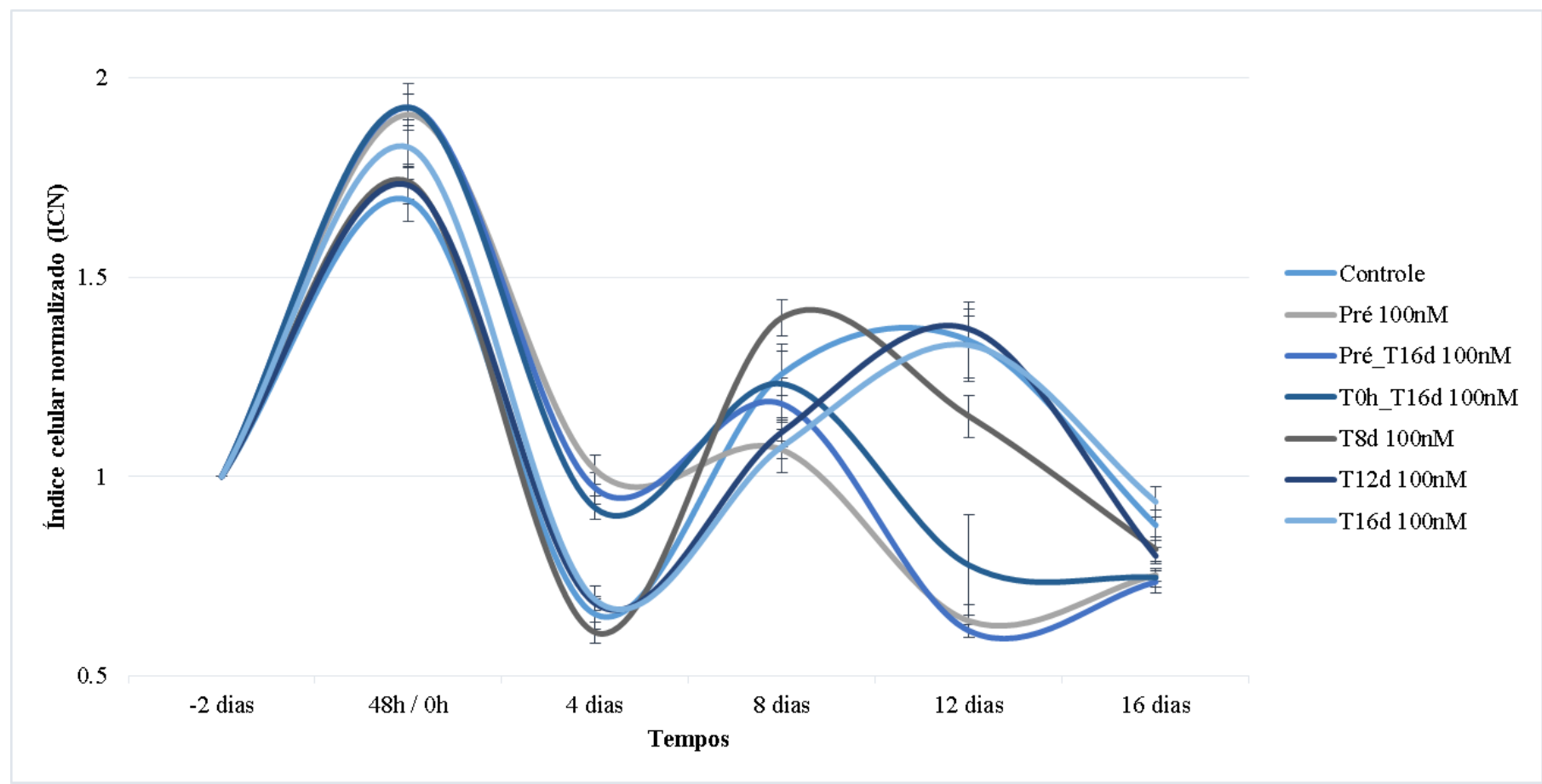


Figura suplementar S8 – Curva de índice celular normalizado, após ensaio de RTCA. (A) Todos os tratamentos, (B) VitD 10nM e (C) VitD 100nM em pré-adipócitos e adipócitos humanos induzidos à diferenciação por 16 dias. Os dados estão apresentados como Média $\pm$ SEM.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O perfil da expressão gênica por *microarray* é uma abordagem usada em tecido adiposo para identificação de genes candidatos e *pathways* moleculares relacionados, principalmente, com obesidade e resistência à insulina (PROKESCH et al., 2009). A submissão dos dados transcriptômicos brutos para repositórios públicos é um pré-requisito para publicação, na maioria das revistas. Essa prática permite que a sociedade científica responda a novas questões científicas por meio de novas ferramentas de bioinformática, as quais estão constantemente em evolução. O artigo apresentado no segundo capítulo usou dados transcriptômicos, de um repositório público, de tecido adiposo subcutâneo de indivíduos obesos e eutróficos, objetivando investigar as diferenças no perfil da expressão gênica relacionadas com *pathways* biológicos que permitiram novos achados sobre o papel do tecido adiposo na obesidade. Informações originadas de *pathways* biológicos são úteis para a compreensão de mecanismos afetadas em uma doença ou situação (KUTMON et al., 2014).

Ademais, a identificação de um *pathway* chave envolvido com o perfil de expressão gênica no tecido adiposo de indivíduos obesos foi estendido com *pathways* relevantes, criando um *network* para visualização do tecido adiposo na obesidade. Dessa forma, o segundo capítulo descreve as vias metabólicas, a interação dessas e os processos biológicos alterados, baseado na expressão gênica, no tecido adiposo de indivíduos obesos, com metabolismo da glicose alterado, quando comparados com indivíduos eutróficos. Ainda, observa-se que os dados encontrados nessas análises de bioinformática são resultantes de indivíduos com o quadro de obesidade já estabelecido, demonstrando, portanto, *pathways* e *network* que refletem o impacto da obesidade no tecido adiposo dos indivíduos do estudo.

A fim de corroborar com os achados do primeiro artigo apresentado nessa tese, no que tange a interação entre os *pathways* da adipogênese e do receptor da vitamina D, foi realizado, em um segundo artigo, a avaliação da ação da vitamina D, em duas concentrações comumente encontradas na literatura, durante a proliferação e diferenciação de células de pré-adipócitos humano SGBS. A ação da vitamina D em adipócitos ainda é controversa na literatura (LEE et al., 2005; NIMITPHONG et al, 2012), e, por isso, foram realizados diversos ensaios experimentais a fim de delinear os efeitos da vitamina D no modelo celular humano utilizado. Dentre os resultados encontrados, confirmou-se a ação da vitamina D no tecido adiposo, bem como a expressão gênica do VDR, especialmente em pré-adipócitos, estágio celular que se mostrou mais sensível à ação da vitamina D. Ainda, foi demonstrado, pela primeira vez, que a vitamina D pode induzir parada de ciclo celular com possibilidade de

senescência celular.

O presente estudo demonstrou que a obesidade altera, principalmente, a via da adipogênese em indivíduos obesos, diminuindo a regulação de fatores de transcrição importantes para a manutenção da homeostase celular, assim como a ligação dessa via com a vitamina D. A ação da vitamina D na adipogênese, proliferação e diferenciação em adipócitos maduros, no tecido adiposo humano foi demonstrada *in vitro* e confirmou a regulação positiva do receptor da vitamina D, permitindo, dessa forma, que mais hipóteses científicas relevantes sejam criadas sobre o tópico. Sendo assim, os resultados apresentados nessa tese norteiam possíveis modos de ação da vitamina D na adipogênese, em especial, frente a elevadas dosagens, fato que pode ocorrer em indivíduos obesos devido à afinidade química entre a vitamina D e o tecido adiposo, e o uso indiscriminado de suplementos farmacêuticos.

CONCLUSÃO

Os resultados aqui apresentados corroboram com a literatura e demonstram em *pathways* e em um *network*, entre os *pathways* mais relevantes encontrados, a importância da adipogênese na obesidade, sendo, dessa forma, essa a principal via estudada no segundo artigo aqui apresentado.

No segundo capítulo, os resultados encontrados sustentam o papel central da via da adipogênese em indivíduos obesos, além de mostrar que essa via apresenta alterações na expressão gênica, quando comparada com dados de indivíduos não obesos. Além disso, foi demonstrado uma possível interação entre o metabolismo da vitamina D e a via da adipogênese, em indivíduos obesos.

Dessa forma, no terceiro capítulo, foi estudada a ação da vitamina D na proliferação e diferenciação de pré-adipócitos humanos, usando o modelo celular normal de pré-adipócitos humano SGBS. Foi demonstrado que a vitamina D possui ação em pré-adipócitos, além de induzir a parada celular. A partir dos resultados preliminares obtidos com o tratamento de pré-adipócitos humanos com vitamina D, discutiu-se um possível mecanismo para a ação da vitamina na parada celular. Embora a hipótese da senescência celular induzida pela vitamina D seja nova em tecido adiposo, muitos resultados semelhantes foram obtidos em outros tecidos, corroborando com esse mecanismo de ação pela vitamina.

Portanto, nossos estudos abrem caminhos para mais investigações no que tange a ação da vitamina D na proliferação de tecido adiposo, além de servir de base para a integração e importância da hiperplasia na manutenção da saúde em indivíduos obesos. Sendo a vitamina D lipossolúvel e seu uso indiscriminado na suplementação, indivíduos com elevado percentual de adiposidade podem atingir altas concentrações de vitamina D armazenada no tecido adiposo, podendo contribuir com o aumento da inflamação e resistência insulínica local, como consequência da parada do ciclo celular e diminuição do metabolismo mitocondrial.

Por fim, novos estudos que confirmem e delineiem os eventos propostos neste estudo são de extremo interesse na área médica a fim de garantir os benefícios da vitamina D em todas as populações.

REFERÊNCIAS

- Alberich-Jordà M, Wouters B, Balastik M, Shapiro-Koss C, Zhang H, Di Ruscio A, et al. C/EBP γ deregulation results in differentiation arrest in acute myeloid leukemia. *J Clin Invest*. 2012; 122(12):4490-4504.
- Ali AT, Hochfeld WE, Myburgh R, Pepper MS. Adipocyte and adipogenesis. *Eur J Cell Biol*. 2013; 92(6-7):229-236.
- Allott EH, Hursting SD. Obesity and cancer: mechanistic insights from transdisciplinary studies. *Endocr Relat Cancer*. 2015; 22(6):R365-386.
- Alvarez MS, Fernandez-Alvarez A, Cucarella C, Casado M. Stable SREBP 1a knockdown decreases the cell proliferation rate in human preadipocyte cells without inducing senescence. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 447(1): 51-6.
- Bao A, Li Y, Tong Y, Zheng H, Wu W, Wei C. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ and cisplatin synergistically induce apoptosis and cell cycle arrest in gastric cancer cells. *Int J Mol Med*. 2014; 33(5):1177-1184.
- Baranoski A, Tempesta Oliveira M, Semprebon SC, Niwa AM, Ribeiro LR, Mantovani MS. Effects of sulfated and non-sulfated β -glucan extracted from *Agaricus brasiliensis* in breast adenocarcinoma cells - MCF-7. *Toxicol Mech Methods* 2015; 13: 1-8.
- Bell NH, Epstein S, Greene A, Shary J, Oexmann MJ, Shaw S. Evidence for alteration of vitamin D-endocrine system in obese subjects. *J Clin Invest*. 1985; 76(1):370-373.
- Billon N, Monteiro MC, Dani C. Developmental origin of adipocytes: new insights into a pending question. *Biol Cell*. 2008; 100(10): 563-575.
- Blumberg JM, Tzameli I, Astapova I, Lam FS, Flier JS, Hollenberg AN. Complex role of the vitamin D receptor and its ligand in adipogenesis in 3T3-L1 cells. *J Biol Chem*. 2006; 281(16):11205-11213.
- Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8(9): 729-40.
- Carlberg C. Lipid soluble vitamins in gene regulation. *Biofactors*. 1999; 10(2-3):91-97.
- Carlberg C, Molnar F. Current Status of Vitamin D Signaling and Its Therapeutic Applications. *Curr Top Med Chem* 2012; 12(6): 528-47.
- Carlberg C, Seuter S, de Mello VD, Schwab U, Voutilainen S, Pulkki K, et al. Primary vitamin D target genes allow a categorization of possible benefits of vitamin D(3) supplementation. *PLoS One*. 2013;8(7):e71042.
- Carlberg C, Molnár F. Vitamin D receptor signaling and its therapeutic implications: Genome-wide and structural view. *Can J Physiol Pharmacol*. 2015; 93(5):311-318.

Chawla A, Nguyen KD, Goh YP. Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nat Rev Immunol* 2011; 11(11): 738-49.

Clemente-Postigo M, Muñoz-Garach A, Serrano M, Garrido-Sánchez L, Bernal-López MR, Fernández-García D, Moreno-Santos I, Garriga N, Castellano-Castillo D, Camargo A, Fernández-Real JM, Cardona F, Tinahones FJ, Macías-González M. Serum 25-Hydroxyvitamin D and Adipose Tissue Vitamin D Receptor Gene Expression: Relationship With Obesity and Type 2 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015; 100(4):E591-5.

Cornelius P, MacDougald OA, Lane MD. Regulation of adipocyte development. *Annu Rev Nutr*. 1994; 14:99-129.

Dahl RC. Establishment of an adipocyte cell-based model to investigate the effect of short-chain fatty acids, especially butyrate, on insulin sensitivity and glucose homeostasis in fat tissue. Thesis - Aarhus University, Faculty of Science and Technology, Department of Animal Science, Denmark, 2013.

Didriksen A, Burild A, Jakobsen J, Fuskevåg OM, Jorde R. Vitamin D₃ increases in abdominal subcutaneous fat tissue after supplementation with vitamin D₃. *Eur J Endocrinol*. 2015; 172(3):235-241.

Dobrian AD. A tale with a Twist: a developmental gene with potential relevance for metabolic dysfunction and inflammation in adipose tissue. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2012;3:108.

Drezner MK, Harrelson JM. Newer knowledge of vitamin D and its metabolites in health and disease. *Clin Orthop Relat Res* 1979; 139: 206-31.

Drincic AT, Armas LA, Van Diest EE, Heaney RP. Volumetric dilution, rather than sequestration best explains the low vitamin D status of obesity. *Obesity (Silver Spring)*. 2012; 20(7):1444-1448.

Eijssen LM, Jaillard M, Adriaens ME, Gaj S, de Groot PJ, Muller M, et al. User-friendly solutions for microarray quality control and pre-processing on ArrayAnalysis.org. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(Web Server issue):W71-6.

Felicidade I, Marcarini JC, Carreira CM, Amarante MK, Afman LA, Mantovani MS, et al. Changes in gene expression in PBMCs profiles of PPAR α target genes in obese and non-obese individuals during fasting. *Ann Nutr Metab* 2015; 66(1): 19-25.

Fève B. Adipogenesis: cellular and molecular aspects. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2005; 19(4): 483-99.

Fischer-Posovszky P, Newell FS, Wabitsch M, Tornqvist HE. Human SGBS cells - a unique tool for studies of human fat cell biology. *Obes Facts* 2008; 1(4):184-9.

Fleet JC, DeSmet M, Johnson R, Li Y. Vitamin D and cancer: a review of molecular mechanisms. *Biochem J*. 2012; 441(1):61-76.

Goeman F, De Nicola F, D'Onorio De Meo P, Pallocca M, Elmi B, Castrignanò T, Pesole G, Strano S, Blandino G, Fanciulli M, Muti P. VDR primary targets by genome-wide transcriptional profiling. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2014; 143:348-356.

González-Pardo V, Suares A, Verstuyf A, De Clercq P, Boland R, de Boland AR. Cell cycle arrest and apoptosis induced by $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and TX 527 in Kaposi sarcoma is VDR dependent. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2014; 144 Pt A:197-200.

Green H, Kehinde O. Spontaneous heritable changes leading to increased adipose conversion in 3T3 cells. *Cell*. 1976; 7:105-113.

Green H, Meuth M. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell*. 1974; 3:127-133.

Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev*. 1998; 78:783-809.

Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol*. 2011; 29: 415-45.

Gustafson B, Hedjazifar S, Gogg S, Hammarstedt A, Smith U. Insulin resistance and impaired adipogenesis. *Trends Endocrinol Metab*. 2015;26(4):193-200.

Heaney RP, Recker RR, Grote J, Horst RL, Armas LA. Vitamin D(3) is more potent than vitamin D(2) in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011; 96(3):E447-52.

Heinäniemi M, Uski JO, Degenhardt T, Carlberg C. Meta-analysis of primary target genes of peroxisome proliferator-activated receptors. *Genome Biol*. 2007; 8(7):R147.

Holick MF. The vitamin D epidemic and its health consequences. *J Nutr*. 2005; 135(11):2739S-2748S.

Huggins CJ, Malik R, Lee S, Salotti J, Thomas S, Martin N, et al. C/EBP γ Suppresses Senescence and Inflammatory Gene Expression by Heterodimerizing with C/EBP β . *Mol Cell Biol*. 2013; 33(16):3242-58.

Itahana K, Campisi J, Dimri GP. Mechanisms of cellular senescence in human and mouse cells. *Biogerontology* 2004; 5(1):1-10.

Kamei Y, Kawada T, Kazuki R, Ono T, Kato S, Sugimoto E. Vitamin D receptor gene expression is up-regulated by 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ in 3T3-L1 preadipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 193(3): 948-55.

Kelder T, Summer G, Caspers M, van Schothorst EM, Keijer J, Duivenvoorde L, et al. White adipose tissue reference network: a knowledge resource for exploring health-relevant relations. *Genes Nutr*. 2015;10(1):439.

Keller P, Gburcik V, Petrovic N, Gallagher IJ, Nedergaard J, Cannon B, et al. Gene-chip studies of adipogenesis-regulated microRNAs in mouse primary adipocytes and human obesity. *BMC Endocr Disord*. 2011;11:7.

Kim YM, Shin HT, Seo YH, Byun HO, Yoon SH, Lee IK, et al. Sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1-mediated lipogenesis is involved in cell senescence. *J Biol Chem* 2010; 285(38): 29069-77.

Kong J, Li YC. Molecular mechanism of 1,25dihydroxyvitamin D₃ inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006; 290(5):E916-E924.

Kramer AH, Joos-Vandewalle J, Edkins AL, Frost CL, Prinsloo E. Real-time monitoring of 3T3-L1 preadipocyte differentiation using a commercially available electric cell-substrate impedance sensor system. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 443(4): 1245-50.

Kumar R, Pittelkow MR, Salisbury JL, Grande JP, Im HJ, Feldmann KA, et al. A Novel Vitamin D-Regulated Immediate-Early Gene, IEX-1, Alters Cellular Growth and Apoptosis. *Recent Results Cancer Res* 2003; 164: 123-34.

Kurylowicz A, Jonas M, Lisik W, Jonas M, Wicik ZA, Wierzbicki Z, et al. Obesity is associated with a decrease in expression but not with the hypermethylation of thermogenesis-related genes in adipose tissues. *J Transl Med*. 2015;13:31.

Kutmon M, Evelo CT, Coort SL. A network biology workflow to study transcriptomics data of the diabetic liver. *BMC Genomics*. 2014; 15:971.

Kutmon M, Evelo CT, Coort SL. A network biology workflow to study transcriptomics data of the diabetic liver. *BMC Genomics*. 2014;15:971.

Kutmon M, Riutta A, Nunes N, Hanspers K, Willighagen EL, Bohler A, et al. WikiPathways: capturing the full diversity of pathway knowledge. *Nucleic Acids Res*. 2015.

Kutmon M, van Iersel MP, Bohler A, Kelder T, Nunes N, Pico AR, et al. PathVisio 3: an extendable pathway analysis toolbox. *PLoS Comput Biol*. 2015;11(2):e1004085.

Lafontan M. Fat cells: afferent and efferent messages define new approaches to treat obesity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2005; 45:119-146.

Lafontan M. Adipose tissue and adipocyte dysregulation. *Diabetes Metab*. 2014; 40(1):16-28.

Lahnalampi M, Heinäniemi M, Sinkkonen L, Wabitsch M, Carlberg C. Time-resolved expression profiling of the nuclear receptor superfamily in human adipogenesis. *PLoS One* 2010; 5(9): e12991.

Landrier JF, Karkeni E, Marcotrichino J, Bonnet L, Tourniaire F. Vitamin D modulates adipose tissue biology: possible consequences for obesity? *Proc Nutr Soc*. 2016; 75(1):38-46.

Lee S, Lee DK, Choi E, Lee JW. Identification of a functional vitamin D response element in the murine Insig-2 promoter and its potential role in the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Mol Endocrinol*. 2005; 19(2):399-408.

Lee S, Shuman JD, Guszczynski T, Sakchaisri K, Sebastian T, Copeland TD, et al. RSK-Mediated Phosphorylation in the C/EBP β Leucine Zipper Regulates DNA Binding,

Dimerization, and Growth Arrest Activity. *Mol Cell Biol.* 2010; 30(11):2621-2635.

Li HX, Gao JM, Liang JQ, Xi JM, Fu M, Wu YJ. Vitamin D3 potentiates the growth inhibitory effects of metformin in DU145 human prostate cancer cells mediated by AMPK/mTOR signalling pathway. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2015; 42(6): 711-7.

Malmberg P, Karlsson T, Svensson H, Lönn M, Carlsson NG, Sandberg AS, Jennische E, Osmancevic A, Holmäng A. A new approach to measuring vitamin D in human adipose tissue using time-of-flight secondary ion mass spectrometry: a pilot study. *J Photochem Photobiol B.* 2014; 138:295–301.

Marcotorchino J, Tourniaire F, Landrier JF. Vitamin D, adipose tissue, and obesity. *Horm Mol Biol Clin Investig* 2013; 15(3): 123-8.

Mejhert N, Laurencikiene J, Pettersson AT, Kaaman M, Stenson BM, Ryden M, et al. Role of Receptor-Interacting Protein 140 in human fat cells. *BMC Endocr Disord.* 2010;10:1.

Mikkelsen TS, Xu Z, Zhang X, Wang L, Gimble JM, Lander ES, Rosen ED. Comparative epigenomic analysis of murine and human adipogenesis. *Cell.* 2010; 143: 156–169.

Ministério da Saúde. Vigitel Brasil 2014: Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico [Internet]. 2015; [português]. Disponível em: <http://www.portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/>.

Miranda M, Escote X, Alcaide MJ, Solano E, Ceperuelo-Mallafre V, Hernandez P, et al. Lpin1 in human visceral and subcutaneous adipose tissue: similar levels but different associations with lipogenic and lipolytic genes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010;299(2):E308-17.

Mitterberger MC, Lechner S, Mattesich M, Zwerschke W. Adipogenic Differentiation Is Impaired in Replicative Senescent Human Subcutaneous Adipose-Derived Stromal/Progenitor Cells. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2014; 69(1): 13-24.

Moreno-Navarrete JM, Fernández-Real JM. Adipose tissue biology: Adipocyte differentiation. Springer New York 2012: 17-28.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65 (1-2): 55-63.

Nakae J, Oki M, Cao Y. The FoxO transcription factors and metabolic regulation. *FEBS Lett.* 2008;582(1):54-67.

Narvaez CJ, Simmons KM, Brunton J, Salinero A, Chittur SV, Welsh JE. Induction of STEAP4 correlates with 1,25-dihydroxyvitamin D3 stimulation of adipogenesis in mesenchymal progenitor cells derived from human adipose tissue. *J Cell Physiol.* 2013; 228(10):2024-36.

Natarajan R. Vitamin D metabolites inhibit adipocyte differentiation in 3T3-L1 preadipocytes. 2008. 62f. Dissertação (Mestrado) - Graduate School of the University of Massachusetts Amherst, Estados Unidos da América, 2008.

Nautiyal J, Christian M, Parker MG. Distinct functions for RIP140 in development, inflammation, and metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 2013;24(9):451-9.

Nimitphong H, Holick MF, Fried SK, Lee MJ. 25-hydroxyvitamin D₃ and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ promote the differentiation of human subcutaneous preadipocytes. *PLoS One.* 2012; 7(12):e52171.

Ntambi JM, Kim YC. Adipocyte differentiation and gene expression. *J Nutr.* 2000; 130(12):3122S-3126S.

Pagano M. Cell cycle regulation by the ubiquitin pathway. *FASEB J.* 1997;11(13):1067-75.

Pawlikowski JS, Adams PD, Nelson DM. Senescence at a glance. *J Cell Sci* 2013; 126(Pt 18): 4061-7.

Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: e36.

Pickholtz I, Saadyan S, Keshet GI, Wang VS, Cohen R, Bouwman P, Jonkers J, Byers SW, Papa MZ, Yarden RI. Cooperation between BRCA1 and vitamin D is critical for histone acetylation of the p21waf1 promoter and growth inhibition of breast cancer cells and cancer stem-like cells. *Oncotarget.* 2014; 5(23):11827-11846.

Pourshahidi LK. Vitamin D and obesity: current perspectives and future directions. *Proc Nutr Soc.* 2015; 74(2):115-124.

Prokesch A, Hackl H, Hakim-Weber R, Bornstein SR, Trajanoski Z. Novel insights into adipogenesis from omics data. *Curr Med Chem.* 2009; 16(23):2952-2964.

Ravaud C, Esteve D, Villageois P, Bouloumie A, Dani C, Ladoux A. IER3 Promotes Expansion of Adipose Progenitor Cells in Response to Changes in Distinct Microenvironmental Effectors. *Stem Cells* 2015; 33(8): 2564-73.

Rosen ED, Hsu CH, Wang X, Sakai S, Freeman MW, Gonzalez FJ, Spiegelman BM. C/EBP α induces adipogenesis through PPAR γ : a unified pathway. *Genes Dev.* 2002; 16(1):22-26.

Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev.* 2000; 14(11):1293-1307.

Rutkowski JM, Stern JH, Scherer PE. The cell biology of fat expansion. *J Cell Biol.* 2015; 208(5):501-512.

Saretzki G. Cellular senescence in the development and treatment of cancer. *Curr Pharm Des.* 2010; 16(1):79-100.

Satyanarayana A, Klarmann KD, Gavrilova O, Keller JR. Ablation of the transcriptional regulator Id1 enhances energy expenditure, increases insulin sensitivity, and protects against age and diet induced insulin resistance, and hepatosteatosis. *FASEB J.* 2012;26(1):309-23.

Savio AL, da Silva GN, de Camargo EA, Salvadori DM. Cell cycle kinetics, apoptosis rates, DNA damage and TP53 gene expression in bladder cancer cells treated with allyl isothiocyanate (mustard essential oil). *Mutation research. Fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis* 2014; 762: 40-46.

Schmidt SF, Jørgensen M, Chen Y, Nielsen R, Sandelin A, Mandrup S. Cross species comparison of C/EBPalpha and PPARgamma profiles in mouse and human adipocytes reveals interdependent retention of binding sites. *BMC Genomics*. 2011; 12:152.

Sebastian T, Johnson PF. Stop and Go: Anti-Proliferative and Mitogenic Functions of the Transcription Factor C/EBPβ. *Cell Cycle*. 2006; 5(9):953-957.

Siersbæk R, Nielsen R, Mandrup S. Transcriptional networks and chromatin remodeling controlling adipogenesis. *Trends Endocrinol Metab*. 2012; 23(2):56-64.

Sikora E, Arendt T, Bennett M, Narita M. Impact of cellular senescence signature on ageing research. *Ageing Res Rev*. 2011; 10(1):146-152.

SNA, Sistema Nacional de Auditoria. Doenças ligadas à obesidade custam R\$ 488 milhões. [Internet]. 2013; [atualizado em 19/03/2013; em português]. Disponível em: <http://sna.saude.gov.br/noticias.cfm?id=5013>.

Soccio RE, Tuteja G, Everett LJ, Li Z, Lazar MA, Kaestner KH. Species-specific strategies underlying conserved functions of metabolic transcription factors. *Mol. Endocrinol*. 2011; 25: 694–706.

Su G, Morris JH, Demchak B, Bader GD. Biological network exploration with cytoscape 3. *Curr Protoc Bioinformatics*. 2014;47:8 13 1-8 24.

Tchkonia T, Morbeck DE, Von Zglinicki T, Van Deursen J, Lustgarten J, Scrable H, Khosla S, Jensen MD, Kirkland JL. Fat tissue, aging, and cellular senescence. *Aging Cell*. 2010; 9(5):667-684.

Tomlinson JJ, Boudreau A, Wu D, Abdou Salem H, Carrigan A, Gagnon A, et al. Insulin sensitization of human preadipocytes through glucocorticoid hormone induction of forkhead transcription factors. *Mol Endocrinol*. 2010;24(1):104-13.

Trayhurn P. Hypoxia and adipocyte physiology: implications for adipose tissue dysfunction in obesity. *Annu Rev Nutr*. 2014;34:207-36.

Tsiaras WG, Weinstock MA. Factors influencing vitamin D status. *Acta Derm Venereol*. 2011; 91(2): 115-124.

Valdivielso JM, Fernandez E. Vitamin D receptor polymorphisms and diseases. *Clin Chim Acta*. 2006; 371(1-2):1-12.

van Dijk SJ, Feskens EJM, Bos MB, Hoelen DWM, Heijligenberg R, Bromhaar MG, de Groot LCPGM, de Vries JHM, Müller M, Afman LA. A saturated fatty acid-rich diet induces an obesity-linked proinflammatory gene expression profile in adipose tissue of subjects at risk

of metabolic syndrome. *Am J Clin Nutr.* 2009; 90(6):1656-1664.

Vidal-Puig A. Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the metabolic syndrome. *Endocrinol Nutr.* 2013; 60 Suppl 1:39-43.

Vimaleswaran KS, Berry DJ, Lu C, Tikkanen E, Pilz S, Hiraki LT, et al. Causal relationship between obesity and vitamin D status: bi-directional Mendelian randomization analysis of multiple cohorts. *PLoS Med* 2013; 10(2): e1001383.

Virtue S, Vidal-Puig A. It's not how fat you are, it's what you do with it that counts. *PLoS Biol.* 2008; 6(9):e237.

Vos MD, Ellis CA, Elam C, Ulku AS, Taylor BJ, Clark GJ. RASSF2 is a novel K-Ras specific effector and potential tumor suppressor. *J Biol Chem.* 2003; 278(30):28045-51.

Wabitsch M, Brüderlein S, Melzner I, Braun M, Mechtersheimer G, Möller P. LiSa-2, a novel human liposarcoma cell line with a high capacity for terminal adipose differentiation. *Int J Cancer.* 2000; 88(6):889-94.

Wabitsch M, Brenner RE, Melzner I, Braun M, Möller P, Heinze E, et al.. Characterization of a human preadipocyte cell strain with high capacity for adipose differentiation. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001; 25(1): 8-15.

Walters MR. Newly identified actions of the vitamin D endocrine system. *Endocr Rev.* 1992; 13(4):719-764.

Wamberg L, Christiansen T, Paulsen SK, Fisker S, Rask P, Rejnmark L, Richelsen B, Pedersen SB. Expression of vitamin D-metabolizing enzymes in human adipose tissue -- the effect of obesity and diet-induced weight loss. *Int J Obes (Lond).* 2013; 37(5):651-657.

Whitfield GK, Hsieh JC, Jurutka PW, Selznick SH, Haussler CA, MacDonald PN, et al. Genomic actions of 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J Nutr* 1995; 125(6):1690S-1694S.

WHO, Media Centre. Obesity and overweight [Internet]. WHO: Fact sheet N° 311; [atualizado em Janeiro 2015]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>.

Wood RJ. Vitamin D and adipogenesis: new molecular insights. *Nutr Rev.* 2008; 66(1):40-46.

Wortsman J, Matsuoka LY, Chen TC, Lu Z, Holick MF. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *Am J Clin Nutr.* 2000; 72(3):690-693.

Wortsman J, Matsuoka LY, Chen TC, Lu Z, Holick MF. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *Am J Clin Nutr* 2000; 72(3): 690-3.

Wu Z, Rosen ED, Brun R, Hauser S, Adelmant G, Troy AE, McKeon C, Darlington GJ, Spiegelman BM. Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol Cell.* 1999; 3(2):151-158.

Xuan X, Li Q, Zhang Z, Du Y, Liu P. Increased expression levels of S100A4 associated with hypoxia-induced invasion and metastasis in esophageal squamous cell cancer. *Tumour Biol.* 2014;35(12):12535-43.

Zambon AC, Gaj S, Ho I, Hanspers K, Vranizan K, Evelo CT, et al. GO-Elite: a flexible solution for pathway and ontology over-representation. *Bioinformatics.* 2012;28(16):2209-10.

Zamboni M, Rossi AP, Fantin F, Zamboni G, Chirumbolo S, Zoico E, Mazzali G. Adipose tissue, diet and aging. *Mech Ageing Dev* 2014; 136-137:129-137.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 1994; 372(6505):425-432.

Zhang Z, Zhang H, Hu Z, Wang P, Wan J, Li B. Synergy of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and carboplatin in growth suppression of SKOV-3 cells. *Oncol Lett.* 2014; 8(3):1348-1354.