



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

DIMITRIUS SANTIAGO PASSOS SIMÕES FRÓES GUIMARÃES

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL E MOLECULAR DO PAPEL DO
RECEPTOR NUCLEAR NR2F6 NO MÚSCULO ESQUELÉTICO

FUNCTIONAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF THE
ROLE OF THE NUCLEAR RECEPTOR NR2F6 IN THE SKELETAL
MUSCLE

CAMPINAS

2023

DIMITRIUS SANTIAGO PASSOS SIMÕES FRÓES GUIMARÃES

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL E MOLECULAR DO PAPEL DO RECEPTOR NUCLEAR NR2F6 NO MÚSCULO ESQUELÉTICO

FUNCTIONAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF THE ROLE OF THE NUCLEAR RECEPTOR NR2F6 IN THE SKELETAL MUSCLE

Thesis presented to the Institute of Biology at the State University of Campinas as a partial fulfillment of the requirements for obtaining the degree of Doctor of Functional and Molecular Biology, in the area of Biochemistry.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Funcional e Molecular, na área de Bioquímica

Orientador: PROF. DR. LEONARDO DOS REIS SILVEIRA

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DESTA TESE DEFENDIDA POR DIMITRIUS SANTIAGO PASSOS
SIMÕES FRÓES GUIMARÃES E ORIENTADA PELO PROF. DR.
LEONARDO DOS REIS SILVEIRA

CAMPINAS

2023

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

G947f Guimarães, Dimitrius Santiago Passos Simões Fróes, 1991-
Functional and molecular characterization of the role of the nuclear receptor
Nr2f6 in the skeletal muscle / Dimitrius Santiago Passos Simões Fróes
Guimarães. – Campinas, SP : [s.n.], 2023.

Orientador: Leonardo dos Reis Silveira.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de
Biologia.

1. Receptores nucleares órfãos. 2. Regulação da expressão gênica. 3.
Fatores de transcrição. 4. Músculo esquelético. 5. Adaptação (Fisiologia). I.
Silveira, Leonardo dos Reis, 1970-. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Caracterização funcional e molecular do papel do receptor nuclear
Nr2f6 no músculo esquelético

Palavras-chave em inglês:

Orphan nuclear receptors
Gene expression regulation
Transcription factors
Skeletal muscle
Adaptation (Physiology)

Área de concentração: Bioquímica

Titulação: Doutor em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Leonardo dos Reis Silveira [Orientador]
Ana Carolina Migliorini Figueira
Luiz Carlos Carvalho Navegantes
Alice Cristina Rodrigues
Carol Virgínia Góis Leandro

Data de defesa: 06-07-2023

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-3890-2910>

- Currículo Lattes do autor: <https://lattes.cnpq.br/3235669146253548>

Campinas, 6 de julho de 2023

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Leonardo dos Reis Silveira (Orientador)

Profª. Dra. Ana Carolina Migliorini Figueira (Membro Interno)

Prof. Dr. Luiz Carlos Carvalho Navegantes (Membro Externo)

Profª. Dra. Alice Cristina Rodrigues (Membro Externo)

Profª. Dra. Carol Virgínia Góis Leandro (Membro Externo)

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Pós-graduação em Biologia Funcional e Molecular do Instituto de Biologia.

Agradecimentos

Ao Leo por sempre apoiar, incentivar e confiar em mim e neste projeto desde o primeiro dia.

Às agências de fomento que financiaram este trabalho diretamente ou indiretamente. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) através dos processos 2021/07411-2, 2017/24795-3 e 2016/23008-5. Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Aos pesquisadores do Laboratório Nacional de Biociências. Ângela Saito; ao Grupo MAS da Adriana F. Paes Leme, Bianca A. Pauletti, Romênia R. Domingues, Sami Yokoo; ao grupo LVV do Márcio Bajgelman e Jéssica M. Toscaro.

Aos pesquisadores do Instituto de Biologia da Unicamp: ao grupo do professor Jörg Kobarg, Camila e Pedro; ao professor André Schwambach Vieira; ao grupo do professor Marcelo Mori, Deisi e Henver; ao grupo da professora Maria Cristina Marcondes.

Aos pesquisadores da Faculdade de Medicina: ao grupo do professor Roger F. Castilho e do professor Aníbal e à Edilene.

Aos pesquisadores da Hirosaki University Graduate School of Medicine Toshitsugu: Fujita e Hodaka Fuji.

Aos vizinhos do condomínio do OCRC do Grupo do Professor Lício Veloso e do Carlos Sponton.

Ao professor da Medical University of Innsbruck: Gotfried Baier.

To Anna and Juleen for the mentorship, support, receptivity, and the opportunity to learn. And to my colleagues and friends from C3, for the camaraderie, understanding, learning opportunities and pints of beer.

Às amigas e amigos do laboratório que tanto me ensinaram, muito além de ciência, e que me obrigaram a aproveitar esses mais de 5 anos. Não vai caber o nome de todos, vocês que lutem.

A todos amigos que fiz na Suécia pelo acolhimento, mergulhos acidentais, noites em branco e festas de gosto duvidável.

Aos colegas e amigos do grupo do Leo, que foram também meus mentores, professores e comparsas.

À MJ por cada segundo e milímetro quadrado, até os de declaração de imposto e de lavar roupa.

À Alexandra Elbakyan por expandir o acesso ao conhecimento.

À Ninon por todo o aprendizado, companheirismo e dedicação.

Ao Thi pela amizade, por ajudar e por atrapalhar.

Aos meus pais pelo amor e pelo apoio.

À Teka pelo amor e pela inspiração.

A todos os trabalhadores viabilizaram meus estudos.

RESUMO

A manutenção da plasticidade do músculo esquelético diante de mudanças no ambiente, no suprimento de nutrientes e na atividade física depende da interrelação entre as adaptações metabólicas e estruturais. Aqui, estabelecemos uma função para o receptor nuclear órfão Nr2f6 em nestes processos. A superexpressão de Nr2f6 leva a um estado atrófico, diminuindo drasticamente a massa muscular e o conteúdo de miofibras, o que é acompanhado por uma deficiência na produção de força. Esses fenótipos funcionais foram acompanhados pelo desenvolvimento de uma assinatura molecular inflamatória e uma diminuição nos genes envolvidos no metabolismo oxidativo e na contratilidade. Por outro lado, a depleção de Nr2f6 aumentou a capacidade oxidativa dos miócitos e protegeu contra a morte celular induzida por lipídios. Além disso, o Nr2f6 regulou os principais componentes da maquinaria de divisão celular, dissociando a proliferação de células musculares da sua diferenciação. Em conjunto, nossas descobertas definem uma nova função para o Nr2f6 como um transdutor molecular que confere equilíbrio entre a estrutura do músculo esquelético e a sua capacidade oxidativa.

ABSTRACT

The maintenance of skeletal muscle plasticity upon changes in the environment, nutrient supply, and activity depends on the crosstalk between metabolic and structural adaptations. Here, we establish a role for the orphan nuclear receptor Nr2f6 in both processes. Nr2f6 overexpression leads to an atrophic state, sharply decreasing muscle mass and myofiber content, which is accompanied by an impairment in force production. These functional phenotypes were followed by the establishment of an inflammatory molecular signature, and a decrease in genes involved in oxidative metabolism and contractility. Conversely, Nr2f6 depletion increased myocytes' oxidative capacity and protected against lipid-induced cell death. In addition, Nr2f6 regulated core components of the cell division machinery, decoupling muscle cell proliferation from differentiation. Collectively, our findings define a novel role for Nr2f6 as a molecular transducer conferring the balance between skeletal muscle structure and oxidative capacity.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1 Introdução ao público amplo	10
1.2 Introdução acadêmica: A função muscular e a sua conexão com o metabolismo energético	13
1.2.1 Mecanismos de contração	13
1.2.2 Metabolismo energético no músculo esquelético.....	18
1.2.3 Sarcopenia e doenças musculares	26
1.2.4 Regulação transcricional da miogênese: enfoque em receptores nucleares.....	27
1.2.5 Regulação do metabolismo energético muscular mediada por receptores nucleares....	33
1.2.6 O receptor nuclear órfão Nr2f6	36
2. REFERÊNCIAS	39

CAPÍTULO 2

GENERAL INFORMATION	48
SUMMARY	50
GRAPHICAL ABSTRACT	51
INTRODUCTION	52
RESULTS	53
Nr2f6 regulates muscle cell metabolism and differentiation.	53
Increase in cell oxidative capacity by Nr2f6 knockdown.	54
Nr2f6 regulates PGC-1 α and UCP3 expression.....	55
Nr2f6 activates the cell cycle and represses the expression of genes involved in muscle contraction and oxidative metabolism.	56
Nr2f6 inhibits muscle development and contraction.	57
Nr2f6 modulates myoblasts' proliferation rates.	58
DISCUSSION.....	59
ACKNOWLEDGMENTS	62
AUTHOR CONTRIBUTIONS	62
DECLARATION OF INTERESTS.....	62
FIGURES	63
Figure 1. Nr2f6 knockdown derepresses the expression of genes involved in metabolism and myogenesis.....	64

Figure 2. Nr2f6 depletion increases fatty acid oxidation and protects cells against lipid-induced stress.....	65
Figure 3. Nr2f6 directly regulates PGC1-a and UCP3 gene expression.....	67
Figure 4. The molecular signature of Nr2f6 overexpression in skeletal muscle reveals an increase in inflammation and a decrease in muscle contraction and metabolism.....	69
Figure 5. Overexpression of Nr2f6 induces muscle atrophy and impairs muscle force production.	71
Figure 6. Nr2f6 promotes myoblast proliferation.	72
Figure 7. Nr2f6 represses core genes of muscle contraction.	74
STAR METHODS.....	75
Resource availability.....	75
Experimental model details.....	75
Cell culture	75
Primary mouse skeletal muscle cells.....	75
Animals	76
Method details.....	76
Reactive oxygen species measurement	76
RT-qPCR.....	76
RNA-seq.....	76
Palmitate treatment.....	77
Promoter transactivation assays	77
siRNA knockdown	77
Stable cell lines.....	77
Electroporation	78
Contraction	78
MHC Staining	78
Oxygen consumption assays	79
Lactate measurement.....	79
Western blot	79
Microarray	79
Cell-death assays	80
Cell doubling time.....	80
ATP measurement	80
Bioinformatic analysis of public datasets	80
Statistical analysis and quantification.....	81

SUPPLEMENTARY INFORMATION	82
Supplementary Figure 1. Nr2f6 regulates myogenesis and binds to the promoters of genes involved in metabolism in different cell types.....	83
Supplementary Figure 2. Nr2f6 depletion enhances metabolism in skeletal muscle.	84
Supplementary Figure 3. Nr2f6 regulates UCP3 and PGC-1 α expression.	85
Supplementary Figure 4. Nr2f6 overexpression impairs muscle function.	86
Key resource table	87
Supplemental table 1 - List of primers and TaqMan probes used for gene expression.....	90
REFERENCES	92
APÊNDICES	97
Declaração sobre direitos autorais	97
Declaração de Bioética e Biossegurança	98

- CAPÍTULO 1 -

1. INTRODUÇÃO

1.1 Introdução ao público amplo

Os músculos esqueléticos constituem um dos principais sistemas de consumo de glicose e ácidos-graxos no corpo humano e ele o faz através da queima destes e de outros nutrientes para a produção de energia. Este processo bioquímico de conversão de moléculas complexas em moléculas mais simples, chamado catabolismo, tem diversos fins no tecido muscular, dentre eles podemos citar a manutenção da sua estrutura altamente organizada, a contração e relaxamento, a manutenção da homeostase celular ou, ainda, a produção de calor sem que ocorra contração. Cada uma destas finalidades é importante para o correto funcionamento do organismo e pode predominar dependendo da situação à qual este precisa se adaptar, por exemplo, após uma refeição contendo carboidratos há um influxo de açúcares, principalmente glicose, na corrente sanguínea, que precisa ser armazenado para suprir as necessidades energéticas posteriores e para que sua concentração sanguínea não alcance níveis que possam causar danos ao sistema cardiovascular. No músculo em repouso, a captação de glicose é promovida pela ação da insulina, um hormônio produzido no pâncreas ao detectar níveis elevados de glicose no sangue, que viaja até o músculo e faz com que os transportadores de glicose sejam colocados em posição para facilitar a saída deste açúcar do sangue para a célula muscular. Uma vez no músculo, ainda sob ação da insulina, a glicose é armazenada em forma de glicogênio, uma grande molécula composta por vários resíduos de glicose conectados. Por outro lado, durante o exercício físico, outros mecanismos ativam transportadores de glicose, não necessariamente dependendo da ação da insulina, e promovem sua captação e queima.

Em algumas condições patológicas, os músculos se tornam insensíveis à ação da insulina, precisando de uma maior quantidade do hormônio para captar glicose, estado conhecido como resistência à insulina ou pré-diabético. Ao longo do tempo, devido à incapacidade do músculo em reduzir a glicose sanguínea após refeições, a alta quantidade de glicose circulante leva a uma série de problemas, que discutiremos a seguir. Em contraposição aos músculos, diversos tecidos não dependem da insulina para captar glicose, mantendo a concentração de açúcar dentro da célula similar àquela do sangue, assim sendo susceptíveis à níveis altos níveis de glicose por um longo período. Dentre estas células, podemos destacar aquelas que formam os vasos sanguíneos, veias e artérias, as células do sistema nervoso e as próprias células do pâncreas que produzem a

insulina, que sofrem processos deletérios em indivíduos com hiperglicemia. Com isso em mente, fica fácil entender alguns dos sintomas decorrentes da diabetes não tratada: dormência nas extremidades, problemas cardiovasculares, nos rins e de cicatrização, causados por danos nos vasos sanguíneos e no sistema nervoso.

Atualmente o sobrepeso e o estilo de vida sedentário, como sintomas do modo de produção e de sociabilidade que vivemos, vêm contribuindo cada vez mais para o aumento da incidência da resistência à insulina. No sobrepeso, os níveis aumentados e constante de um outro nutriente no sangue, os lipídeos, além de promovem danos por si só, competem com a glicose pela sua queima no músculo, reduzindo a sua capacidade de drenar a glicose sanguínea. Como mencionamos anteriormente, o exercício físico tem mecanismos independentes da insulina para reduzir a glicose sanguínea, prevenindo o desenvolvimento da diabetes, sendo uma das maneiras mais eficientes de tratá-la. Torna-se claro portanto que o correto funcionamento muscular, tanto a sua capacidade de contrair quanto a sua capacidade de consumir energia, processos que são intimamente ligados, é importante para um funcionamento saudável do organismo e para o tratamento de doenças.

A contração muscular somente é possível devido à estrutura altamente organizada das células musculares, chamadas miofibras. Essas células compridas e alinhadas em uma mesma direção, daí chamá-las de fibras como as dos tecidos, e são preenchidas quase completamente pelas proteínas contráteis que também se organizam alinhadas em um eixo. Grosso modo, podemos pensar nessas proteínas como dois pentes encaixados: um grupo de proteínas formam os dentes que deslizam entre si, necessitando de energia para produzir essa força, e um outro conjunto de proteínas mantém os dentes unidos e se organiza paralelamente a eles. Quando essa intrincada organização é prejudicada de alguma forma, por doenças genéticas, em estados de debilidade física, como desnutrição, em alguns tipos de câncer ou com o envelhecimento, as funções musculares das quais falamos inicialmente também são prejudicadas. Assim, o nosso corpo mantém todos esses processos envolvidos com contração e produção de energia estritamente regulados.

Sabendo disso, nesse trabalho, nos exploramos e descobrimos novas funções de uma proteína, chamada de Nr2f6, no músculo. Para isso utilizamos de células cultivadas em laboratório e camundongos, para aumentar e reduzir os níveis do Nr2f6 e verificar seus efeitos. Descobrimos que quando reduzimos a quantidade de Nr2f6, as células musculares aumentam sua capacidade de queimar lipídeos e aumentam a quantidade de proteínas de contração. Por outro lado, quando

aumentamos a quantidade do Nr2f6 nos músculos dos animais, observamos que estes ficam mais fracos e há um prejuízo na organização das células musculares. Com isso, nossos achados são importantes para compreender doenças nas quais o metabolismo muscular é afetado, como na resistência à insulina, e doenças que levam à uma degeneração muscular, abrindo uma nova via terapêutica para o tratamento destas enfermidades.

1.2 Introdução acadêmica: A função muscular e a sua conexão com o metabolismo energético

Considerando-se este novo modelo de tese nucleada por um artigo científico e que este é uma versão resumida e coesa do trabalho realizado ao longo do doutorado, esta introdução que forma o primeiro capítulo desta tese, visa apresentar fundamentos, princípios, e termos necessários a um melhor entendimento do manuscrito produzido, sem pretensão de revisar os temas exaustivamente. Da máxima bioquímica “a estrutura determina a função”, a exposição começará apresentando os conceitos do micro para o macro, partindo das estruturas das proteínas contráteis para então, explicar como elas interagem e funcionam e como o metabolismo muscular e a função muscular se relacionam. O segundo capítulo desta tese consiste no manuscrito resultante do trabalho desenvolvido ao longo deste doutorado, sem alterações de conteúdo e apenas pequenos ajustes para compatibilizar a formatação.

1.2.1 Mecanismos de contração

Diversos tecidos compõe o músculo esquelético, por exemplo, células do sistema imune, células adiposas, tecido conjuntivo, tecido nervoso, vascular e o tecido muscular esquelético, o qual é responsável pelas suas propriedades contráteis. As células musculares ou miofibras, são sincícios alongados com organelas adaptadas de formas características. A Figura 1A ilustra as principais estruturas do músculo estriado esquelético que serão discutidas a seguir. O citoplasma, mais especificamente chamado de sarcoplasma, é tomado por feixes de miofibrilas, compostos pelas proteínas contráteis e que são envoltos pelo retículo sarcoplasmático. No músculo, o retículo sarcoplasmático forma anéis (cisternas terminais) que envolvem as proteínas contráteis periodicamente, aumentando assim seu volume para armazenamento de cálcio e a superfície de contato com as miofibrilas. As cisternas terminais estão em próxima justaposição com invaginações da membrana plasmática, ou sarcolema, chamadas de túbulos T, que propagam o potencial de ação e permitem que ele atinja miofibrilas centrais. Os núcleos das miofibras são deslocados para a periferia e as mitocondriais entremeiam as miofibrilas no sarcolema. As células musculares por sua vez são fasciculadas em grupos envoltos pelo endomísio, um tecido conjuntivo que suporta os capilares, vasos linfáticos e os nervos. Novamente, estes feixes fasciculados são agrupados em conjuntos envoltos por um tecido formado por colágeno e elastina, chamado de perimísio. Por fim, o músculo é determinado pelo epimísio, um tecido conjuntivo colagenoso, que protege os músculos e faz conexões com os tendões¹.

As miosinas são proteínas motoras de eucariotos que podem ser divididas em 24 classes² de acordo com similaridade da sequência gênica, especificamente, as miosinas do aparelho contrátil em músculos esqueléticos pertencem a classe II, também chamadas de miosinas sarcoméricas. As cadeias pesadas desta classe de miosinas (MyHC) são formadas por um domínio *coiled-coil* alongado, que é responsável pela formação dos dímeros na estrutura quaternária; um domínio catalítico ou motor na região N-terminal, que se liga aos filamentos de actina e possui atividade de ATPase; por fim, entre essas duas regiões há o domínio pescoço ou de braço de alavanca, que contém vários motivos IQ (IQxxxRGxxxR) de ligação à calmodulina e que podem se ligar também às cadeias leve de miosina que compõe a estrutura quaternária, em conjunto com as subunidades regulatórias, formando assim um heterohexâmero. As miosinas de classe II, possuem 7 diferentes isoformas com diferentes padrões de expressão espaçotemporal^{3,4}. A miosina perinatal (gene *MYH8*) e a miosina embrionária (gene *MYH3*) são coletivamente chamadas de miosinas do desenvolvimento, já as miosinas da fase adulta são formadas por MyHC-IIa (gene *MYH2*), MyHC-IIb (gene *MYH4*, indetectável em humanos⁵), MyHC-x (gene *MYH1*) e MyHC- β /lenta (gene *MYH7*), esta última é característica do músculo estriado cardíaco e dos músculos de contração lenta. A quinta miosina adulta, MyHC-extraocular (gene *MYH13*) é encontrada em músculos da faringe e nos músculos que controlam o movimento dos olhos. À exceção da miosina cardíaca, as 6 outras estão agrupadas em um mesmo *locus* gênico, e em relação à diferença espacial, cada miosina indica o tipo de fibra muscular de acordo com as suas propriedades contráteis³.

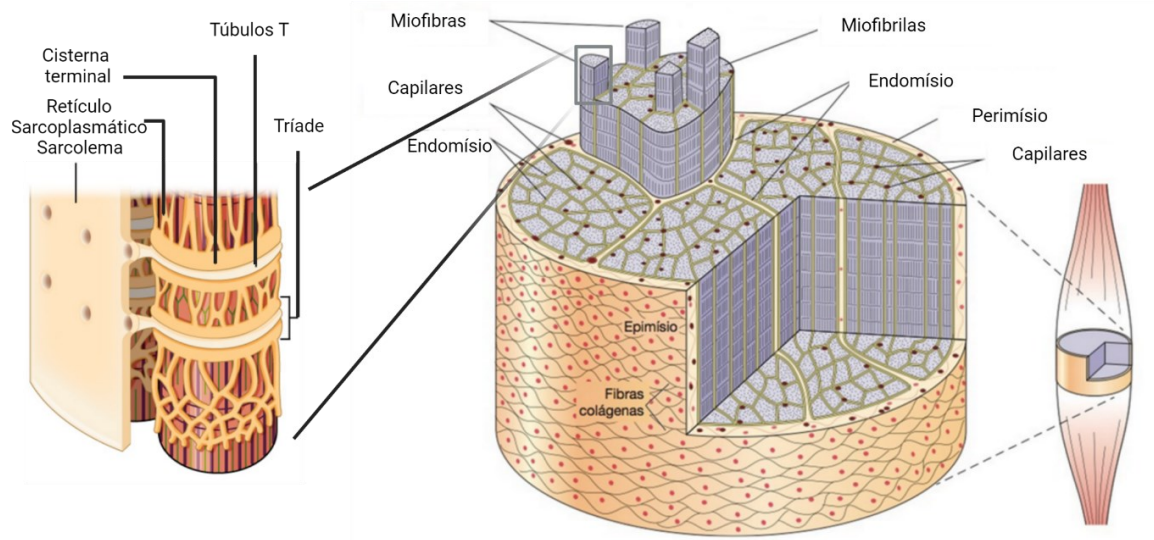
Os filamentos de actina (f-actina) são formados por monômeros de aproximadamente 42 kDa chamados de g-actina, que se organizam em duas hélices de giro anti-horário entrelaçadas⁶. As subunidades contêm motivos estruturais que se ligam aos fosfatos dos nucleotídeos de ATP ou ADP e outra região que se liga a íons de cálcio ou magnésio. É interessante o fato de que, quando polimerizados, há uma mudança de conformação que estreita os sítios de ligação aos nucleotídeos, reduzindo a sua atividade de hidrólise⁷. Os filamentos de actina são envoltos pelo complexo da tropomiosina, compostos por cadeias de tropomiosina e de troponina, esta última é dividida em três componentes que desempenham funções específicas, a saber: troponina C: se liga a íons de cálcio; troponina T: interage com a tropomiosina; e a troponina I: inibe a que inibe a atividade do complexo de actina-miosina. A troponina C é codificada por dois genes em humanos, um para a isoforma de músculos de contração rápida e o outro que codifica a isoforma presente em músculos de contração lenta e do coração⁸. Quando os íons Ca^{2+} saturam os chamados sítios regulatórios no domínio N-

terminal, uma mudança conformacional é induzida de forma a expor resíduos hidrofóbicos que interagem com a troponina I, abolindo a atividade inibitória da troponina I sobre a ATPase da actomiosina. É importante destacar que esta atividade também é regulada por fosforilação promovida pelas proteínas quinases C (PKC) e por quinases dependentes de AMP cíclico e é intensificada pela interação com tropomiosina⁹. As tropomiosinas são um amplo grupo de proteínas que se entrelaçam com f-actina, impedindo estericamente a sua interação com a porção motora da miosina, impedindo a hidrólise de ATP¹⁰. Estruturalmente, as tropomiosinas são formadas por subunidades que tem estrutura *coiled-coil*, as quais se alinham ao longo do mesmo eixo que os filamentos de actina¹¹.

O tecido muscular estriado tem esse nome, porque ao observar um corte longitudinal ao microscópio nota-se uma repetição de padrões de densidade eletrônica ou de cores, que correspondem a menor unidade de contração chamada de sarcômero, ilustrado esquematicamente na Figura 1B. Os padrões estriados refletem a repetição dos sarcômeros ao longo do mesmo eixo e da organização das proteínas contráteis no sarcômero. O sarcômero é limitado pela linha Z (“entre” do alemão “*Zwischen*”), formado pela proteína alfa-actinina, que serve de ancoramento para os filamentos finos de actina, que se posicionam ortogonalmente¹². Na metade do sarcômero, estão as linhas M que constituem o ponto de ancoramento para os filamentos grossos de miosina, que o cortam ortogonalmente no mesmo sentido dos filamentos de actina. A eletrodensidade da linha M é resultante, principalmente de miomesinas, seu principal componente estrutural, mas também de proteínas associadas, como a creatina quinase, obscurina, a qual conecta a linha M com o sarcolema e com o retículo sarcoplasmático, e titina. A última, se estende desde a linha Z e, assim como a miomesina, proporciona elasticidade para corrigir desequilíbrios na tensão gerada em direções opostas no sarcômero¹³. Flanqueando a linha M, há uma região menos densa, chamada de zona H, que consiste na aglomeração das caudas de miosina, e que se amplia para a banda A quando uma região mais eletrodensa, composta pela sobreposição das cabeças motoras da miosina e dos filamentos de actina. Da mesma maneira, flanqueando a linha Z, está a banda I, menos eletrodensa e formada pelos filamentos de actina, e que faz limite com a banda A, na qual os filamentos de actina e miosina começam a se sobrepor. Na contração, o sarcômero se encurta, aproximando as linhas Z e reduzindo o comprimento das regiões de baixa densidade, devido ao movimento relativo dos filamentos de actina e miosina, diminuindo assim as zonas H e I. Em um corte transversal, as cabeças motoras da miosina se projetam a partir do eixo dos filamentos grossos 6 por vez, se

dispondo em um hexágono no qual os vértices são os pontos de contato com f-actina, formando uma treliça que confere estabilidade estrutural⁶.

A



B

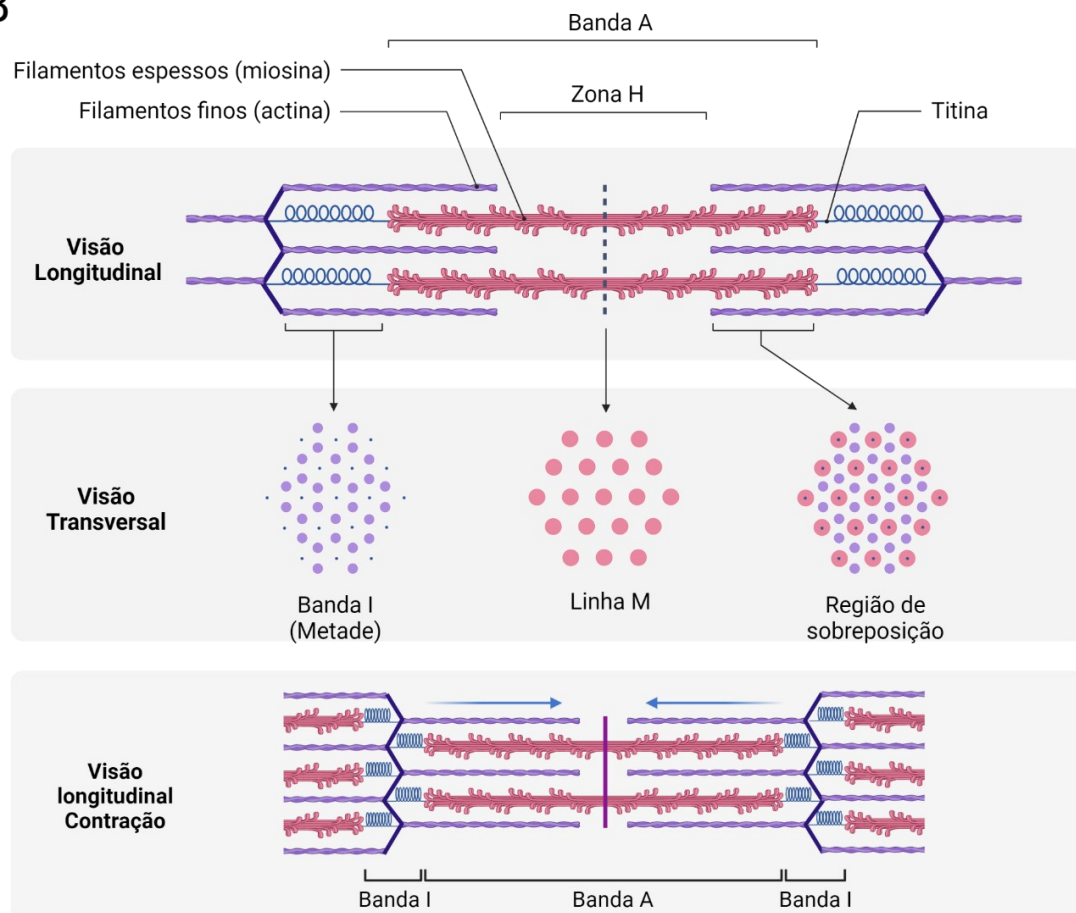


Figura 1 – Estrutura do músculo esquelético e do sarcômero. (A) Na parte direita uma seção transversa mostra como as células musculares (miofibras) se organizam no músculo; na parte esquerda, uma ampliação de uma seção das miofibras com enfoque nas adaptações da membrana plasmática (sarcolema) e do retículo endoplasmático (retículo sarcoplasmático). (B) Esquema ultraestrutural do sarcômero ilustrando a disposição das proteínas contráteis quando o músculo está relaxado (superior) e contraído (inferior). Na imagem do meio, um corte transversal nos locais indicados revela o arranjo dos filamentos espessos e dos filamentos finos.

A contração muscular é iniciada pelo sistema nervoso, ao final dos axônios eferentes responsáveis pela transmissão do estímulo, há uma expansão da membrana celular que se espalha por várias fibras, estrutura conhecida como placa motora. As unidades motoras, isto é, cada conjunto de fibras que pode ser ativada por um mesmo axônio motor, não são necessariamente ativadas ao mesmo tempo, de maneira que a força final produzida é o resultado da frequência de ativação nos axônios eferentes, quanto maior a frequência, ou seja, o número de neurônios ativados em um determinado momento ou o número de sinais enviados por um mesmo neurônio em um período, maior será a força produzida pelo músculo¹⁴. O estímulo viaja pelos neurônios com a ativação de canais de sódio-potássio e quando chegam à placa motora promovem o influxo de cálcio, que, por sua vez, ativa a fusão de vesículas contendo acetilcolina à membrana pré-sináptica. Ao atingir a membrana pós-sináptica a acetilcolina ativa seu receptor, que é um transportador antiporte de íons sódio/potássio, levando ao influxo de Na^+ e a redução do potencial local da membrana, essa redução de potencial viaja por invaginações da membrana, chamadas de túbulos T, que estão em proximidade ao retículo sarcoplasmático¹⁵. Receptores de dihidropiridina no sarcolema são sensíveis a mudança de potencial, sofrendo alterações conformacionais que ativam os receptores de rianodina (Ryr1) no retículo sarcoplasmático após a entrada de cálcio para o sarcoplasma, enfim levando à liberação de íons de cálcio para o sarcoplasma¹⁶.

No modelo de bloqueio estérico, o aumento das concentrações sarcoplasmáticas de cálcio altera a conformação da troponina C, de um estado bloqueado no qual a troponina I está ligada à actina, para um estado fechado que desencadeia o deslocamento da tropomiosina e a consequente liberação dos sítios de interação entre a actina e o domínio motor da miosina. No estado basal, a porção motora de miosina se mantém ligada ao ATP hidrolisado, ou seja, $\text{ADP} \cdot \text{P}_i$, que se liga à actina; neste momento o $\text{ADP} \cdot \text{P}_i$ é liberado e há um movimento de dobradiça da

cabeça da miosina, ainda ligada à actina, em direção à cauda, produzindo o encurtamento do músculo¹⁴. Somente quando há hidrólise de ATP é que a interação é liberada e o estado inicial é retomado. O cálcio é removido do sarcoplasma por dois mecanismos principais: transporte ativo de volta para o retículo sarcoplasmático através das ATPases sarcoplasmáticas/endoplasmáticas dependentes de cálcio (SERCAs)¹⁷ e para o exterior da miofibrila através de trocadores de sódio-cálcio (NCX)¹⁸.

Os primeiros estudos sobre a contração muscular são datados já da primeira década do século XX, preparações de músculos inteiros de sapos foram usadas para quantificar e descrever o desenvolvimento de força e somente nas décadas de 1950 e 1960, o primeiro modelo consistente do mecanismo de contração foi proposto, já com informações de difração de raios X e da atividade de hidrólise de ATP das cabeças de miosina^{6,7}. Tais modelos foram desenvolvidos ao longo do tempo com novas descobertas e são chamados de “*swinging arm/cross-bridge*” ou “pontes deslizantes” e embora sejam geralmente aceitos pela comunidade científica, diversas observações desafiam a aderência do mesmo à realidade. Uma destas observações é a ausência de larga amplitude de movimento da cabeça das miosinas durante a contração muscular, uma outra observação é a elasticidade dos filamentos de actina, que deveriam ser rígidos para acomodar a relação de 1:1 entre os ciclos de contração e de hidrólise de ATP. Assim, um novo modelo híbrido, que comporta estas e outras observações foi proposto por Morel em 2015⁷. Em tal modelo, a produção de força ocorre não somente pela mudança conformacional dos domínios globulares das cadeias pesadas de miosina, mas também pela repulsa eletrostática radial entre os filamentos, englobando assim a geometria tridimensional do músculo. Embora este seja um modelo mais completo, ainda não se determinou com detalhes moleculares os mecanismos de transdução da força radial para direção axial¹⁹, desta forma consideramos aqui um modelo simplificado, mas que é suficiente para explicar as nossas observações

1.2.2 Metabolismo energético no músculo esquelético

No tecido muscular esquelético, para dar suporte não somente aos processos comuns a outros tecidos e tipos celulares, mas também à contração, o metabolismo precisa se adaptar a uma ampla variedade de substratos energéticos, cujas concentrações flutuam com o tempo. Em um estado de repouso, o consumo de oxigênio pelos músculos é relativamente baixo se normalizado pela massa de tecido, no entanto, dado que pode compor 40% da massa total de um indivíduo não obeso, a contribuição do tecido muscular para a taxa de metabolismo basal é considerável²⁰.

Durante a contração, o consumo de oxigênio aumenta consideravelmente, e a intensidade e duração da atividade física determina qual sistema de substratos predomina, quanto mais intensa a atividade, maior a utilização das fontes mais rápidas. É importante mencionar que outros fatores afetam a capacidade metabólica muscular, como idade, nível de treinamento físico, alimentação, obesidade, disfunções no sistema nervoso central e período do ciclo circadiano²¹.

Fonte mais rápida para restauração do ATP consumido pela contração muscular é a fosfocreatina. A primeira etapa na síntese de creatina é da produção de guanidinoacetato a partir de L-arginina e glicina pela L-arginina:glicina amidinotransferase (AGAT). A S-adenosil metionina cede então um grupo metila para o guanidinoacetato numa reação catalisada pela guanidinoacetato metiltransferase (GAMT) produzindo creatina. Classicamente, o caminho biossintético acima envolve segregação espacial, com a segunda reação acontecendo principalmente no fígado e rins, desconsiderando a produção endógena do músculo, no entanto essa visão vem sendo desafiada por estudos recentes^{22,23}. As creatinas quinases (CKs) fosforilam a creatina a partir de ATP em condições de baixa demanda, gerando fosfocreatina (PCr), e catalisam a reação no sentido reverso quando há alta demanda de ATP, o que desloca o equilíbrio da reação²⁴. Nas miofibras, há uma divisão espacial das diferentes isozimas de CKs, no sarcolema, a creatina quinase citosólica se associa à linha M tamponando o ATP hidrolisado pelo complexo de actinmiosina; a isoforma mitocondrial (mtCK) é um octâmero presente no espaço intermembrana, associado ao translocador de nucleotídeos de adenina (ANT1/SLC25A4) e ao canal aniônico dependente de voltagem (VDAC). Esse contato próximo permite que o ATP transportado a partir da matriz mitocondrial seja rapidamente utilizado pela mtCK para produzir fosfocreatina, que pode ser então transportada para o sarcolema^{24,25}.

Durante exercícios de alta intensidade, realizados a 85% do volume máximo de oxigênio que o organismo é capaz de consumir (VO_2 máx.), a fonte principal de energia são carboidratos, seja a glicose captada da corrente sanguínea ou glicose gerada a partir do catabolismo de glicogênio pela glicogênio fosforilase²¹. As reações metabólicas apresentadas a seguir estão apresentadas na Figura 2. O comprometimento da glicose com a via glicolítica se inicia com a hexoquinase II no músculo, ou a glicoquinase em outros tecidos, como fígado e neurônios, que produz glicose-6-fosfato hidrolisando ATP, ou pela fosfoglicomutase que converte a glicose-1-fosfato gerada pela fosforilase do glicogênio, em glicose-6-fosfato. Há uma segunda etapa de gasto de ATP a jusante, na qual a enzima fosfofrutoquinase fosforila a frutose-6-fosfato produzindo

frutose 1,6-bifosfato. Em conjunto, essas etapas são chamadas de investimento e o saldo de ATP torna-se positivo nas etapas de pagamento, as quais produzem 2 NADH e 4 ATP por molécula de glicose, até a produção de piruvato²⁶. Em anaerobiose a glicose é oxidada parcialmente, e o piruvato é reduzido a lactato pela lactato desidrogenase, utilizando 2 NADH por molécula de glicose e, assim, recuperando o saldo de NAD^+ para que a glicólise seja sustentada²⁶. Em condições aeróbias, o piruvato entra no ciclo de Krebs e então na oxidação fosforilativa mitocondrial como acetil-CoA, onde o restante dos elétrons é capturado em FADH_2 e NADH produzindo CO_2 e O_2 .

O complexo da piruvato desidrogenase converte piruvato em acetil-CoA produzindo 1 CO_2 e 1 NADH por reação, posteriormente, a ação de 4 desidrogenases (DHase) reduz 3 moléculas de NAD^+ e 1 de FAD: isocitrato DHase, 2-oxoglutarato DHase, succinato DHase e malato DHase²⁶. Ainda, durante a conversão de succinil-CoA em succinato pela succinil-CoA sintetase, recupera-se a coenzima A e ocorre fosforilação de GDP a nível de substrato. Na fosforilação oxidativa, os elétrons coletados pelos equivalentes redutores NADH e FADH_2 são transferidos gradualmente até o aceptor final, oxigênio, sendo utilizados pelos complexos da cadeia transportadora de elétrons para produzir o gradiente eletroquímico entre o espaço intermembrana e a matriz mitocondrial²⁷. A dissipação desse gradiente pode ser acoplada à fosforilação de ADP quando os prótons retornam à matriz passando pela ATPsintase. Alternativamente, os prótons podem retornar à matriz através de proteínas desacopladoras (UCPs), não havendo síntese de ATP neste caso. Considerando-se 3 ATPs produzidos por molécula de NADH oxidada e 2 ATPs produzidos por molécula de FADH_2 oxidada, a oxidação completa da glicose tem como saldo 36 ATP em comparação aos 2 ATP produzidos pelo processo fermentativo²⁶.

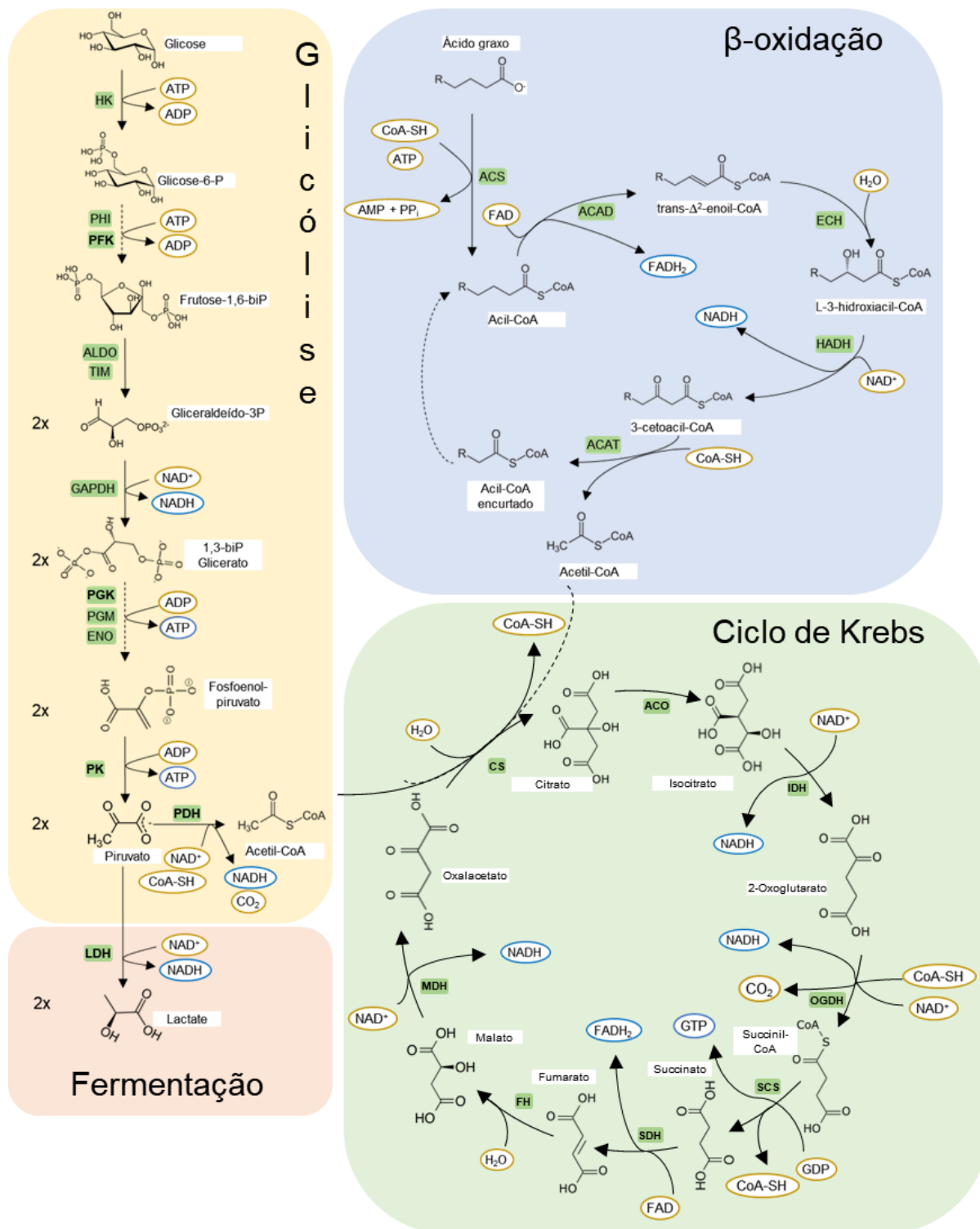


Figura 2 – Principais vias do metabolismo energético. No fundo amarelo, as reações da glicólise que produzem ou consomem ATP e reduzem NADH, finalizando com o piruvato, o qual pode ter destino anaeróbico na fermentação (fundo laranja) ou aeróbico no ciclo de Krebs (fundo verde).

No fundo azul, as etapas cíclicas da beta-oxidação, que leva ao encurtamento do ácido graxo saturado inicial em 2 carbonos, que são liberados como acetil-CoA, que pode ser oxidado no ciclo de Krebs Considerações: As setas são esquemáticas e não representam a reversibilidade da reação. Por fins ilustrativos, a maioria dos ácidos está na sua forma protonada, o que não representa o seu estado de ionização no pH intracelular, no entanto, como os nomes mais utilizados na literatura são das respectivas bases conjugadas, preferiu-se empregá-los aqui. Os prótons livres provenientes da redução de NAD^+ foram omitidos. HK: hexoquinase; PHI: fosfohexose isomerase; PFK: fosfofrutoquinase; ALDO: aldolase; TIM: triosefosfatoisomerase; GAPDH: gliceraldeído-3-fosfatodesidrogenase; PGK: fosfoglicerato quinase; PGM: fosfoglicerato mutase; ENO: enolase; PK: piruvato quinase; LDH: lactato desidrogenase; ACS: acil-CoA sintetase; ACAD: acil-CoA desidrogenase; ECH: enoil-CoA hidratase; HADH: hidroxiaçil-CoA desidrogenase; ACAT: tiolase; CS: citrato sintase; ACO: aconitase; IDH: isocitrato desidrogenase; OGDH: 2-oxoglutarato desidrogenase; SCS: succinil-CoA sintetase; SDH: succinato desidrogenase; FH: fumarato hidratase; MDH: malato desidrogenase.

Como moléculas hidrofóbicas, os lipídeos são transportados associados a proteínas tanto na corrente sanguínea como no sarcolema e são transportados para o sarcolema tanto por difusão passiva quanto facilitada, pelas proteínas FABPm, CD36 e FATP1²⁸. No citosol, os ácidos graxos se ligam às proteínas ligadoras de ácido graxo, como FABP4, e são utilizados pela acil-CoA sintetase para produzir acil-CoA de cadeia longa consumindo 2 equivalentes de ATP, a partir daí se associando a proteínas ligadoras de acil-CoA (ACBP). O transporte para a mitocôndria, ocorre com a mediação das carnitina acil-transferase (Cpt1b) da membrana externa da mitocôndria, que conjuga o acil-CoA graxo com carnitina, que por sua vez é transportado para a matriz mitocondrial e a reação é revertida pela Cpt2²⁸. Uma vez na mitocôndria, os ácidos graxos passam pela beta oxidação, na qual o carbono beta é oxidado consecutivamente pela ação de quatro enzimas, dentre elas 2 desidrogenases. Portanto, ao fim de cada ciclo da beta-oxidação 2 carbonos são removidos e 1 FAD e 1 NAD⁺ são reduzidos, produzindo um acil-CoA graxo mais curto e um acetil-CoA. Como o acetil-CoA pode entrar no ciclo de Krebs, descontando-se os ATPs necessários para a ativação do ácido graxo, um ácido-graxo-CoA de 16 carbonos produz 108 ATPs como saldo²¹.

Ao contrário de alguns lipídeos que podem atravessar o sarcolema, a glicose necessita de transportadores para chegar ao sarcoplasma, o que ocorre pela mediação de transportadores GLUT. O transportador GLUT4 (SLC2A4) seja talvez o de maior relevância quando se considera o papel do músculo na manutenção da homeostase glicêmica. No estado basal, GLUT4 se encontra em membranas do retículo de Golgi, nos endossomos e em compartimentos específicos chamados de vesículas de armazenamento de GLUT4. Sob a ação da insulina, essas vesículas membranosas se fundem ao sarcolema, aumentando a captação de glicose²⁹. A fusão e endocitose das vesículas de GLUT4 são processos dinâmicos e a ação da insulina promove a exocitose ao mesmo tempo que reduz a endocitose. O receptor da insulina (IR) é uma tirosina quinase transmembrana homodimérica formada por duas subunidades alfa, que se ligam à insulina, e duas subunidades beta que contém o domínio quinase intracelular³⁰. Ao se ligar, a insulina induz autofosforilações dos domínios intracelulares possibilitando o ancoramento de proteínas adaptadoras Shc e proteína 2 ligada ao receptor de fator de crescimento (GRB2), além do substrato 1 do receptor da insulina (*insulin receptor substrate 1*, IRS-1). Ao ser fosforilado, IRS-1 ativa a fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), que converte fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) em fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3), um ativador alostérico da quinase dependente de fosfatidilinositol (PDK). Esta,

por sua vez, ativa diferentes quinases a jusante, das quais a serino-treonino proteína quinase B/Akt, mais especificamente a isoforma 2³¹, tem contribuição majoritária para a captação de glicose no músculo. O alvo de Akt2 AS160 (TBC1D4) tem um domínio de ativação da atividade de GTPases, de maneira tal que, quando AS160 é fosforilado, proteínas 14-3-3 o sequestram, mantendo proteínas Rab presentes nas vesículas de GLUT4 na sua forma ativa associada a GTP^{32,33}. As proteínas Rab regulam o tráfego intracelular de vesículas e funcionam como núcleo de ancoramento. Quando ativadas pela insulina, as Rabs interagem com a syntaxina 4 na membrana celular e promovem a interação de proteínas SNAREs presentes tanto na membrana celular e quanto nas vesículas de GLUT4, promovendo a fusão de ambas^{34,35}.

A captação de glicose pelo músculo depende de fatores externos às miofibras, a concentração de glicose no sangue, o fluxo sanguíneo, e de fatores intracelulares, como o gradiente de glicose entre o interstício e o sarcoplasma, quantidade de GLUT4 na membrana, a atividade da hexoquinase e o fluxo de substratos na glicólise. No repouso a etapa limitante da glicólise é o seu transporte pela membrana, durante o exercício, com o aumento do fluxo sanguíneo e translocação de GLUT4 para o sarcolema e túbulos T, passa a ser a atividade da hexoquinase, tendo em vista que *K_m* de aproximadamente 10 mM garante resposta linear em decorrência a variações sanguíneas fisiológicas³⁶. Mecanismos independentes da insulina também agem no músculo durante o exercício para a aumentar a captação de glicose pela translocação de GLUT4 para a membrana, no entanto diferentes grupos de vesículas parecem ser ativados nas suas situações. Embora as concentrações de ATP mantenham-se relativamente estáveis durante o exercício físico, a razão ATP/AMP diminui, ativando a LKB1 que, por sua vez, ativa a quinase ativada por 5'-AMP (AMPK), uma proteína heterotrimérica que ativa diferentes vias para aumento dos processos catabólicos. Estudos mostram que a AMPK pode fosforilar TBC1D1 e TBC1D4, aumentando a permanência de GLUT4 na membrana celular^{37,38}. Os íons de cálcio são importantes sinalizadores que regulam diferentes etapas do metabolismo, como as desidrogenases de piruvato, isocitrato e 2-oxoglutarato, conectando a contração muscular diretamente à regulação metabólica, no entanto, os mecanismos pelos quais a sinalização mediada por cálcio aumenta a captação de glicose parecem ser em sua maioria indiretos através do aumento da demanda metabólica, por exemplo a partir do aumento da atividade das SERCAs³⁸.

Em indivíduos resistentes à insulina, a captação de glicose pelo músculo é diminuída, dessa forma aumentando, ao menos temporariamente, a glicemia sanguínea após as refeições e é

um dos primeiros marcadores da diabetes do tipo 2 (T2D). Molecularmente, os marcadores da atividade da via do IR para a translocação das vesículas de GLUT4 ou para síntese de glicogênio estão alterados^{39,40}. Um estudo recente utilizando mioblastos humanos reprogramados para pluripotência mostrou que indivíduos com T2D apresentam não somente redução de fosforilação dos sítios canônicos das vias de sinalização desencadeadas pela insulina, como também a fosforilação de sítios atípicos e aumento da fosforilação de outros resíduos⁴¹. Importante destacar que os autores descrevem um aumento na fosforilação de subunidades do complexo alvo da rapamicina de mamíferos (*mammalian target of rapamycin complex 1*, mTOR) e das proteínas a jusante 4E-BP1 e EIF4B, que regulam a síntese de proteína, e RPS6KB2, que regula o spliceossomo, conectando assim a resistência à insulina e a proteostase muscular. Embora diversos estudos tenham descrito as alterações moleculares da resistência a insulina em diferentes contextos, os mecanismos pelos quais a doença ainda não inteiramente estabelecidos. Atualmente, a hipótese de que o aumento sustentado de ácidos graxos circulantes, em níveis que superam a capacidade oxidativa, levam à produção de espécies parcialmente oxidadas de acil-carnitinas que, possivelmente, ativam vias de sinalização pró-inflamatórias. No entanto, os mecanismos moleculares para a ação das acil-carnitinas ainda carece de elucidação, já que outros produtos da oxidação incompleta também poderiam estar associados com o aparecimento de resistência à insulina^{42,43}. Uma outra teoria em competição é a de que a ativação de proteínas quinases C por diacilgliceróis promove a fosforilação de resíduos do IRS1^{44,45}. O ponto unificante nas teorias vigentes sobre o fator etiológico da resistência à insulina é o defeito na capacidade oxidativa da mitocondrial⁴⁶, seja causado pelo aumento de acil-carnitinas, espécies parcialmente oxidadas de ácidos graxos ou pelo acúmulo de outras espécies de lipídeos, ou pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigênio. As espécies reativas de oxigênio (ROS) podem ser produzidas em diferentes compartimentos celulares: ciclooxigenases, óxido nítrico sintases e xantina oxidases no sarcoplasma e as NADPH oxidases em compartimentos membranosos. No entanto, a maior contribuição para a produção de ROS vem das mitocôndrias⁴⁷. Nestas organelas a produção de ROS ocorre pela fuga de elétrons na cadeia transportadora de elétrons (ETC), principalmente nos complexos I, II e III, produzindo superóxido que é posteriormente detoxificado a espécies menos reativas pelo sistema antioxidante. A transferência de elétrons ocorre na membrana interna da mitocôndria e acopla o processo exergônico redox, no qual os elétrons são transferidos do menos para o maior potencial de oxidação, com um processo endergônico, de transporte de prótons contra

o gradiente eletroquímico, assim as reações diretas de transferência são favorecidas quanto maior a diferença de potencial redox entre os doadores e aceptores⁴⁸. Dessa forma, o estado redox da ETC é o principal fator na produção de espécies reativas de oxigênio, em outras palavras, a redução da demanda de ATP ou danos na ETC aumentam a razão de NADH/NAD⁺, a produção de superóxido aumenta⁴⁸. Embora as ROS tenham um papel importante na manutenção da homeostase celular, o aumento suprafisiológico das suas concentrações leva à oxidação de proteínas, incluindo os receptores de insulina e as enzimas do ciclo de Krebs e da beta oxidação, além de organelas membranosas, incluindo a membrana mitocondrial. O desacoplamento moderado via proteínas desacopladoras auxilia a contrabalancear o aumento na produção de ROS⁴⁶. De fato, produtos da peroxidação de ácidos graxos, como o 4-hidroxinonenal, promovem a atividade da Ucp3⁴⁹⁻⁵¹ e células musculares *knockdown* para *UCP3* apresentam aumento significativo na produção de ROS quando submetidas a uma sobrecarga de palmitato⁵². A exemplo da importância da Ucp3 para o metabolismo de lipídeos e manutenção da homeostase redox, diversos estudos de genética de população indicam que polimorfismos na região promotora de *UCP3* em humanos apresentam correlação direta com a frequência de resistência à insulina e obesidade⁵³⁻⁵⁶. Em conclusão, o aumento sustentado da oferta energética através de ácidos graxos ou glicose, sem o acompanhamento da demanda energética, aumenta o aporte dos equivalentes redutores e a produção de espécies reativas, que causam danos mitocondriais e podem levar ao aparecimento da resistência à insulina.

1.2.3 Sarcopenia e doenças musculares

A sarcopenia é a perda de massa muscular e redução na produção de força associadas ao envelhecimento e é um exemplo da relação intrínseca entre a manutenção da função muscular e da atividade mitocondrial⁵⁷. Um estudo recente com adultos sarcopênicos e controles com mesmo índice de massa corporal reportou aumento na inflexibilidade metabólica, com a taxa de oxidação de lipídios consideravelmente aumentada mesmo em estado pós-prandial e intolerância a glicose em teste de tolerância oral⁵⁸. Em indivíduos idosos, a ineficiência em remover a glicose sanguínea está associada à resistência à insulina, à redução no fluxo de metabólitos para o ciclo de Krebs no músculo e à redução na produção de ATP no músculo⁵⁹. Em linha com esses achados, a alteração no perfil transcricional dos genes mitocondriais é a principal marcação molecular para sarcopenia em músculos de humanos de diferentes etnias⁶⁰. O aumento na produção de ROS também tem papel importante para o estabelecimento da sarcopenia, pela oxidação direta do aparelho contrátil

e de outras proteínas estruturais e pela inativação da via da mTOR. O complexo mTORC1 tem papel ambivalente na manutenção da proteostase muscular: a sua ativação pela Akt leva à fosforilação do fator de transcrição *forkhead box* (FOX) O3, que o mantém retido no citoplasma e impede a transcrição de genes do sistema ubiquitina proteassomo; além de promover a redução da proteólise via sistema ubiquitina-proteassomo, o complexo da mTORC1 também reduz a degradação lisossomal via fosforilação de ULK1 e promove a biossíntese de proteínas ao inativar o repressor traducional 4E-BP1; por outro lado a ativação sustentada da mTORC1 leva à uma inibição por retroalimentação negativa via quinase B1 da proteína ribossomal (*S6 Ribosomal Protein S6 Kinase B1*, S6K1) e IRS1, de maneira que alta atividade da mTOR é característica da sarcopenia⁶¹. Além da função direta nas miofibras, a produção de espécies reativas de oxigênio em mitocôndrias nas junções neuromusculares está associada a denervação muscular, que leva ao aumento da proteólise e conseguinte perda de massa⁵⁷. Distúrbios na atividade mitocondrial são marcadores de diversas outras doenças musculares^{62,63} e, além da ação de ROS, essa ligação intestinal também é reforçada por distúrbios na homeostase de cálcio⁶⁴. A concentração mitocondrial de cálcio é resultante do processo dinâmico de influxo através do transportador uniporte de cálcio mitocondrial (MCU) e do efluxo dependente de sódio, através do trocador de sódio-cálcio (NCXL)⁶⁵ e de mecanismos independentes de sódio. O aumento das taxas de influxo de cálcio leva à abertura do poro de transição de permeabilidade (PTP) e à consequente ativação de mecanismos de apoptose e necrose, além disso o excesso de cálcio tem efeito sinérgico com ROS na abertura do PTP⁶⁶.

1.2.4 Regulação transcricional da miogênese: enfoque em receptores nucleares

O desenvolvimento do tecido muscular a partir de células progenitoras é uma questão intrigante e central para a compreensão dos mecanismos de manutenção da massa e da função muscular em estados fisiológicos e patológicos, de maneira que os mecanismos que regulam e que constituem o alto grau de especialização das miofibras estão intimamente conectados com a regulação do processo de contração e do metabolismo. Tendo em vista que os achados sobre a função do Nr2f6 perpassam todas essas categorias, torna-se importante abordar pontos pertinentes para a compreensão dos resultados referentes à miogênese.

Em organismo multicelulares, todas as células se originam de uma única célula progenitora, logo, a formação de tecidos maduros depende na determinação sequencial do destino celular passando por células com fenótipos e capacidade de diferenciação intermediários. Esse

processo é o resultado de uma fina modulação espaço temporal da atividade de proteínas e da expressão de diferentes RNAs por sinais intracelulares e extracelulares, sendo, portando, direta ou indiretamente dependente da ação de fatores de transcrição⁶⁷. De fato, já se sabe há algum tempo que a coexpressão ectópica dos fatores de transcrição *OCT4*, *SOX2*, *KLF4* e *MYC* (OSKM) é suficiente para induzir um estado pluripotente em fibroblastos maduros⁶⁸. Como já abordamos, o músculo esquelético se destaca como exemplo de especialização celular, e uma questão importante nos primeiros estudos de embriogênese é como o tecido muscular se forma a partir de células com morfologia tão diferente. Hoje, abordagens genéticas e tecnologias que avaliam células individuais vêm dissecando as vias intrínsecas e extrínsecas que orientam a miogênese.

À exceção dos músculos da cabeça e pescoço, os músculos esqueléticos se originam de um conjunto comum de células progenitoras chamadas de somitos. Os somitos são formados após a segmentação de uma estrutura chamada de mesoderma paraxial, que corresponde a um conjunto de células nas proximidades da notocorda uma estrutural tubular que serve como esqueleto do embrião em desenvolvimento. As estruturas embrionárias que originam os músculos estão ilustradas na Figura 3A e B. Durante esse processo, o mesoderma paraxial se divide em posterior, composto de progenitores de somitos, e anterior, formado por somitos migrando para porção mais rostral⁶⁷. A divisão espacial durante diferenciação dos precursores em somitos é garantida pelo gradiente de moléculas sinalizadoras, dando origem a assinaturas transcricionais específicas em cada domínio do mesoderma paraxial: o ácido retinóico secretado pelo mesoderma préssomítico anterior promove a diferenciação e contrabalança a ação da sinalização por Wnt/FGF na porção caudal⁶⁷. Simultaneamente, os morfogênicos como *sonic hedgehog* (Shh) liberados nas proximidades da placa lateral e ao redor da notocorda contribuem para a compartimentalização dos somitos ao longo do eixo dorsoventral. Nesta etapa do desenvolvimento, a miogênese se inicia pela ativação de *Myf5* e repressão de *Pax3* na porção dorsomedial⁶⁹, como ilustrado na Figura 3C. Esse novo grupo de células constitui o miotomo e passa a expressar marcadores de linhagem miogênica como *MYH7*, *MYH3*, *ACTC1*, *ACTA* e desmina logo após a primeira divisão mitótica. A elongação do miotomo é concomitante com a formação de fibras multinucleadas, com mais células positivas para *Pax3* vindo do dermomioto, colaborando para a miogênese tardia. Finalmente, a formação do miotubo maduro é controlada pelos fatores de determinação *Myf5*, *Mrf4*, *MyoD* e o fator de diferenciação miogenina, o qual é responsável pela consolidação dos estágios finais da miogênese⁷⁰. Nesse estágio, a miogênese pode ser dividida em primária (inicial) e secundária

(terminal), a primeira compreendendo células formadas por progenitores positivos para Pax3 e o segundo formado por um subgrupo de células negativas para Pax3 e positivas para Pax7⁷¹. Além do gradiente de moléculas sinalizadoras, o contato célula-célula também tem um importante papel durante a formação do miotomo: na membrana das células da crista neural, a via da Notch é ativada por Wnt1 e reprime a atividade de GSK3b ao mesmo tempo que estabiliza Snail, levando a delaminação de células para o miotomo crescente⁶⁷.

No músculo maduro os mioblastos positivos para Pax7 provenientes do dermomioto constituem as células satélite, células quiescentes que quando ativadas contribuem para a regeneração e crescimento do músculo⁷⁴. Em músculos dos membros, não há expressão de Pax3 nas células satélite e a presença de Myf5 é heterogênea. Assim, as células satélite sob a membrana basal, parecem entrar e sair da quiescência para a miogênese, o que é marcado pela presença de Myf5 e MyoD e podem entrar no processo de diferenciação quando passam a expressar miogenina e *MRF4*⁶⁹. Ainda que o estudo do controle transcricional da miogênese tenha gerado um importante corpo de conhecimento sobre a miogênese embrionária e adulta, apontando para atores centrais como Pax7, MyoD e Myf5, novos reguladores transcricionais vêm sendo descobertos, vários dos quais são membros da família dos receptores nucleares^{76,77} como exposto nos próximos parágrafos.

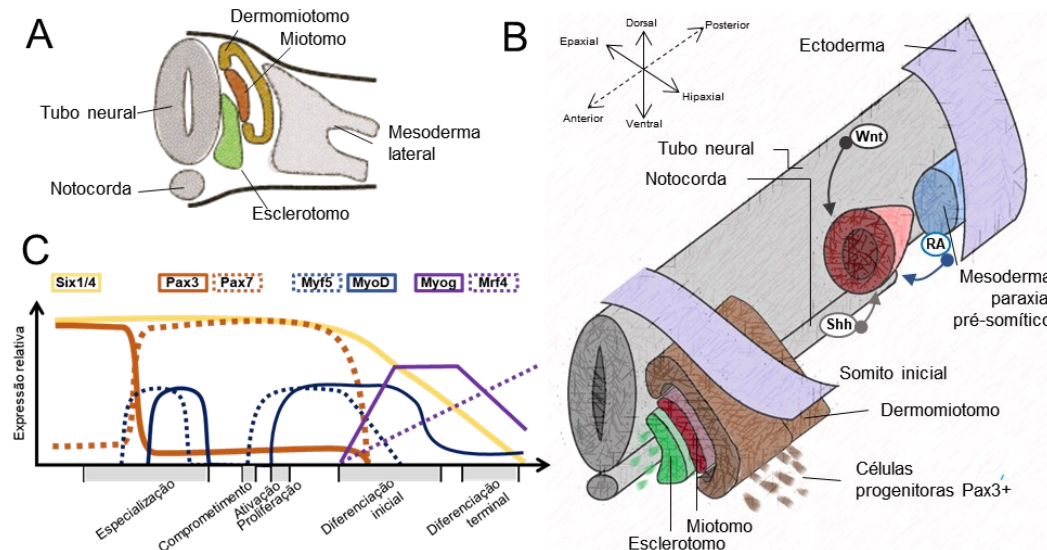


Figura 3 – Miogênese embrionária e sua regulação. (A, B) Corte transversal e em perspectiva das estruturas embrionárias que dão origem aos músculos esqueléticos. (C) Fatores de transcrição que regulam a miogênese e a sua expressão durante o processo de diferenciação. Shh: *sonic hedgehog*; RA: ácido retinóico. Figura adaptada e elaborada partindo de diferentes fontes⁷²⁻⁷⁵.

Os receptores nucleares (NR) foram descritos primeiramente como proteínas nucleares que se ligavam a hormônios responsáveis por traduzir mudanças ambientais em adaptações transcricionais. Estudos posteriores revelaram que essas proteínas podem ser diretamente moduladas por outras pequenas moléculas além de hormônios endócrinos, como ácidos graxos, xenobióticos e derivados de colesterol, no entanto nem todo NR tem um ligante definido, sendo então classificados como órfãos⁷⁸. Estruturalmente, como ilustrado na Figura 4, todos NRs são compostos por um motivo dedo de zinco de ligação ao DNA (DBD) conectado por uma alça variável a um domínio C-terminal de ligação à ligante (LBD), que também inclui a região de dimerização⁷⁹. A estrutura do DBD dita a sequência de DNA à qual o NR pode se ligar⁸⁰, chamada de elemento responsivo. Alguns membros também possuem domínios de função ativadora (AF) na porção N- ou C-terminal, que pode interagir com ativadores transcricionais como SRC1 e PGC-1 α ⁷⁹. Os NRs podem interagir com diversas outras proteínas, como o complexo mediador, acetiltransferases de histonas, complexos de processamento de RNA, e complexos remodeladores da cromatina em promotores ou *enhancers*, de maneira dependente ou independente do ligante⁸¹. Essa flexibilidade garante que os NRs possam modular diferentes vias em contextos tão variados quanto metabolismo de lipídios, resposta do sistema imune e organogênese de acordo com seus parceiros de interação. E reforçando a importância dos receptores nucleares para a biologia muscular, dados de microarranjo de RNA disponíveis no *Expression Atlas* do *European Bioinformatics Institute* de camundongos adultos mostram que apenas 11 (Hnf4a, Nkx3-1, Nr1h4, Nr1h5, Nr1i2, Nr1i3, Nr2e1, Nr2e3, Nr5a1, Nr5a2, Pgr, Vdr, and Rorb) dos 47 receptores nucleares não são detectáveis. Os receptores Arnt, Esrra, Nr1d1, Nr1h2 and Nr4a1 são os de maior expressão no tecido muscular. Nos próximos parágrafos descrevemos a função de alguns grupos de receptores nucleares órfãos ou adotados na diferenciação muscular.

Um trabalho elegante do grupo de George Muscat demonstrou que Nr1d1 (Rev-ErbA α) pode reprimir a miogênese em células C2C12 ao impedir a formação dos dímeros entre os receptores do hormônio da tireoide e do receptor retinoide X (TR-RXR) nos elementos responsivos de promotores de MRFs, uma interação mediada pela porção C-terminal que contém o LBD. Além disso, o silenciamento de *NR1D1* é suficiente para ativar a expressão precoce de miogenina e p21⁸⁶. Experimentos de ChIP de larga escala indicam que RXR ancora nos promotores de diferentes MRFs *in vivo* e sua função repressiva é amplamente dependente com a interação com a subunidade B do complexo de fatores de transcrição NF-Y nos motivos CCAAT⁸⁷. De acordo, camundongos

nocaute para *Nr1d1* se recuperaram de injúrias musculares mais rapidamente⁸⁷. Curiosamente, vários atrogenes também são induzidos pelo nocaute de *Nr1d1* e reprimidos pela sua superexpressão mediada por vírus adenoassociados⁸⁸.

Os membros do grupo NR1F (*RORα*, *RORβ* e *RORγ*) são conhecidos por regular importantes genes do ciclo circadiano em diferentes tecidos⁸⁹ e a investigação da função dos NR1Fs na biologia muscular também tem sido um campo prolífico. A expressão de *RORA* e *RORG* aumenta durante a miogênese de células C2C12, o primeiro atingindo o pico em miotubo completamente diferenciados e o segundo no segundo dia de diferenciação. Ambas as proteínas parecem regular transcricionalmente uma à outra, já que a superexpressão estável de um dominante negativo de *RORα* impediu a expressão de *RORG* e reduziu a expressão endógena de *RORA*, além de miogenina, p21 e ciclina D1⁹⁰. *RORα* regula a biologia muscular atuando em diferentes frentes⁹¹, a nível transcricional, reprime diretamente a atividade do promotor de miogenina⁹². A nível proteico, a porção C-terminal de *RORα* pode interagir com MyoD1 e com a acetiltransferases p300⁹³, no entanto, se essa interação específica é necessária para miogênese ainda não foi determinado. Os RORs são constitutivamente ativos e seus ligantes atuam como agonistas inversos, se ligando ao LBD e alterando a afinidade por coativadores⁹⁴. A identificação de ligantes endógenos ainda é controversa, provavelmente em decorrência do amplo volume da cavidade do ligante no LBD, que pode acomodar diferentes classes de moléculas, no entanto, evidências apontam que derivados de colesterol têm relevância fisiológica⁹⁵.

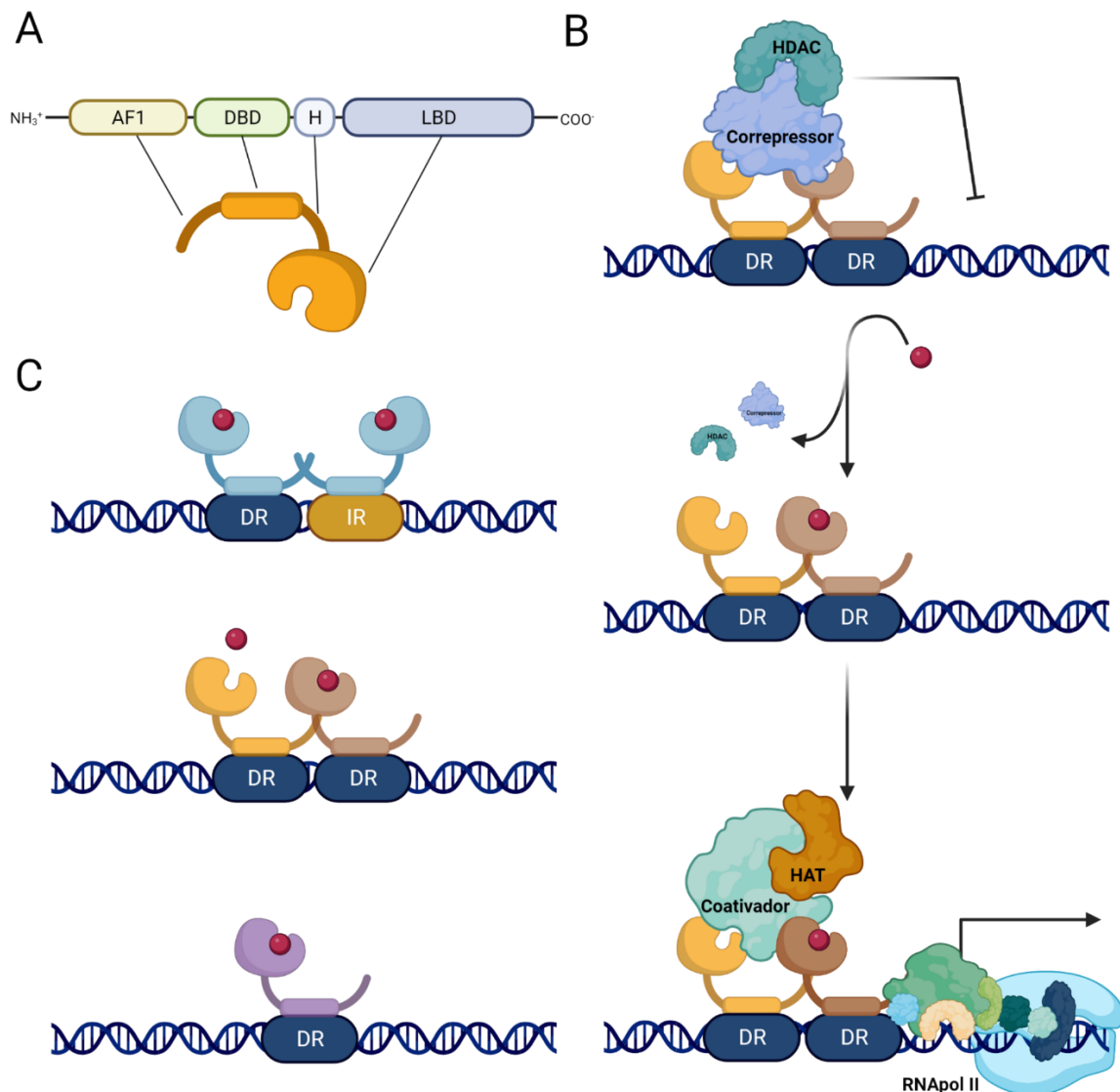


Figura 4 – Mecanismos de ação e estrutura dos receptores nucleares. (A) Domínios funcionais de um receptor nuclear canônico. (B) Exemplo de regulação da atividade de NRs por pequenas moléculas. A ligação de um agonista, em vermelho, induz mudanças conformacionais em nos receptores nucleares, o que reduz a sua afinidade pelos correpressores, fazendo com que aumente a interação com coativadores da transcrição. (C) Os receptores nucleares se ligam a sequencias específicas no DNA que podem se organizar em pares e se orientar em diferentes direções. AF1: domínio *activation function* 1; DBD: domínio de ligação ao DNA; H: alça variável; LBD: domínio de ligação à ligante; HDAC: histona deacetilase; HAT: histona acetil transferase; DR: repetição direta; IR: repetição inversa. Figura adaptada de diferentes fontes^{82–85}.

Estudos com ganho e perda de função revelaram um decréscimo na massa muscular de camundongos nocaute para Nr4a1 e, embora o oposto não tenha sido observado com o animal transgênico, este último teve aumento na área transversal das fibras musculares, indicando a participação de Nr4a1 na organogênese muscular⁹⁶. A modulação da massa muscular por Nr4a1 está relacionada com a inativação de FoxO3a pelas quinases Akt e SMAD2/3. Na continuação deste estudo, o papel de Nr4a1 no desenvolvimento muscular foi dissecado⁹⁷, mostrando que o nocaute muscular específico leva à redução específica da área de fibras do tipo II e aumenta a proporção de fibras do tipo IIB em relação a IIX no músculo plantar e sóleo. A superexpressão de *NR4A1* em C2C12 levou apenas a modulações discretas da diferenciação, com aumento de MyHCI e MyHCII. Nos experimentos *in vitro*, os efeitos do nocaute também foram mais pronunciados do que a superexpressão, de maneira que as células nocautes não se diferenciaram corretamente, o que foi acompanhado por um aumento da expressão de Pax7 e repressão de miogenina⁹⁸.

Também conhecido como fatores de transcrição a jusante da ovalbumina de galinha (COUP-TFs), os três membros do grupo NR2F, a seguir: Nr2f1 (COUP-TFI), Nr2f2 (COUP-TFII) e Nr2f6 (COUP-TFIII) são classificados como órfãos. Estudos iniciais revelaram uma correlação negativa entre a expressão de *NR2F2* e a miogênese em células C2C12⁹⁹ e, posteriormente, foi demonstrado que essa repressão acontece funcionalmente através da interação entre a porção N-terminal de MyoD1 e Nr2f2 competindo pela ligação com p300¹⁰⁰. O conteúdo proteico de Nr2f2 reduz com a miogênese de C2C12 e a sua expressão ectópica reduz o índice de fusão, o número de células positivas para MyHC e o conteúdo de creatina quinase. Investigações *in vivo* do nocaute condicional NR2F2 Myf5-Cre, indicaram considerável prejuízo no desenvolvimento do diafragma, sendo letal para neonatos. Esse efeito pôde ser explicado pela repressão direta de genes envolvidos no processo de fusão de mioblastos, como nefropectina (*NPNT*), caveolina 3 (*CAV3*) e integrina $\beta 1$ (*ITGB*)¹⁰¹. Embora os três membros do grupo NR2F compartilhem 60% de identidade de sequência, os outros dois membros não foram estudados ou apontados no contexto de miogênese.

1.2.5 Regulação do metabolismo energético muscular mediada por receptores nucleares

A modulação através de moléculas lipofílicas como ácidos graxos e hormônios, confere a certos receptores nucleares um papel importante na conexão entre as flutuações metabólicas e as respostas transcricionais associadas. Nos primeiros estudos, os NRs foram descobertos como efetores de respostas hormonais e, atualmente, essa família de fatores de transcrição compreende

48 proteínas em humanos e 49 em murinos¹⁰² e diversos dos seus membros, tais como receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs) e receptores relacionados ao receptor de estrogênio (ERRs), são reguladores da função mitocondrial nos tecidos hepático, muscular, adiposo e no pâncreas endócrino^{103–105}. No entanto, essa regulação também deve estar coordenada com outros sensores energéticos como a AMPK e mTOR e com a atividade de proteínas interactoras, como os coativadores SRC1 e PGC-1 α já mencionados e correpressores, tais como o correpressor de receptores nucleares 1 (NCoR1), a proteína interactora de receptores 140 (RIP140) e p mediador do silenciamento dos receptores de ácido retinóico e do hormônio da tireoide (SMRT).

O regulador dos processos de biogênese e função mitocondrial mais estudado é PGC-1 α , descrito inicialmente como ativador do fator de transcrição PPAR γ no tecido adiposo durante a adaptação termogênica em animais expostos ao frio¹⁰⁶. Posteriormente, descobriu-se que PGC-1 α atua como coativador de diversos outros fatores de transcrição, tais como PPAR α/β ou δ , fator nuclear de respiração 1 (NRF1/2), ERR $\alpha/\beta/\gamma$ ¹⁰⁷, convergindo em si diferentes vias de sinalização que culminam no aumento da função e/ou densidade mitocondrial, tais como as vias da AMPK e das sirtuínas, que interagem diretamente com PGC-1 α ¹⁰⁸ e o modificam por fosforilação e deacetilação, respectivamente. Além de PGC-1 α ser necessário para a completa ativação de genes a jusante de AMPK, a sua fosforilação nos resíduos T177 e S538 pela AMPK aumentam sua atividade transcricional sobre o próprio promotor¹⁰⁹. Além disso, há indícios de que AMPK interaja com PPAR δ , paralelamente a PGC1- α , de maneira que essa interação pode ser importante para mediar os efeitos miméticos do exercício físico em camundongos tratados com o agonista de PPAR δ GW501516 e 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribofuranosídeo (AICAR), um ativador de AMPK¹¹⁰. É importante ressaltar que as altas concentrações AICAR necessárias para ativação da AMPK levam a ativação de outras quinases¹¹¹ e que há evidências de que alguns dos efeitos de GW501516 são independentes de PPAR¹¹². Recentemente, reconheceu-se que PGC-1 α também participa da regulação pós-transcricional, ligando-se a regiões intrônicas de mRNAs, estes enriquecidos em transcritos relacionados à resposta ao glucagon no fígado¹¹³. Ainda que PGC1- α tenha papel chave na regulação de genes mitocondriais codificados pelo núcleo, camundongos nocaute músculo-específico para PGC1- α , não apresentaram defeitos no conteúdo mitocondrial, na capacidade de contração muscular, na composição dos tipos de fibras ou na capacidade de corrida voluntária¹¹⁴, embora apresentem defeitos nos parâmetros respiratórios. Adicionalmente, estes animais apresentaram aumento na expressão de proteínas mitocondriais após o treinamento

físico¹¹⁵, indicando a existência de outros mecanismos de regulação da biogênese e função mitocondrial independentes de PGC-1 α . De fato, novos reguladores transcricionais do processo de biogênese mitocondrial vêm sendo descritos nos últimos anos^{116–118}. O correpressor NCoR1 antagoniza a ativação gênica promovida por PGC-1 α em genes coordenados por PPAR δ e, principalmente, ERR α ^{119,120}. O nocaute músculo específico de NCoR1 promove a fosforilação de AMPK e o aumento no VO₂máx, ao mesmo tempo que reduz a capacidade de produção de força⁸⁶. NCoR1 também é regulado pela mTOR no contexto de produção de corpos cetônicos no fígado, onde promove a retenção de NCoR1 no núcleo via seu substrato quinase S6 (S6K), o que inibe a ativação de PPAR α . Além disso, mTOR participa de eixos regulatórios de ERR e do receptor de andrógeno (AR) promovendo a transcrição de genes do sistema proteossomal e genes do metabolismo oxidativo, respectivamente¹²¹.

Os PPARs são receptores nucleares que podem ser ativados por lipídeos, como ácidos graxos saturados e insaturados, prostaglandinas e leucotrienos e, de maneira condizente, regulam a adipogênese e o catabolismo e lipídeos¹²². Dentre os genes regulados por PPAR, estão enzimas chave do metabolismo de lipídeos, incluindo a Cpt1 que catalisa a etapa limitante da beta-oxidação, o transportador de lipídeos CD36 e piruvato desidrogenase quinase 4 (PDK4), enzima reguladora do complexo da piruvato desidrogenase (PDH)¹²³. Os PPARs atuam formando heterodímeros com RXR de maneira cooperativa com o DNA em elementos responsivos compostos por duas sequências AGGTCA em sequência separadas por cinco ou menos bases¹²⁴, chamados de PPRE. No tecido muscular, o PPAR δ é o mais bem caracterizado. Estudos com animais transgênicos músculo-específico expressando uma forma fusionada constitutivamente ativa de PPAR δ (VP16-PPAR) apresentam aumento do número de fibras oxidativas e do conteúdo de proteínas mitocondriais no músculo e resistência ao aumento de adiposidade e a intolerância a glicose induzida por dieta rica em lipídeos¹²⁵. Por outro lado, animais nocaute músculo específico apresentam aumento de fibras glicolíticas, redução na expressão de genes mitocondriais do metabolismo oxidativo, pré-disposição ao aumento adiposidade induzida por dieta e piora no controle glicêmico, quando desafiados com dieta rica em lipídeos¹²⁶. Em humanos, polimorfismos de nucleotídeo único em *PPARD* foram associados com alterações na sensibilidade à insulina, particularmente no músculo esquelético¹²⁷. Embora a ativação de PPAR promova o metabolismo oxidativo, estudos mostram que a sua ação é atenuada pela depleção de PGC1A ou de subunidades da AMPK^{112,128–130}, indicando dependência destes fatores.

Assim como os PPARs, os ERRs se apresentam em três isoformas (α , β , γ), dentre as quais $ERR\gamma$ é a mais bem caracterizada no músculo esquelético¹³¹. A expressão de todas as isoformas de ERR é maior em músculos mais oxidativos, como o sóleo, do que em músculos mais glicolíticos, como EDL e, proporcionalmente a expressão de *ERRA* e *ERRG* é maior em músculos oxidativos^{132,133}. Camundongos *ERRG* transgênicos apresentam aumento no tempo de corrida, aumento na capacidade de oxidação de ácidos graxos medida pelo consumo de palmitoil-carnitina em mitocôndrias isoladas e, consistentemente, esses animais apresentaram maior conteúdo mitocondrial. Em animais nocaute para PGC-1 α/β , a transgenia de *ERRG* é capaz de atenuar, embora apenas parcialmente, os efeitos deletérios na produção de espécies reativas de oxigênio, no conteúdo mitocondrial e na capacidade de corrida¹³⁴. Recentemente, em um estudo utilizando animais duplo nocaute combinando isoformas, foi demonstrado que as três isoformas de ERR são importantes para a manutenção do metabolismo oxidativo no músculo esquelético¹³². Ao contrário dos PPARs, não foram encontrados ligantes endógenos para ERR e evidências indicam que podem assumir uma conformação ativa transcricionalmente ao interagir com co-ativador¹³⁵, sem necessidade de ligante.

1.2.6 O receptor nuclear órfão Nr2f6

A descoberta do receptor nuclear Nr2f6 foi feita em 1988 com a clonagem do cDNA humano durante a investigação de genes homólogos a um fator de virulência do vírus da eritroblastose aviária denominado v-erbA¹³⁶. Logo em seguida, foi atribuída uma função celular ao Nr2f6, quando foi demonstrado que, juntamente com seus homólogos Ear-3 (Nr2f1), HNF4 (Nr2a1) e ARP-1 (Nr2f2), era capaz de se ligar a cis-elementos regulatórios presentes nas regiões promotoras dos genes das Apolipoproteínas B, CIII e AII reprimindo-os. Curiosamente, embora os quatro homólogos se liguem aos mesmos elementos regulatórios, eles apresentam diferentes constantes de afinidade pelo DNA e sofrem graus diferentes de perturbação na interação provocada pela metilação da sequência a qual se ligam e, dentre eles, apenas o HNF4 atua como ativador da transcrição nos promotores então testados¹³⁶⁻¹³⁸. Já em 1992, mostrou-se que Nr2f6 é capaz de reprimir a transativação estimulada por ácido retinóico do elemento responsivo de RXR do promotor da *cellular retinol binding protein II (CRBPII)*¹³⁷. Dois trabalhos publicados nos anos subsequentes descreveram a clonagem do gene de Nr2f6 murino e a sua expressão durante a diferenciação embrionária, durante a qual, a expressão de Nr2f6 é detectável sem tratamento, mas

é estimulada em três vezes com o tratamento com ácido retinóico. Novos alvos de regulação por Nr2f6 foram descobertos posteriormente, tornando claro que a atividade repressora é dependente do tipo celular estudado. Por exemplo, em células renais CV-1, Nr2f6 não reprime a atividade de elementos responsivos do receptor de ácido retinóico β (RARE β)¹³⁷, no entanto Nr2f6 traduzido *in vitro* e aquele derivado de extrato nuclear de queratinócitos é capaz de se ligar a diferentes elementos responsivos ao ácido retinóico (RAREs)^{139–141}. Assim como os outros COUP-TFs, Nr2f6 pode se ligar a repetições diretas (DRs) no promotor da oxitocina humana (hOT) e de reprimir ativamente sua transcrição¹⁴². Posteriormente, o mesmo grupo evidenciou que Nr2f6 pode transreprimir a hOT induzida por estrógeno em células Neuro-2A e Ishikawa, se ligando-se diretamente ao elemento responsivo a estrogênio (ERE)^{141,143}. Nr2f6 e a *Actin Related Protein 1 Homolog A* (Actr1a) formam homo e heterodímeros *in vitro* e *in vivo* de maneira cooperativa com sequências específicas de DNA, de maneira que homodímeros de Nr2f6 tem alta preferência por sondas DR1, mas os heterodímeros Nr2f6: Actr1a interagem com DRs de 1-5, com maior afinidade por DR1 e DR2¹⁴⁴.

A função *in vivo* de Nr2f6 foi primariamente determinada no sistema imune, no qual está fortemente relacionado com a resposta imune ao câncer, mecanisticamente os trabalhos mostram que Nr2f6 em seu estado basal está ancorado ao DNA em elementos responsivos a hormônio (HRE) e se dissocia após fosforilação em resíduos do domínio DBD via proteína quinase c (PKC)^{145,146}, a saída permite o ancoramento de NF-AT/AP1 e ROR γ no promotor da interleucina 17A¹⁴⁷. Animais nocaute para Nr2f6 com tumor induzido ou transplantado tem aumento drástico na taxa de sobrevivência mediado pela hiperresponsividade de linfócitos T¹⁴⁸. Além da sua relevância no câncer, no sistema imune e no desenvolvimento cerebral^{148–150}, a literatura vem reunindo evidências de que Nr2f6 também pode ser um importante regulador do metabolismo. Em linhagens de adipócitos 3T3-L1, a expressão de Nr2f6 é reprimida pelo fator de transcrição Snail e essa repressão faz parte de um programa transcricional que inibe a diferenciação adipogênica¹⁵¹. Neste contexto, a superexpressão de Nr2f6 contrapõe os efeitos de Snail1 e promove a diferenciação através da repressão de IL-17A. Já no fígado, Nr2f6 promove a esteatose hepática através da transativação direta da expressão de CD36. Em diferentes modelos de aumento de ácidos graxos circulantes e esteatose hepática, a saber: animais em dieta rica em gorduras, animais *db/db* e *ob/ob* e dieta para indução de esteatose não alcoólica, há um aumento da expressão e conteúdo proteico de Nr2f6. Por outro lado, o tratamento com metformina reduz o conteúdo de Nr2f6¹⁵². É

interessante notar que o a superexpressão de CD36 no músculo e no fígado tem efeitos opostos. Animais transgênicos músculo específico para CD36 apresentam melhora no controle da homeostase glicêmica, redução de lipídeos circulantes e aumento da oxidação de ácidos graxos^{153,154}, este último efeito também observado após a eletroporação em músculo tibial anterior¹⁵⁵. De maneira consistente, o nocaute de CD36 leva a uma piora da captação e oxidação de ácidos graxos pelo músculo esquelético¹⁵⁶. Além disso, CD36 participa da regulação de AMPK formando um ponto de nucleação da interação entre a quinase a montante LKB1 e AMPK, com evidências de que, na presença de ácidos graxos, há a aumento da interação e, consequentemente, de ativação de AMPK^{157,158}. Embora não haja estudos funcionais, polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) no gene *NR2F6* foram identificados em análises de marcadores por associação genômica global (GWAS) associando-os à diabetes tipo I¹⁵⁹. Outro estudo, apontou Nr2f6 como regulador chave para a eficiência energética em bovinos¹⁶⁰, acumulando indícios de que Nr2f6 pode participar do metabolismo energético em outros tecidos além do fígado. Tendo em vista a centralidade do músculo esquelético para a manutenção da homeostase energética sistêmica, levantamos a hipótese de que Nr2f6 atua como modulador do metabolismo oxidativo e da função muscular. Dessa maneira, nosso objetivo é investigar os efeitos moleculares e funcionais da superexpressão e da depleção do receptor nuclear Nr2f6 no músculo esquelético *in vivo* e *in vitro*.

2. REFERÊNCIAS

1. Junqueira, L. C. & Carneiro, J. *Histologia Basica, Texto E Atlas. Climate Change 2013 - The Physical Science Basis* (2013).
2. Foth, B. J., Goedecke, M. C. & Soldati, D. New insights into myosin evolution and classification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2006) doi:10.1073/pnas.0506307103.
3. Weiss, A. *et al.* Organization of human and mouse skeletal myosin heavy chain gene clusters is highly conserved. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1999) doi:10.1073/pnas.96.6.2958.
4. Lee, L. A., Karabina, A., Broadwell, L. J. & Leinwand, L. A. The ancient sarcomeric myosins found in specialized muscles. *Skeletal Muscle* at <https://doi.org/10.1186/s13395-019-0192-3> (2019).
5. Harrison, B. C., Allen, D. L. & Leinwand, L. A. IIb or not IIb? Regulation of myosin heavy chain gene expression in mice and men. *Skelet. Muscle* (2011) doi:10.1186/2044-5040-1-5.
6. Sugi, H. *Mysteries in muscle contraction: Evidence against current dogmas. Mysteries in Muscle Contraction: Evidence against Current Dogmas* (2017). doi:10.1201/b22329.
7. Morel, J. E. *Molecular and physiological mechanisms of muscle contraction. Molecular and Physiological Mechanisms of Muscle Contraction* (2015). doi:10.1201/b19067.
8. Filatov, V. L., Katrukha, A. G., Bulargina, T. V. & Gusev, N. B. Troponin: Structure, Properties, and Mechanism of Functioning. *Biochemistry (Moscow)* at (1999).
9. Dominguez, R. Tropomyosin: The gatekeeper's view of the actin filament revealed. *Biophys. J.* (2011) doi:10.1016/j.bpj.2011.01.018.
10. Schevzov, G., Whittaker, S. P., Fath, T., Lin, J. J. C. & Gunning, P. W. Tropomyosin isoforms and reagents. *Bioarchitecture* (2011) doi:10.4161/bioa.1.4.17897.
11. Li, X. *et al.* Tropomyosin position on F-actin revealed by EM reconstruction and computational chemistry. *Biophys. J.* (2011) doi:10.1016/j.bpj.2010.12.3697.
12. Feher, J. *Quantitative Human Physiology. Quantitative Human Physiology* (2012). doi:10.1016/c2009-0-64018-6.
13. Lange, S., Pinotsis, N., Agarkova, I. & Ehler, E. The M-band: The underestimated part of the sarcomere. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* at <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2019.02.003> (2020).
14. Smith, D. A. *The sliding-filament theory of muscle contraction. The Sliding-Filament Theory of Muscle Contraction* (2019). doi:10.1007/978-3-030-03526-6.
15. Krans. Sliding Filament Theory, Sarcomere, Muscle Contraction, Myosin | Learn Science at Scitable. *Nature Education* at (2010).
16. Pelletier, L. *et al.* In vivo RyR1 reduction in muscle triggers a core-like myopathy. *Acta Neuropathol. Commun.* (2020) doi:10.1186/s40478-020-01068-4.
17. Weber, D. K. *et al.* Structural basis for allosteric control of the SERCA-Phospholamban membrane complex by Ca²⁺ and phosphorylation. *Elife* (2021) doi:10.7554/eLife.66226.
18. Michel, L. Y. M. *et al.* Function and regulation of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger NCX3 splice variants in brain and skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* (2014) doi:10.1074/jbc.M113.529388.
19. Roberts, T. J. *et al.* The multi-scale, three-dimensional nature of skeletal muscle contraction. *Physiology* at <https://doi.org/10.1152/physiol.00023.2019> (2019).
20. Zurlo, F., Larson, K., Bogardus, C. & Ravussin, E. Skeletal muscle metabolism is a major determinant of resting energy expenditure. *J. Clin. Invest.* (1990) doi:10.1172/JCI114857.
21. Hargreaves, M. & Spriet, L. L. Skeletal muscle energy metabolism during exercise. *Nature*

Metabolism at <https://doi.org/10.1038/s42255-020-0251-4> (2020).

22. Ostojic, S. M. Creatine synthesis in the skeletal muscle: The times they are a-changin'. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* at <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.00645.2020> (2021).
23. Russell, A. P. *et al.* Creatine transporter (SLC6A8) knock out mice display an increased capacity for in vitro creatine biosynthesis in skeletal muscle. *Front. Physiol.* (2014) doi:10.3389/fphys.2014.00314.
24. Guzun, R. & Saks, V. Application of the principles of systems biology and Wiener's cybernetics for analysis of regulation of energy fluxes in muscle cells in vivo. *International Journal of Molecular Sciences* at <https://doi.org/10.3390/ijms11030982> (2010).
25. Saks, V. A., Kongas, O., Vendelin, M. & Kay, L. Role of the creatine/phosphocreatine system in the regulation of mitochondrial respiration. in *Acta Physiologica Scandinavica* (2000). doi:10.1046/j.1365-201X.2000.00715.x.
26. Nelson, D. L. N. & Cox, M. M. *Lehninger principles of biochemistry*. (W.H. Freeman, 2017).
27. Ramsay, R. R. Electron carriers and energy conservation in mitochondrial respiration. *ChemTexts* (2019) doi:10.1007/s40828-019-0085-4.
28. Kiens, B. Skeletal muscle lipid metabolism in exercise and insulin resistance. *Physiological Reviews* at <https://doi.org/10.1152/physrev.00023.2004> (2006).
29. Yuan, Y. *et al.* Cryo-EM structure of human glucose transporter GLUT4. *Nat. Commun.* (2022) doi:10.1038/s41467-022-30235-5.
30. Krook, A., Wallberg-Henriksson, H. & Zierath, J. R. Sending the signal: Molecular mechanisms regulating glucose uptake. in *Medicine and Science in Sports and Exercise* (2004). doi:10.1249/01.MSS.0000132387.25853.3B.
31. Bouzakri, K. *et al.* siRNA-based gene silencing reveals specialized roles of IRS-1/Akt2 and IRS-2/Akt1 in glucose and lipid metabolism in human skeletal muscle. *Cell Metab.* (2006) doi:10.1016/j.cmet.2006.04.008.
32. Kaddai, V., Le Marchand-Brustel, Y. & Cormont, M. Rab proteins in endocytosis and Glut4 trafficking. in *Acta Physiologica* (2008). doi:10.1111/j.1748-1716.2007.01787.x.
33. Cartee, G. D. & Wojtaszewski, J. F. P. Role of Akt substrate of 160 kDa in insulin-stimulated and contraction-stimulated glucose transport. in *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism* (2007). doi:10.1139/H07-026.
34. Cheatham, B. GLUT4 and company: SNAREing roles in insulin-regulated glucose uptake. *Trends in Endocrinology and Metabolism* at [https://doi.org/10.1016/S1043-2760\(00\)00308-8](https://doi.org/10.1016/S1043-2760(00)00308-8) (2000).
35. Grusovin, J. & Macaulay, S. L. Snares for GLUT4 - Mechanisms directing vesicular trafficking of GLUT4. *Frontiers in Bioscience* at <https://doi.org/10.2741/1052> (2003).
36. Richter, E. A. & Hargreaves, M. Exercise, GLUT4, and skeletal muscle glucose uptake. *Physiol. Rev.* (2013) doi:10.1152/physrev.00038.2012.
37. Treebak JT, Glund S, Deshmukh A, Klein DK, Long YC, Jensen TE, Jørgensen SB, Viollet B, Andersson L, Neumann D, Wallimann T, Richter EA, Chibalin AV, Zierath JR, W. J. AMPK-Mediated AS160 Phosphorylation in Skeletal Muscle Is Dependent on AMPK Catalytic and Regulatory Subunits. *Diabetes* **55**, 2051–8 (2006).
38. Sakamoto, K. & Holman, G. D. Emerging role for AS160/TBC1D4 and TBC1D1 in the regulation of GLUT4 traffic. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* at <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90331.2008> (2008).

39. Krook, A. *et al.* Characterization of signal transduction and glucose transport in skeletal muscle from type 2 diabetic patients. *Diabetes* (2000) doi:10.2337/diabetes.49.2.284.
40. Karlsson, H. K. R. & Zierath, J. R. Insulin signaling and glucose transport in insulin resistant human skeletal muscle. *Cell Biochemistry and Biophysics* at <https://doi.org/10.1007/s12013-007-0030-9> (2007).
41. Batista, T. M. *et al.* A Cell-Autonomous Signature of Dysregulated Protein Phosphorylation Underlies Muscle Insulin Resistance in Type 2 Diabetes. *Cell Metab.* (2020) doi:10.1016/j.cmet.2020.08.007.
42. Koves, T. R. *et al.* Mitochondrial Overload and Incomplete Fatty Acid Oxidation Contribute to Skeletal Muscle Insulin Resistance. *Cell Metab.* (2008) doi:10.1016/j.cmet.2007.10.013.
43. Aguer, C. *et al.* Acylcarnitines: Potential implications for skeletal muscle insulin resistance. *FASEB J.* (2015) doi:10.1096/fj.14-255901.
44. Szendroedi J, Yoshimura T, Phielix E, Koliaki C, Marcucci M, Zhang D, Jelenik T, Müller J, Herder C, Nowotny P, Shulman GI, R. M. Role of diacylglycerol activation of PKC θ in lipid-induced muscle insulin resistance in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1**, 9597–602 (2014).
45. Li, Y. *et al.* Protein kinase C θ inhibits insulin signaling by phosphorylating IRS1 at Ser1101. *J. Biol. Chem.* (2004) doi:10.1074/jbc.C400186200.
46. Lowell, B. B. & Shulman, G. I. Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science* at <https://doi.org/10.1126/science.1104343> (2005).
47. Bou-Teen, D. *et al.* Mitochondrial ROS and mitochondria-targeted antioxidants in the aged heart. *Free Radical Biology and Medicine* at <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.02.043> (2021).
48. Cortassa, S., O'Rourke, B. & Aon, M. A. Redox-Optimized ROS Balance and the relationship between mitochondrial respiration and ROS. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* (2014) doi:10.1016/j.bbabo.2013.11.007.
49. Echtay, K. S. *et al.* Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature* at <https://doi.org/10.1038/415096a> (2002).
50. Toime, L. J. & Brand, M. D. Uncoupling protein-3 lowers reactive oxygen species production in isolated mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.* (2010) doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.05.010.
51. Pohl, E. E., Rupprecht, A., Macher, G. & Hilse, K. E. Important trends in UCP3 investigation. *Frontiers in Physiology* at <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00470> (2019).
52. Lima, T. I. *et al.* Essential role of the PGC-1 α /PPAR β axis in Ucp3 gene induction. *J. Physiol.* (2019) doi:10.1113/JP278006.
53. Rudofsky, G. Functional Polymorphisms of UCP2 and UCP3 Are Associated With a Reduced Prevalence of Diabetic Neuropathy in Patients With Type 1 Diabetes. *Diabetes Care* (2006) doi:10.2337/diacare.29.1.89.
54. Schrauwen, P., Xia, J., Walder, K., Snitker, S. & Ravussin, E. A novel polymorphism in the proximal UCP3 promoter region: Effect on skeletal muscle UCP3 mRNA expression and obesity in male nondiabetic Pima Indians. *Int. J. Obes.* (1999) doi:10.1038/sj.ijo.0801057.
55. Dalgaard, L. T. *et al.* A prevalent polymorphism in the promoter of the UCP3 gene and its relationship to body mass index and long term body weight change in the Danish population. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* at <https://doi.org/10.1210/jc.86.3.1398> (2001).
56. Halsall, D. J. *et al.* Uncoupling protein 3 genetic variants in human obesity: The c-55t promoter polymorphism is negatively correlated with body mass index in a UK Caucasian

population. *Int. J. Obes.* (2001) doi:10.1038/sj.ijo.0801584.

57. Coen, P. M., Musci, R. V., Hinkley, J. M. & Miller, B. F. Mitochondria as a target for mitigating sarcopenia. *Frontiers in Physiology* at <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01883> (2019).

58. Shoemaker, M. E. *et al.* Differences in muscle energy metabolism and metabolic flexibility between sarcopenic and nonsarcopenic older adults. *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle* (2022) doi:10.1002/jcsm.12932.

59. Petersen, K. F. *et al.* Mitochondrial dysfunction in the elderly: Possible role in insulin resistance. *Science* (80-.). (2003) doi:10.1126/science.1082889.

60. Migliavacca, E. *et al.* Mitochondrial oxidative capacity and NAD⁺ biosynthesis are reduced in human sarcopenia across ethnicities. *Nat. Commun.* (2019) doi:10.1038/s41467-019-13694-1.

61. Kaiser, M. S. *et al.* Dual roles of mTORC1-dependent activation of the ubiquitin-proteasome system in muscle proteostasis. *Commun. Biol.* (2022) doi:10.1038/s42003-022-04097-y.

62. Sunitha, B. *et al.* Muscle biopsies from human muscle diseases with myopathic pathology reveal common alterations in mitochondrial function. *J. Neurochem.* (2016) doi:10.1111/jnc.13626.

63. Duan, D., Goemans, N., Takeda, S., Mercuri, E. & Aartsma-Rus, A. Duchenne muscular dystrophy. *Nature Reviews Disease Primers* at <https://doi.org/10.1038/s41572-021-00248-3> (2021).

64. Zulian, A., Schiavone, M., Giorgio, V. & Bernardi, P. Forty years later: Mitochondria as therapeutic targets in muscle diseases. *Pharmacological Research* at <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.09.043> (2016).

65. Palty, R. *et al.* NCLX is an essential component of mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchange. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2010) doi:10.1073/pnas.0908099107.

66. Vercesi, A. E. *et al.* Mitochondrial calcium transport and the redox nature of the calcium-induced membrane permeability transition. *Free Radical Biology and Medicine* at <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.08.034> (2018).

67. Chal, J. & Pourquié, O. Making muscle: Skeletal myogenesis in vivo and in vitro. *Development (Cambridge)* at <https://doi.org/10.1242/dev.151035> (2017).

68. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* **126**, 663–676 (2006).

69. Lagha, M. *et al.* Regulation of skeletal muscle stem cell behavior by Pax3 and Pax7. in *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* (2008). doi:10.1101/sqb.2008.73.006.

70. Buckingham, M. & Rigby, P. W. J. Gene Regulatory Networks and Transcriptional Mechanisms that Control Myogenesis. *Developmental Cell* vol. 28 225–238 at <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.12.020> (2014).

71. Bentzinger, C. F., Wang, Y. X. & Rudnicki, M. A. Building Muscle: Molecular Regulation of Myogenesis. doi:10.1101/cshperspect.a008342.

72. Fedon, Y. *et al.* Role and Function of Wnts in the Regulation of Myogenesis: When Wnt Meets Myostatin. in *Skeletal Muscle - From Myogenesis to Clinical Relations* (2012). doi:10.5772/48330.

73. Bentzinger, C. F., Wang, Y. X. & Rudnicki, M. A. Building muscle: molecular regulation of myogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* at <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008342> (2012).

74. Parker, M. H., Seale, P. & Rudnicki, M. A. Looking back to the embryo: Defining

transcriptional networks in adult myogenesis. *Nature Reviews Genetics* at <https://doi.org/10.1038/nrg1109> (2003).

75. Mok, G. F. & Sweetman, D. Many routes to the same destination: Lessons from skeletal muscle development. *Reproduction* at <https://doi.org/10.1530/REP-10-0394> (2011).

76. Shelton, M. *et al.* Gene expression profiling of skeletal myogenesis in human embryonic stem cells reveals a potential cascade of transcription factors regulating stages of myogenesis, including quiescent/activated satellite cell-like gene expression. *PLoS One* (2019) doi:10.1371/journal.pone.0222946.

77. Khilji, S., Hamed, M., Chen, J. & Li, Q. Dissecting myogenin-mediated retinoid X receptor signaling in myogenic differentiation. *Commun. Biol.* **3**, (2020).

78. Sever, R. & Glass, C. K. Signaling by nuclear receptors. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* (2013) doi:10.1101/cshperspect.a016709.

79. Olefsky, J. M. Nuclear Receptor Minireview Series. *Journal of Biological Chemistry* at <https://doi.org/10.1074/jbc.R100047200> (2001).

80. Penvose, A., Keenan, J. L., Bray, D., Ramlall, V. & Siggers, T. Comprehensive study of nuclear receptor DNA binding provides a revised framework for understanding receptor specificity. *Nat. Commun.* (2019) doi:10.1038/s41467-019-10264-3.

81. Perissi, V. & Rosenfeld, M. G. Controlling nuclear receptors: The circular logic of cofactor cycles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* at <https://doi.org/10.1038/nrm1680> (2005).

82. Fruchart, J. C. *et al.* The selective peroxisome proliferator-activated receptor alpha modulator (SPPARM α) paradigm: Conceptual framework and therapeutic potential. *Cardiovascular Diabetology* at <https://doi.org/10.1186/s12933-019-0864-7> (2019).

83. Santos, G. M., Fairall, L. & Schwabe, J. W. R. Negative regulation by nuclear receptors: A plethora of mechanisms. *Trends in Endocrinology and Metabolism* at <https://doi.org/10.1016/j.tem.2010.11.004> (2011).

84. Porter, B. A., Ortiz, M. A., Bratslavsky, G. & Kotula, L. Structure and function of the nuclear receptor superfamily and current targeted therapies of prostate cancer. *Cancers* at <https://doi.org/10.3390/cancers11121852> (2019).

85. De Bosscher, K., Desmet, S. J., Clarisse, D., Estébanez-Perpiña, E. & Brunsveld, L. Nuclear receptor crosstalk — defining the mechanisms for therapeutic innovation. *Nature Reviews Endocrinology* at <https://doi.org/10.1038/s41574-020-0349-5> (2020).

86. Burke, L., Downes, M., Carozzi, A., Giguère, V. & Muscat, G. E. O. Transcriptional repression by the orphan steroid receptor RVR/Rev-erb β is dependent on the signature motif and helix 5 in the E region: Functional evidence for a biological role of RVR in myogenesis. *Nucleic Acids Res.* **24**, 3481–3489 (1996).

87. Welch, R. D. *et al.* Rev-Erb co-regulates muscle regeneration via tethered interaction with the NF-Y cistrome. *Mol. Metab.* (2017) doi:10.1016/j.molmet.2017.05.001.

88. Mayeuf-Louchart, A. *et al.* Rev-erb- α regulates atrophy-related genes to control skeletal muscle mass. *Sci. Rep.* (2017) doi:10.1038/s41598-017-14596-2.

89. Ramakrishnan, S. N. & Muscat, G. E. O. The Orphan Rev-Erb Nuclear Receptors: A Link between Metabolism, Circadian Rhythm and Inflammation? *Nucl. Recept. Signal.* (2006) doi:10.1621/nrs.04009.

90. Lau, P., Nixon, S. J., Parton, R. G. & Muscat, G. E. O. ROR α regulates the expression of genes involved in lipid homeostasis in skeletal muscle cells: Caveolin-3 and CPT-1 are direct targets of ROR. *J. Biol. Chem.* (2004) doi:10.1074/jbc.M404927200.

91. Raichur, S. *et al.* Identification and validation of the pathways and functions regulated by

- the orphan nuclear receptor, ROR α 1, in skeletal muscle. *Nucleic Acids Res.* (2010) doi:10.1093/nar/gkq180.
92. Raichur, S., Lau, P., Staels, B. & Muscat, G. E. O. Retinoid-related orphan receptor γ regulates several genes that control metabolism in skeletal muscle cells: Links to modulation of reactive oxygen species production. *J. Mol. Endocrinol.* (2007) doi:10.1677/jme.1.00010.
 93. Lau, P., Bailey, P., Dowhan, D. H. & Muscat, G. E. O. Exogenous expression of a dominant negative ROR α 1 vector in muscle cells impairs differentiation: ROR α 1 directly interacts with p300 and MyoD. *Nucleic Acids Res.* (1999) doi:10.1093/nar/27.2.411.
 94. Solt, L. A. & Burris, T. P. Action of RORs and their ligands in (patho)physiology. *Trends in Endocrinology and Metabolism* at <https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.05.012> (2012).
 95. Santori, F. R. *et al.* Identification of Natural ROR γ Ligands that Regulate the Development of Lymphoid Cells. *Cell Metab.* (2015) doi:10.1016/j.cmet.2015.01.004.
 96. Tontonoz, P. *et al.* The Orphan Nuclear Receptor Nur77 Is a Determinant of Myofiber Size and Muscle Mass in Mice. *Mol. Cell. Biol.* (2015) doi:10.1128/mcb.00715-14.
 97. Cortez-Toledo, O., Schnair, C., Sangngern, P., Metzger, D. & ChaoThe, L. C. Nur77 deletion impairs muscle growth during developmental myogenesis and muscle regeneration in mice. *PLoS One* (2017) doi:10.1371/journal.pone.0171268.
 98. Pan, X. *et al.* Nr4a1 as a myogenic factor is upregulated in satellite cells/myoblast under proliferation and differentiation state. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **513**, 573–581 (2019).
 99. Muscat, G. E. O., Rea, S. & Downes, M. Identification of a regulatory function for an orphan receptor in muscle: COUP-TF II affects the expression of the myoD gene family during myogenesis. *Nucleic Acids Res.* (1995) doi:10.1093/nar/23.8.1311.
 100. Bailey, P., Sartorelli, V., Hamamori, Y. & Muscat, G. E. O. *The orphan nuclear receptor, COUP-TF II, inhibits myogenesis by post-transcriptional regulation of MyoD function: COUP-TF II directly interacts with p300 and MyoD.* *Nucleic Acids Research* vol. 26 <https://academic.oup.com/nar/article/26/23/5501/1115226> (1998).
 101. Lee, H.-J. *et al.* Dysregulation of nuclear receptor COUP-TFII impairs skeletal muscle development OPEN. doi:10.1038/s41598-017-03475-5.
 102. Robinson-Rechavi, M., Garcia, H. E. & Laudet, V. The nuclear receptor superfamily. *Journal of Cell Science* at <https://doi.org/10.1242/jcs.00247> (2003).
 103. Willy, P. J. *et al.* Regulation of PPAR γ coactivator 1 α (PGC-1 α) signaling by an estrogen-related receptor α (ERR α) ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 8912–8917 (2004).
 104. Cardamone, M. D. *et al.* Mitochondrial Retrograde Signaling in Mammals Is Mediated by the Transcriptional Cofactor GPS2 via Direct Mitochondria-to-Nucleus Translocation. *Mol. Cell* (2018) doi:10.1016/j.molcel.2018.01.037.
 105. Diken, K. *et al.* ERR γ enhances UCP1 expression and fatty acid oxidation in brown adipocytes. *Obesity* (2013) doi:10.1002/oby.20067.
 106. Puigserver, P. *et al.* A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* **92**, 829–839 (1998).
 107. Wende, A. R., Huss, J. M., Schaeffer, P. J., Giguere, V. & Kelly, D. P. PGC-1 Coactivates PDK4 Gene Expression via the Orphan Nuclear Receptor ERR : a Mechanism for Transcriptional Control of Muscle Glucose Metabolism. *Mol. Cell. Biol.* (2005) doi:10.1128/mcb.25.24.10684-10694.2005.
 108. Finck, B. N. & Kelly, D. P. PGC-1 coactivators: Inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *Journal of Clinical Investigation* at <https://doi.org/10.1172/JCI27794> (2006).
 109. Jäer, S., Handschin, C., St-Pierre, J. & Spiegelman, B. M. AMP-activated protein kinase

- (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α . *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2007) doi:10.1073/pnas.0705070104.
110. Narkar, V. A. *et al.* AMPK and PPAR δ Agonists Are Exercise Mimetics. *Cell* (2008) doi:10.1016/j.cell.2008.06.051.
 111. Vara-Ciruelos, D., Russell, F. M. & Grahame Hardie, D. The strange case of AMPK and cancer: Dr Jekyll or Mr Hyde? *Open Biology* at <https://doi.org/10.1098/rsob.190099> (2019).
 112. Krämer, D. K. *et al.* Role of AMP kinase and PPAR δ in the regulation of lipid and glucose metabolism in human skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* (2007) doi:10.1074/jbc.M702329200.
 113. Tavares, C. D. J. *et al.* Transcriptome-wide analysis of PGC-1 α -binding RNAs identifies genes linked to glucagon metabolic action. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2020) doi:10.1073/pnas.2000643117.
 114. Rowe, G. C. *et al.* Disconnecting Mitochondrial Content from Respiratory Chain Capacity in PGC-1-Deficient Skeletal Muscle. *Cell Rep.* **3**, 1449–1456 (2013).
 115. Leick, L. *et al.* PGC-1 α is not mandatory for exercise- and training-induced adaptive gene responses in mouse skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **294**, E463–74 (2008).
 116. Jackson, K. C. *et al.* BRCA1 is a novel regulator of metabolic function in skeletal muscle. *J. Lipid Res.* (2014) doi:10.1194/jlr.M043851.
 117. Bi, P. & Kuang, S. Notch signaling as a novel regulator of metabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism* at <https://doi.org/10.1016/j.tem.2015.02.006> (2015).
 118. Pang, J. *et al.* G protein coupled receptor kinase 2 interacting protein 1 (GIT1) is a novel regulator of mitochondrial biogenesis in heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* (2011) doi:10.1016/j.yjmcc.2011.06.020.
 119. Lima, T. I. *et al.* Opposing action of NCoR1 and PGC-1 α in mitochondrial redox homeostasis. *Free Radic. Biol. Med.* (2019) doi:10.1016/j.freeradbiomed.2019.08.006.
 120. Pérez-Schindler, J. *et al.* The corepressor NCoR1 antagonizes PGC-1 α and estrogen-related receptor α in the regulation of skeletal muscle function and oxidative metabolism. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 4913–24 (2012).
 121. Scholtes, C. & Giguère, V. Transcriptional control of energy metabolism by nuclear receptors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* at <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00486-7> (2022).
 122. Grygiel-Górniak, B. Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: Nutritional and clinical implications - A review. *Nutr. J.* (2014) doi:10.1186/1475-2891-13-17.
 123. Fan, W. *et al.* PPAR δ Promotes Running Endurance by Preserving Glucose. *Cell Metab.* (2017) doi:10.1016/j.cmet.2017.04.006.
 124. Berger, J. & Moller, D. E. The Mechanisms of Action of PPARs. *Annu. Rev. Med.* **53**, 409–435 (2002).
 125. Wang, Y. X. *et al.* Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPAR δ . *PLoS Biol.* (2004) doi:10.1371/journal.pbio.0020294.
 126. Schuler, M. *et al.* PGC1 α expression is controlled in skeletal muscles by PPAR β , whose ablation results in fiber-type switching, obesity, and type 2 diabetes. *Cell Metab.* (2006) doi:10.1016/j.cmet.2006.10.003.
 127. Vääntinen, M. *et al.* Single nucleotide polymorphisms in the peroxisome proliferator-activated receptor δ gene are associated with skeletal muscle glucose uptake. *Diabetes* (2005) doi:10.2337/diabetes.54.12.3587.
 128. Kleiner, S. *et al.* PPAR δ agonism activates fatty acid oxidation via PGC-1 α but does not increase mitochondrial gene expression and function. *J. Biol. Chem.* (2009) doi:10.1074/jbc.M109.008797.

129. Giordano Attianese, G. M. P. & Desvergne, B. Integrative and systemic approaches for evaluating PPAR β/δ (PPARD) function. *Nuclear receptor signaling* at <https://doi.org/10.1621/nrs.13001> (2015).
130. Gan, Z. *et al.* The nuclear receptor PPAR β/δ programs muscle glucose metabolism in cooperation with AMPK and MEF2. *Genes Dev.* (2011) doi:10.1101/gad.178434.111.
131. Fan, W. & Evans, R. PPARs and ERRs: Molecular mediators of mitochondrial metabolism. *Current Opinion in Cell Biology* at <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2014.11.002> (2015).
132. Wattez, J. S. *et al.* Loss of skeletal muscle estrogen-related receptors leads to severe exercise intolerance. *Mol. Metab.* (2023) doi:10.1016/j.molmet.2023.101670.
133. Narkar, V. A. *et al.* Exercise and PGC-1 α -independent synchronization of type i muscle metabolism and vasculature by ERR γ . *Cell Metab.* (2011) doi:10.1016/j.cmet.2011.01.019.
134. Fan, W. *et al.* ERR γ Promotes Angiogenesis, Mitochondrial Biogenesis, and Oxidative Remodeling in PGC1 α/β -Deficient Muscle Correspondence In Brief Mitogenesis Angiogenesis Oxidative remodeling Exercise PGC1 α/β Knockout Mito defect Muscle damage. *CellReports* (2018).
135. Greschik, H. *et al.* Structural and functional evidence for ligand-independent transcriptional activation by the estrogen-related receptor 3. *Mol. Cell* (2002) doi:10.1016/S1097-2765(02)00444-6.
136. Cardot, P., Kardassis, D., Cladaras, C., Zannis, V. I. & Chambaz, J. Factors Participating in the Liver-Specific Expression of the Human Apolipoprotein A-II Gene and Their Significance for Transcription. *Biochemistry* (1993) doi:10.1021/bi00086a013.
137. Kliewer, S. A. *et al.* Retinoid X receptor-COUP-TF interactions modulate retinoic acid signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1992) doi:10.1073/pnas.89.4.1448.
138. Ladias, J. A. A. *et al.* Transcriptional regulation of human apolipoprotein genes apoB, apoCIII, and apoAII by members of the steroid hormone receptor superfamily HNF-4, ARP- 1, EAR-2, and EAR-3. *J. Biol. Chem.* (1992).
139. Barnhart, K. M. & Mellon, P. L. The sequence of a murine cDNA encoding Ear-2, a nuclear orphan receptor. *Gene* (1994) doi:10.1016/0378-1119(94)90283-6.
140. Jonk, L. J. C. *et al.* Cloning and expression during development of three murine members of the COUP family of nuclear orphan receptors. *Mech. Dev.* (1994) doi:10.1016/0925-4773(94)90098-1.
141. Islam, T. C. & Toftgård, R. Nuclear orphan receptor-binding retinoic acid response elements in keratinocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1994) doi:10.1006/bbrc.1994.2217.
142. Chu, K. & Zingg, H. H. The nuclear orphan receptors COUP-TFII and Ear-2 act as silencers of the human oxytocin gene promoter. *J. Mol. Endocrinol.* (1997) doi:10.1677/jme.0.0190163.
143. Chu, K., Boutin, J. M., Breton, C. & Zingg, H. H. Nuclear orphan receptors COUP-TFII and Ear-2: Presence in oxytocin-producing uterine cells and functional interaction with the oxytocin gene promoter. *Mol. Cell. Endocrinol.* (1998) doi:10.1016/S0303-7207(97)00241-4.
144. Avram, D. *et al.* Heterodimeric interactions between chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor family members ARP1 and Ear2. *J. Biol. Chem.* (1999) doi:10.1074/jbc.274.20.14331.
145. Hermann-Kleiter, N. *et al.* The Nuclear Orphan Receptor NR2F6 Suppresses Lymphocyte Activation and T Helper 17-Dependent Autoimmunity. *Immunity* (2008) doi:10.1016/j.immuni.2008.06.008.
146. Hermann-Kleiter, N. *et al.* Nuclear orphan receptor NR2F6 directly antagonizes NFAT and ROR γ t binding to the Il17a promoter. *J. Autoimmun.* (2012) doi:10.1016/j.jaut.2012.07.007.

147. Hermann-Kleiter, N. & Baier, G. Orphan nuclear receptor NR2F6 acts as an essential gatekeeper of Th17 CD4⁺ T cell effector functions. *Cell Communication and Signaling* at <https://doi.org/10.1186/1478-811X-12-38> (2014).
148. Klepsch, V. *et al.* Nuclear receptor NR2F6 inhibition potentiates responses to PD-L1/PD-1 cancer immune checkpoint blockade. *Nat. Commun.* (2018) doi:10.1038/s41467-018-04004-2.
149. Warnecke, M., Oster, H., Revelli, J., Alvarez-bolado, G. & Eichele, G. Abnormal development of the locus coeruleus in. *Genes Dev.* (2005) doi:10.1101/gad.317905.mice.
150. Wang, L. *et al.* Circular RNA circRHOT1 promotes hepatocellular carcinoma progression by initiation of NR2F6 expression. *Mol. Cancer* (2019) doi:10.1186/s12943-019-1046-7.
151. Peláez-García, A. *et al.* A proteomic analysis reveals that snail regulates the expression of the nuclear orphan receptor nuclear receptor subfamily 2 group F member 6 (Nr2f6) and interleukin 17 (IL-17) to inhibit adipocyte differentiation. *Mol. Cell. Proteomics* (2015) doi:10.1074/mcp.M114.045328.
152. Zhou, B. *et al.* The Nuclear Orphan Receptor NR2F6 Promotes Hepatic Steatosis through Upregulation of Fatty Acid Transporter CD36. *Adv. Sci.* (2020) doi:10.1002/advs.202002273.
153. Ibrahimi, A. *et al.* Muscle-specific overexpression of FAT/CD36 enhances fatty acid oxidation by contracting muscle, reduces plasma triglycerides and fatty acids, and increases plasma glucose and insulin. *J. Biol. Chem.* (1999) doi:10.1074/jbc.274.38.26761.
154. Héron-Milhavet, L. *et al.* Muscle-specific overexpression of CD36 reverses the insulin resistance and diabetes of MKR mice. *Endocrinology* (2004) doi:10.1210/en.2003-1543.
155. Holloway, G. P. *et al.* Co-overexpression of CD36 and FABPpm increases fatty acid transport additively, not synergistically, within muscle. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* (2022) doi:10.1152/ajpcell.00435.2021.
156. Coburn, C. T. *et al.* Defective uptake and utilization of long chain fatty acids in muscle and adipose tissues of CD36 knockout mice. *J. Biol. Chem.* (2000) doi:10.1074/jbc.M003826200.
157. Samovski, D. *et al.* Regulation of AMPK activation by CD36 links fatty acid uptake to β -oxidation. *Diabetes* (2015) doi:10.2337/db14-0582.
158. Vercauteren, K., Pasko, R. A., Gleyzer, N., Marino, V. M. & Scarpulla, R. C. PGC-1-related coactivator: immediate early expression and characterization of a CREB/NRF-1 binding domain associated with cytochrome c promoter occupancy and respiratory growth. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 7409–19 (2006).
159. Burren, O. S., Guo, H. & Wallace, C. VSEAMS: A pipeline for variant set enrichment analysis using summary GWAS data identifies IKZF3, BATF and ESRRA as key transcription factors in type 1 diabetes. *Bioinformatics* (2014) doi:10.1093/bioinformatics/btu571.
160. Alexandre, P. A. *et al.* Systems biology reveals NR2F6 and TGFB1 as key regulators of feed efficiency in beef cattle. *Front. Genet.* (2019) doi:10.3389/fgene.2019.00230.

- CAPÍTULO 2 -

Manuscrito submetido para publicação

Uma versão atualizada do manuscrito encontra-se depositada na plataforma de *preprints* BioRxiv sob o identificador DOI:10.1101/2023.05.17.540900

GENERAL INFORMATION

Title: The nuclear receptor Nr2f6 represses skeletal muscle oxidative metabolism and force production.

Running title: Nr2f6 inhibits muscle function and metabolism.

Authors:

Dimitrius Santiago Passos Simões Fróes Guimarães^{1,4,#}
 Ninon Melany Flores Barrios¹
 André Gustavo de Oliveira¹
 David Rizo-Roca⁵
 Maxence Jollet⁵
 Jonathon A.B. Smith⁴
 Thiago Reis Araujo¹
 Marcos Vinicius da Cruz¹
 Emilio Marconato Junior¹
 Sandro Massao Hirabara²
 André Schwambach Vieira³
 Anna Krook⁴
 Juleen R. Zierath^{4,5}
 Leonardo dos Reis Silveira¹

Affiliations:

¹Obesity and Comorbidities Research Center (OCRC), University of Campinas, Campinas, Brazil

²Interdisciplinary Post-Graduate Program in Health Sciences, Cruzeiro do Sul University, São Paulo, Brazil,

³Department of Animal Biology, Institute of Biology, University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

⁴Department of Physiology and Pharmacology, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

⁵Department of Molecular Medicine and Surgery, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

[#]Lead contact

Correspondence should be addressed to

Leonardo R. Silveira
 Centro de Pesquisa em Obesidade e Comorbidades
 Universidade Estadual de Campinas - Instituto de Biologia
 Rua Carl Von Linnaeus - Bloco Z
 CEP 13083-862

Campinas - SP
Brazil
F: +55 (19) 3521-6191.
E-mail: leors@unicamp.br

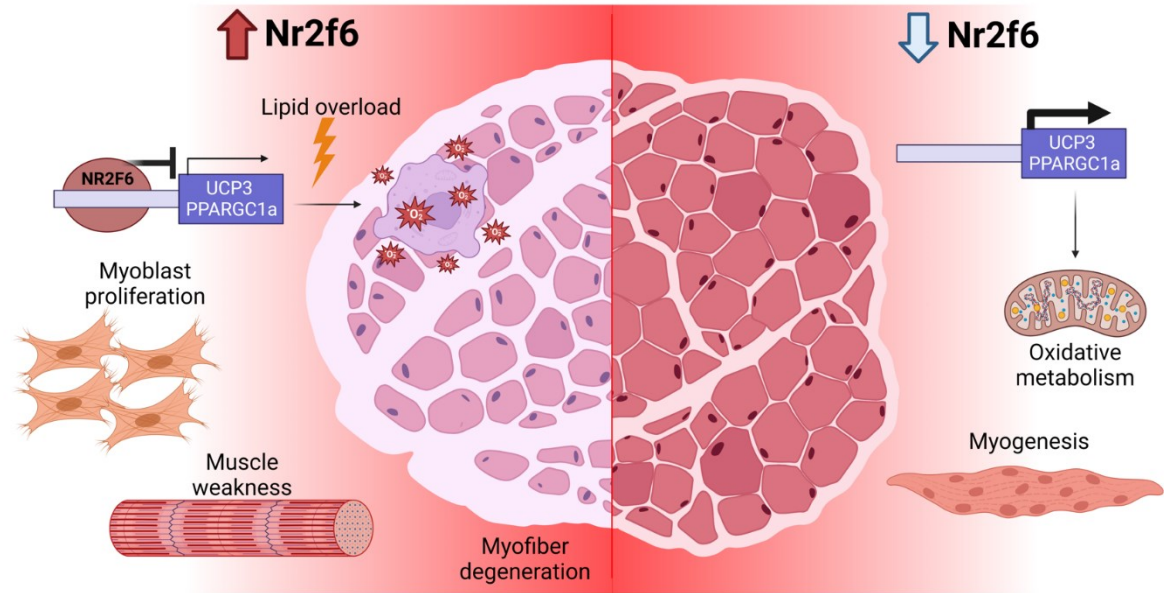
Key points

- Upregulation of Nr2f6 reduces PGC-1 α and UCP3 abundance and impairs metabolism.
- Nr2f6 gain-of-function impairs muscle force production.
- Nr2f6 controls muscle cell differentiation and proliferation.

SUMMARY

The maintenance of skeletal muscle plasticity upon changes in the environment, nutrient supply, and activity depends on the crosstalk between metabolic and structural adaptations. Here, we establish a role for the orphan nuclear receptor Nr2f6 in both processes. Nr2f6 overexpression leads to an atrophic state, sharply decreasing muscle mass and myofiber content, which is accompanied by an impairment in force production. These functional phenotypes were followed by the establishment of an inflammatory molecular signature, and a decrease in genes involved in oxidative metabolism and contractility. Conversely, Nr2f6 depletion increased myocytes' oxidative capacity and protected against lipid-induced cell death. In addition, Nr2f6 regulated core components of the cell division machinery, decoupling muscle cell proliferation from differentiation. Collectively, our findings define a novel role for Nr2f6 as a molecular transducer conferring the balance between skeletal muscle structure and oxidative capacity.

GRAPHICAL ABSTRACT



INTRODUCTION

Muscle contraction is a highly coordinated process initiated by neuromuscular transmission. Subsequent depolarization of the muscle fiber triggers an action potential that propagates along the sarcolemma, stimulating the release of calcium ions from the sarcoplasmic reticulum, and ultimately promoting myosin-actin cross-bridge cycling and force production. This process requires an accessory metabolic machinery to generate the energy needed to support contraction, and disruption in either muscle structure or metabolism leads to functional defects, such as in Duchenne syndrome^{1,2}, sarcopenia³, and cachexia⁴. Dynamic crosstalk between energetic status, muscle development, mechanical stress, and transcriptional changes is crucial to maintain muscle function. In this context, the nuclear receptor family of transcription factors (NR) is of particular interest since they are regulated by small molecules, such as metabolites and hormones⁵. Although the transcriptional landscape for metabolic-functional signaling has been extensively studied in pathological and physiological conditions, a broader role of some NRs has only recently been recognized, and thus, the role of many members remains elusive⁶.

The NRs have a modular architecture that contains a ligand-binding domain (LBD) and a zinc-finger DNA binding domain (DBD), and can be further grouped in endogenous, orphan, or adopted NRs according to the presence of an endogenous ligand, the absence of a known ligand or if a new ligand for a given NR was just identified, respectively⁷. The classical mechanistic model proposes that a small molecule binds to the LBD, changing its conformation to one of higher affinity for a transcriptional co-regulator⁸, such as PGC-1 α , which in turn can mediate transcriptional modulation through the recruitment of histone acetylases, the mediator complex, and basal transcriptional apparatus.

The orphan nuclear receptor Nr2f6 (also named Ear2 or COUP-TFIII) has been characterized in a broad range of tissues, such as adipose, thyroid, liver, brain, and the immune system, where it plays different and even antagonistic roles⁹. Nr2f6 can impair adipocyte differentiation, increase cancer cell proliferation, induce both resistance and susceptibility to antitumor drugs, and promote the development of fatty liver disease¹⁰. In ovarian cancer cells, Nr2f6 binds to the histone acetylase P300 at the Notch3 promoter, increasing histone H3 K9 and K27 acetylation to activate transcription, increasing cell proliferation and chemoresistance¹¹. So far, the most extensively defined role of Nr2f6 is in the immune system, in which it directly and strongly suppresses interleukins 17, 21, 2 and interferon γ transcription by interacting with the

NFAT/AP-1 complex at the promoters of these genes^{12,13}. Curiously, Nr2f6 has been reported both as a transcriptional repressor and activator, but the context that defines its activity state is unknown. Recently, Nr2f6 was classified as a stripe transcription factor¹⁴, i.e. it can bind to low-complexity motifs together with other transcription factors in a broad range of promoters, regulating chromatin accessibility. This indicates that the function of Nr2f6 in diverse environments is influenced not only by its DNA occupancy but also by the presence and activity of other transcription factors. Whether the current understanding of the role of Nr2f6's can be applied to other tissues, such as skeletal muscle is unknown. Therefore, we sought to characterize the molecular mechanisms and functional roles of Nr2f6 in skeletal muscle biology both *in vitro* and *in vivo*.

We discovered that Nr2f6 overexpression in skeletal muscle disrupts oxidative metabolism by directly repressing *PGC-1 α* and *UCP3* gene expression, which impairs mitochondrial function. Moreover, Nr2f6 induces core genes of cell cycle progression and in skeletal muscle activates immune cells, increasing inflammation, reducing mass, changing fiber type, and reducing force production, collectively causing a sarcopenic-like state.

RESULTS

Nr2f6 regulates muscle cell metabolism and differentiation.

Genetic manipulations of Nr2f6 at the whole-body level and *in vitro* have been conducted^{10,11,15,16}, but the role of this NR in muscle models is underexplored. We used siRNA-mediated depletion of Nr2f6 in C2C12 myocytes to verify the outcomes on the transcriptomic landscape (Figure S1A). The 1849 differentially regulated genes, 920 upregulated and 939 downregulated, could be grouped into five main classes, with increased expression of genes related to muscle differentiation, contraction, and metabolism and decreased expression of genes with roles in cell cycle and DNA packaging (Figure 1A-D). In fact, among the 20 most significant altered genes, nine are linked to muscle contraction (*Ryr1*, *Ttn*, *Myh3*, *Myh2*, *Acnt2*, *Atp2a1*, *Myll*, *Tnnc2*, *Myom3*) are upregulated by Nr2f6 knockdown (Figure 1A). Accordingly, a panel of canonical markers of muscle differentiation containing muscle regulatory factors (MRFs) and myosin isoforms (Figure 1E) reveals that the Nr2f6 knockdown enhanced C2C12 differentiation. Indeed, data generated in our transcriptomic analysis was correlated with a publicly available C2C12 myogenesis dataset (Figure S1B). Consistently, the proteins coded by the upregulated genes belonged mostly to the sarcomere, contractile fiber, and cytoplasm location ontologies. Since the

increase in cellular oxidative capacity and the activation of the PI3K pathway are required for myogenesis^{17,18}, we verified whether genes of the main pathways of regulation of glycolysis and fatty acid oxidation were affected and found that several energy sensors such as *Akt2*, *Prkag3* subunit of AMPK, and mTOR complex were upregulated by Nr2f6 loss-of-function (Figure 1F). Myogenic differentiation demands the withdrawal of the cell cycle and both processes are regulated in a concerted manner^{19,20}. Accordingly, the downregulated genes were related to different phases of cell division, with the enrichment of proteins related to DNA replication, packaging, and chromosome separations. Of note, essential components of the cell cycle progression such as *Cdc25b/c* phosphatases and *CDK1/4* kinase promote quiescence and halt cell cycle progression in muscle progenitors when down-regulated^{21–23}. Altogether, the changes in the myocyte's global transcriptome indicate that Nr2f6 inhibits myoblast differentiation and metabolism. Considering the differences between mouse and human myogenic cell's transcriptional landscape²⁴ we verified whether the result of Nr2f6 depletion in differentiation markers would be translatable to human primary human skeletal muscle cells. We found that expression of *Myh1/2/7*, muscle creatine kinase, and myosin light chain kinase 1 were upregulated in human cells (Figure 1G), indicating a conserved role for Nr2f6 as repressor of myogenesis.

Increase in cell oxidative capacity by Nr2f6 knockdown.

Given the enrichment of genes of oxidative metabolism, we first sought to verify the functional effects of Nr2f6 knockdown on metabolism. Oxygen consumption assays (Figure 2A), using palmitate as the major substrate for energy production, provided evidence that Nr2f6 knockdown promoted an increase in maximal respiration capacity after the addition of the uncoupler (carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone) CCCP and the spare capacity. Although there was no difference between control and knockdown respiratory parameters in high-glucose media (Figure S2A, B), the extracellular acidification rates were reduced, without a reduction of total ATP pool, which was confirmed by lower lactate concentration in knockdown cells (Figure 2B, C, S2C). These results are supported by alterations in the expression of the pyruvate carboxylase, insulin-dependent glucose transporter, and fatty acid transporters (Figure 2D, E). Together, these results indicate Nr2f6 knockdown increases pyruvate and acetyl-CoA flux to the mitochondria, which could be reinforced by upregulation of the glucose transporter *GLUT4*, the anaplerotic enzyme pyruvate carboxylase (PC), and fatty-acid transporters. Our analysis of

ENCODE chromatin immunoprecipitation-sequencing (ChIP-seq) data for Nr2f6 in K562 and HepG2 cells indicates an increase in mitochondrial genes related to lipid metabolism (Figure S1C). We also identified significant enrichment of kinases related to the insulin signaling pathway when analyzing genes affected by Nr2f6 knockdown in the RNA-seq data and genes with Nr2f6 binding within the promoter region in ENCODE with ChIP-seq data (Figure S1C, D). Considering the increase in the efficiency of the Nr2f6 silenced myocytes to oxidize lipids, we hypothesized that depletion of Nr2f6 would be protected against lipid overload in skeletal muscle. Stable Nr2f6 knockdown in myotubes protected (50%) against palmitate-induced cell death and reduced mitochondrial superoxide production (40%) and decreased cytosolic reactive oxygen species (20%) (Figure 2F, G, H). Since Nr2f6 knockdown can increase lipid handling capacity by upregulating mitochondrial and cytosolic lipid transporters, mitochondrial proteins, and TCA cycle anaplerotic genes, thereby increasing oxygen consumption, we verified whether Nr2f6 is modulated by palmitate treatment *in vitro* and by high-fat diet *in vivo* in rodents²⁵, both pathophysiological conditions of increased lipid oxidation and supply (Figure 2I-K, S2D, E). Our findings demonstrate that Nr2f6 expression is consistently reduced under these conditions, indicating a role as an energy stress response gene that facilitates metabolic adaptations to lipid oxidation. Collectively, the data provide evidence that Nr2f6 inhibition protects against lipid overload by increasing lipid handling capacity in skeletal muscle.

Nr2f6 regulates PGC-1 α and UCP3 expression.

We recently provided evidence that the transcriptional regulation of *UCP3* by the peroxisome proliferator-activated receptor γ co-receptor 1- α (PGC-1 α) is essential for the maintenance of myotube viability during lipid overload, by preventing the production of reactive oxygen species (ROS)^{26,27}. Considering a similar phenotype by Nr2f6 knockdown in myotubes, we investigated whether Nr2f6 regulates the same pathway. We found that Nr2f6 overexpression reduced both *UCP3* and *PGC-1 α* mRNA in myotubes, which also translated to both reduced PGC-1 α protein content and expression of its mitochondrial electron transfer chain (ETC) target genes (Figure 3A-B). Using luciferase reporter assays, we observed Nr2f6 overexpression reduced PGC-1 α promoter activity, suggesting direct repression. Conversely, Nr2f6 knockdown in C2C12 myotubes increased PGC-1 α downstream ETC targets (Figure 3D). Further investigation into the regulation of *UCP3* transcription by Nr2f6 using 7kbp *UCP3* promoter reporter plasmid showed a

reduction in the luciferase signal by Nr2f6 overexpression and an increase in activity following Nr2f6 knockdown (Figure 3E). We scanned the UCP3 promoter region and found an Nr2f6 response element downstream of the transcription initiation site, which coincided with the open chromatin region and peaks of known the UCP3 transcription factors, Myod1 and Myogenin (Figure 3F), further supporting the notion that Nr2f6 directly repressed *UCP3* expression. The effects of Nr2f6 knockdown on *UCP3* and *PGC-1 α* expression could be reproduced in human and mouse primary myotubes (Figure 3G, S3A). UCP3 transcription is regulated by peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and estrogen-related receptors (ERRs) in skeletal muscle^{28,29}, however, Nr2f6 silencing did not change the transactivation of responsive elements (Figure S3B). Collectively, our results indicate that Nr2f6 is a bona fide transcription regulator of UCP3 and PGC-1 α . Given that UCP3 is a PGC-1 α target, these results indicate that Nr2f6 represses *UCP3* expression indirectly by downregulating *PGC-1 α* and by directly binding to the *UCP3* promoter region.

Nr2f6 activates the cell cycle and represses the expression of genes involved in muscle contraction and oxidative metabolism.

We next explored the effects of Nr2f6 overexpression *in vivo* by electroporation in the *tibialis anterior* muscle of mice, using the contralateral muscle as control, and studied the global transcriptomic changes by microarray. There were 3796 genes within the criteria for differential expression (FDR <0.05, Fold change >2), among which, 1915 were downregulated and 1781 were upregulated, with Nr2f6 overexpression having a major effect on the hierarchical clustering (Figure 4A). Consistent with earlier reports that highlight Nr2f6 as a gatekeeper of the immune system¹⁶, gene ontology analysis of the upregulated genes shows enrichment of biological processes and pathways related to the immune system (Figure 4B). RT-qPCR was used to validate markers modulated in microarray analysis. We found that indicators of lymphocyte activation *CD44*, the marker for macrophage/monocyte activation *CD68*, and the macrophage marker *F4-80* were upregulated in Nr2f6 expressing muscle (Figure 4E). Accordingly, *TGF β* , a potent inhibitor of hematopoietic cell activation, and the marker for endothelial and non-differentiated hematopoietic cells were downregulated, consistent with an increase in the number and activity of immune system-derived cells, indicating that Nr2f6 might activate resident cells of the immune system and/or promote the invasion of circulating cells. Nr2f6 overexpression also increased expression

of Myogenin and, to a lesser extent, *Myod*, however the downstream targets genes myosin heavy chains 1 and 2 decreased (Figure 4D). Downregulated genes were enriched in energetic metabolism pathways, mitochondria, and muscle contraction terms (Figure 4C), reinforcing the functional phenotypes described *in vitro*. Importantly, the hereby proposed Nr2f6 targets, namely *UCP3* and *PGC-1 α* , were downregulated by Nr2f6 overexpression (Figure 4F). The lipid transporters *CD36* and *CPT1B*, as well as subunits of the respiratory chain complexes, which were upregulated by Nr2f6 knockdown *in vitro*, were also downregulated by Nr2f6 overexpression. Additionally, the expression of reactive oxygen species scavengers *SOD1*, *SOD2*, and catalase genes was decreased (Figure 4F). Collectively, these findings support our functional results and indicate mitochondrial function was impaired by Nr2f6 overexpression.

Nr2f6 inhibits muscle development and contraction.

Since Nr2f6 overexpression negatively affects the mRNA expression of genes involved in muscle contraction and development, we next investigated whether the Nr2f6 gain-of-function would impair muscle morphology and function by performing immunostaining for myosin heavy chain (MHC) isoforms and *ex vivo* contraction experiments, respectively. Intriguingly, Nr2f6 overexpressing *tibialis anterior* (TA) weighted less and were visually paler compared with control muscle (Figure 5A). Consistent with these observations, Nr2f6 overexpression reduced the total number of fibers (21%), which together with the increase in cell death-related genes (Figure 4B), and the increase in the atrogenes cathepsin and calpain 2³⁰ (Figure S4A), characterizes a state of atrophy (Figure 5B, C). Stratification by fiber type showed that this reduction is particularly due to the decrease in type IIB fibers, which were reduced by 23%, and although there was a tendency to decrease IIX fiber number (Figure 5D), there was no statistical significance in these comparisons or the number of IIA fibers. We then overexpressed Nr2f6 in the *flexor digitorum brevis* (FDB) and performed *ex vivo* contractions to verify alterations in muscle force production and fatigability. Consistent with the immunostaining data, mass-corrected maximal force production was reduced (60%) (Figure 5E), but time to fatigue was unaltered in Nr2f6 overexpressing muscles (Figure S4B). Since the *ex vivo* contraction assay surpasses the neuromuscular system by direct electric stimulation, disregarding action potential issues, fatigability is mostly induced by detriments in calcium handling, such as reduced Ca²⁺ sensitivity, sarcoplasmic Ca²⁺ reuptake, and release³¹. Therefore, we cannot exclude the possibility that the time to fatigue is also affected *in vivo* in Nr2f6

gain-of-function models. So far, these findings strongly suggest induction of atrophy, worsened by an inflammatory state and an imbalance between satellite cell proliferation and differentiation.

Nr2f6 modulates myoblasts' proliferation rates.

Next, we investigated whether Nr2f6 regulates cell cycle genes and myoblast proliferation. Thus, we compared differentially expressed genes identified in the microarray of the Nr2f6 overexpression in TA muscle with the RNA-seq transcriptomics from C2C12 myocytes after transient Nr2f6 knockdown. We found 706 genes were differentially expressed in both experiments, whereby 446 genes were modulated in opposite directions indicating a direct regulation by Nr2f6 or a conserved effect of Nr2f6 modulation in both models (Figure 6A). We further scanned the promoter regions of these genes consisting of 3 kbp upstream and downstream of the transcription start site, for the Nr2f6 binding motif. We found 206 matches in unique genes, whereby 73 were upregulated and 133 downregulated by Nr2f6 overexpression. The interaction network of these high-confidence targets (Figure 6B) reveals that the most connected genes are upregulated by Nr2f6 overexpression and are mostly related to the cell cycle, which emphasizes the role of Nr2f6 as a promoter of cell division, and further reinforces the dysplastic phenotype observed in the gain-of-function experiments *in vivo*. Investigation of canonical pathways of myogenesis cell proliferation and stemness in Nr2f6 overexpressing TAs (Figure 6C, D) showed that the content of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA), an important general marker for cell proliferation³², was increased by Nr2f6 overexpression. Together with the increase of the muscle-specific satellite cell marker Pax7, and the activation by phosphorylation of the stemness markers GSK3a/b^{1,33}, ERK^{34,35}, and S6, these results point to an increase in myogenic progenitors and the infiltration of other cell types, such as cells of the immune system. Nr2f6 overexpression and knockdown can promote or inhibit cell proliferation in cancer cells, respectively^{36–38}. Our doubling time experiments (Figure 6E, G) confirm this effect is also conserved in C2C12 myoblasts, with an increase of 4 hours in the average doubling time in knockdown cells and a decrease of 3.5 hours in Nr2f6 overexpression stable cell lines. Moreover, RT-qPCR validation of major markers of cell cycle progression inhibitors *Rb1* and *p21* show an increase in both genes by Nr2f6 knockdown and a tendency towards downregulation of *Rb1* by Nr2f6 overexpression (Figure 6F, H). Collectively, these results indicate that the function Nr2f6 function as an important repressor of cell cycle progression is conserved in muscle models.

DISCUSSION

Numerous nuclear receptors are necessary for the maintenance of muscle mass^{39,40}. For example, whole-body knockout of Nr1d1 (Rev-ERB α , Ear-1) leads to an increase in atrophic genes, a decrease in muscle mass, and a relative increase in low-diameter fibers⁴¹. More broadly, muscle-specific knockout of the nuclear receptor co-repressor 1 (NCoR1) leads to skeletal muscle hypertrophy and increased oxidative metabolism⁴². Here, we found evidence that a disruption in myogenesis also follows Nr2f6 overexpression *in vivo* and *in vitro*, and myoblast proliferation rates are increased. Remarkably, Nr2f2 (COUP-TFII), an Nr2f6 interactor, is among the few nuclear receptors found to promote muscle wasting^{43,44}. However, Nr2f2 expression in myogenic progenitors impairs muscle differentiation in mice by directly repressing genes related to myoblast fusion and proliferation^{45,46}, implying that myogenesis is disrupted in a different stage. Future studies should address the redundancy of these NRs in muscle function.

Most of the transgenic and knockdown models provide evidence to suggest that nuclear receptors are involved in a general activation of oxidative metabolism³⁹. For example, the muscle-specific Nr4a3 transgenic mouse displays a marked increase in mitochondrial density and fast-to-slow fiber switch⁴⁷. This general rule is reinforced by the fact that mice lacking nuclear receptor co-activators, such as PGC-1 α and MED1⁴⁸, or overexpressing the co-repressor RIP140⁴⁹, have decreased mitochondrial density and fewer oxidative fibers. Conversely, here we show that Nr2f6 is an exception to this model in skeletal muscle since this nuclear receptor can directly reduce PGC-1 α and UCP3 promoter activity, thereby increasing the susceptibility of muscle cells to lipid overload by reducing fatty-acid oxidation and increasing reactive oxygen species production. Transgenic mouse models overexpressing UCP3 in muscle are consistently reported to have improved glucose homeostasis under chow and high-fat diet (HFD) conditions, as well as resistance to obesity-induced diabetes^{50–52}. Moreover, increased levels of circulating lipids increase UCP3 expression^{53,54}. Here, we demonstrate that direct fatty-acid exposure in C2C12 myotubes or conditions of increased β -oxidation *in vivo* reduces Nr2f6 mRNA expression and protein content, further reinforcing the finding that Nr2f6 mediates the positive effects of UCP3 under physiological conditions. Importantly, we show that the regulation of *UCP3* and *PGC-1 α* expression by Nr2f6 is conserved in human skeletal muscle cells.

Sarcopenia is the age-related loss of muscle mass and function, with the reduction of the number and size of myofibers, a switch from type II to I fibers⁵⁵, and an underlying mitochondrial

dysfunction⁵⁶. This phenotype is closely reproduced by Nr2f6 overexpression in skeletal muscle. In contrast to most members of the NR family, Nr2f6 overexpression not only induces a sarcopenic-like phenotype, with loss of muscle mass and inflammation but also reduces muscle strength and affects energy metabolism. Interestingly, Nr2f6 is upregulated 2-fold in skeletal muscle hereditary spastic paraplegia⁵⁷, a disease characterized by progressive lower limb muscle weakness, sometimes accompanied by mitochondrial dysfunction and morphological fiber defects^{58,59}. While additional experiments are warranted to assess the effects of Nr2f6 ablation *in vivo*, Nr2f6 knockdown in myotubes increases myosin heavy chain expression and improves mitochondrial function, suggesting that inhibition of Nr2f6 might be efficacious in the treatment of sarcopenia or other myopathies. Nr2f6 agonists have been proposed as a possible treatment for colitis⁶⁰, but based on our finding that Nr2f6 gain-of-function alone provokes muscle loss, the use of such agonists should be further evaluated for the treatment of patients suffering from myopathies and cachexia. Considering the known effects of Nr2f6 in the inflammatory response, the atrophic phenotype may be supported by a role of Nr2f6 in immune cells. Nonetheless, the antagonistic transcriptional changes induced by Nr2f6 overexpression *in vivo*, and knockdown *in vitro* strongly indicate a direct action of Nr2f6 in the myofibers as the major driver of the functional changes.

A conceivable model elucidating the mechanism by which Nr2f6 overexpression culminates in a reduction of muscle force production (Figure 7), entails the downregulation of genes engaged in various facets of muscle contraction, such as muscle structure, calcium cycling, and action potential. Notably, a few of these genes constitute high-confidence targets. The ryanodine receptor 1 (*Ryr1*) is a major component of the calcium release complex, which permits calcium efflux from the sarcoplasmic reticulum into the cytosol. As such, *in vivo* knockdown and mutations of *Ryr1* can cause severe myopathies⁶¹. Other putative targets including myosin light chain kinase 4 (*Mylk4*) and myomesin 1 (*Myom1*) are downstream of the androgen receptor (AR), which mediates the effects on muscle force production⁶². Interestingly, we found that the spermine oxidase gene (*Smox*), another important target of the AR in muscle^{63,64} is downregulated by Nr2f6 overexpression *in vivo*, upregulated by Nr2f6 silencing in C2C12 myocytes, and contains Nr2f6 binding motifs at the promoter region. The direct link between Nr2f6 and the spermine synthesis pathway and a possible interaction with the AR warrant further studies.

Targeted studies provided evidence that Nr2f6 activates gene expression by tethering to the promoters of *circRHOT1*⁶⁵, *DDA1*⁶⁶, and *CD36*¹⁰ and represses the expression of numerous others

such as *IL17*, *IL21*, Renin, and Oxytocin^{36,37,67,68}. More broadly, our transcriptomics experiments display an equilibrated number of genes up- and downregulated, further implying that Nr2f6 is a dual-function transcription factor. Interestingly, Nr2f6 is a target of MiR-142-3p⁶⁹, raising the possibility that miRNAs, besides protein partners and post-translational modifications³⁶, might aid in the regulation of Nr2f6 activity. Further studies should help to elucidate the mechanism by which Nr2f6 acts as a repressor or activator of gene expression. The case of *CD36* illustrates context-dependent regulation given that this gene is activated in the liver¹⁰, but repressed in skeletal muscle by Nr2f6 in mice and humans. This finding suggests that Nr2f6 may be bound to DNA but kept in a repressive state by post-translational modifications or interaction partners, such as RAR Related Orphan Receptor γ (ROR γ), another regulator of *CD36* transcription in muscle⁷⁰ and liver⁷¹. In Th17 lymphocytes, Nr2f6 can compete with ROR γ for binding at the *Il17* promoter, maintaining the repressive state. This relationship may also be present in skeletal muscle.

As reported for other cell types¹¹, Nr2f6 also modulates myoblast proliferation *in vitro* and increases the expression of proliferation markers such as *PCNA* and *KI67* *in vivo*. In Nr2f6 overexpressing muscle, Myogenin expression is also increased. However, the myosin heavy chains and other indicators of terminally differentiated myofibers are sharply reduced. These findings raise the possibility that the Nr2f6-overexpressing myoblasts proliferate but fail to assemble into robust myofibrils due to a dysregulated temporal modulation of the MRFs during myogenesis, which critically impairs muscle fiber formation and force production. Key regulators of cell cycle cyclin B1 and Cdk1 are placed among high-confidence direct targets of Nr2f6. Cyclin B1 interacts with Cdk1 and is necessary for kinase activity⁷² and progression through the G2 mitotic phase. Moreover, *Ccnb1* overexpression is increased in several cancer types and ectopic expression increases cell proliferation rates^{73,74}. The simultaneous effect of Nr2f6 modulation on cell cycle and differentiation markers might also be sustained indirectly by the expression of the retinoblastoma protein, which is responsible for cell cycle arrest through the inhibition of the E2F family of transcription factors. In a feedback loop, E2F TFs antagonize MyoD1, which induces Rb expression, thereby linking processes of proliferation and differentiation^{75,76}.

Although Nr2f6 has been extensively studied as a key factor in cell proliferation, differentiation, and metabolism in various tissues, its role in skeletal muscle has been largely unknown. In summary, our findings provide evidence that Nr2f6 plays a critical role in the regulation of several aspects of muscle biology. Nr2f6 modulation alone can determine myoblast

proliferation rates, consolidating its role as a major regulator of cell cycle progression. In conclusion, we report that Nr2f6 is a novel regulator of muscle contraction and metabolism, which may hold promise as a possible strategy for the treatment of muscle wasting and metabolic diseases.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP) (thematic projects and scholarships: 2016/23008-5, 2017/24795-3, 2021/07411-2, 2018-20581-1, 2017/24851-0), by the Karolinska Institutet Grants with support from Swedish Diabetes Foundation (DIA2021-645), Swedish Research Council for Sport Science (P2019-0140 and P2020-0064), and the Swedish Research Council (2015-00165). This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001 and by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). We would like to appreciate the technical support of Ann-Marie Petterson.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization, D.S.P.S.F.G., N.M.F.B, A.G.O., D.R.R., M.J., J.A.B.S., T.R.A., A.S.V., A.K., J.R.Z., L.R.S.; Methodology, D.S.P.S.F.G., N.M.F.B, D.R.R., M.J.; Validation, D.S.P.S.F.G., N.M.F.B, L.R.S.; Formal Analysis, D.S.P.S.F.G., N.M.F.B; Investigation, D.S.P.S.F.G., N.M.F.B, A.G.O., D.R.R., M.J., J.A.B.S., T.R.A., M.V.C., A.S.V., S.M.H; Resources, A.K., J.R.Z., L.R.S.; Writing – Original Draft, D.S.P.S.F.G., A.K., J.R.Z., L.R.S.; Writing – Review & Editing, D.S.P.S.F.G., A.K., J.R.Z., L.R.S.; Visualization, D.S.P.S.F.G.; Supervision, A.K., J.R.Z., L.R.S.; Project Administration, A.K., J.R.Z., L.R.S.; Funding Acquisition, A.K., J.R.Z., L.R.S.; The final version of the manuscript has been read and approved by all the authors.

DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing interests.

FIGURES

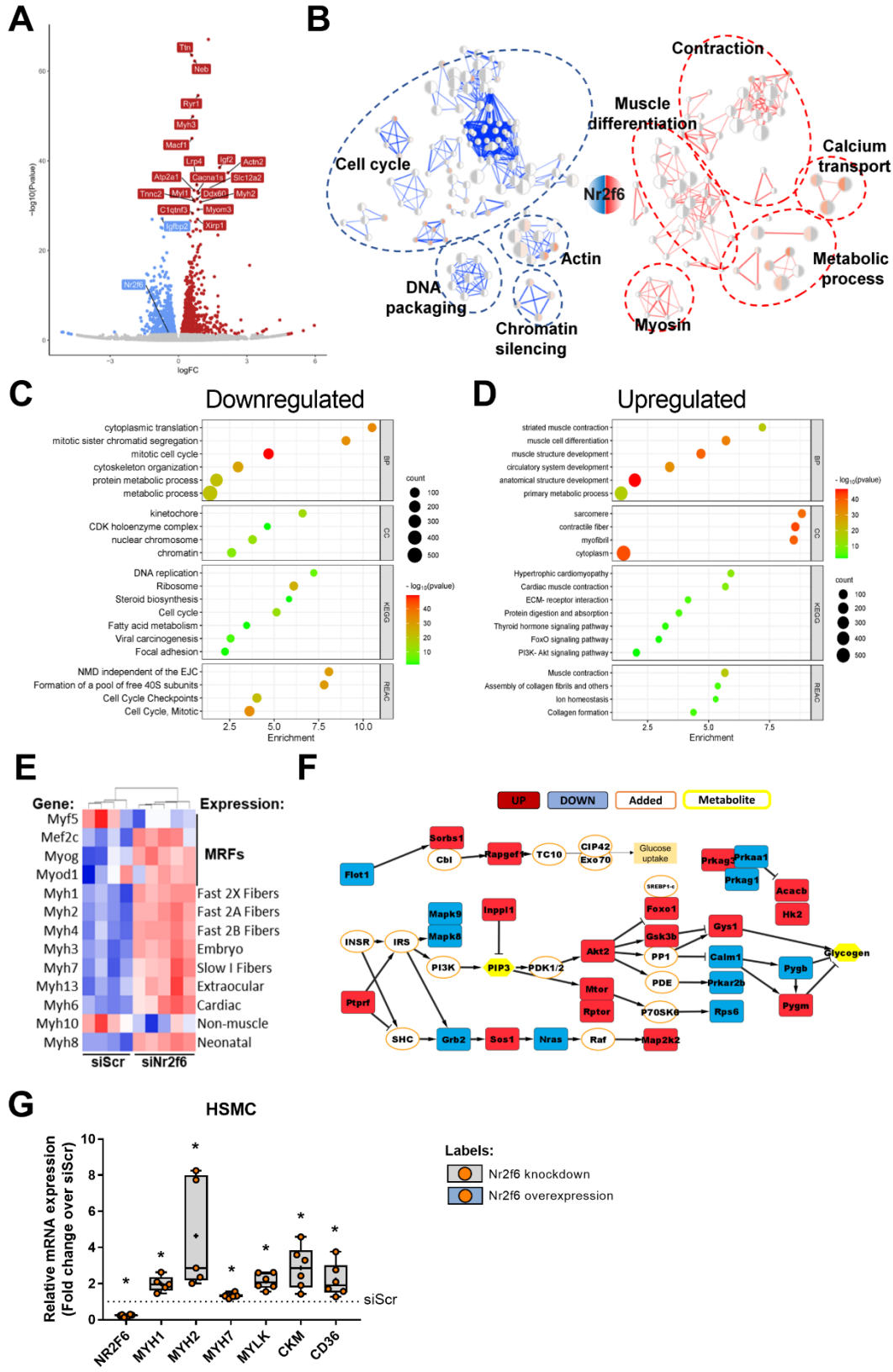


Figure 1. Nr2f6 knockdown derepresses the expression of genes involved in metabolism and myogenesis.

(A) Volcano plot of Nr2f6 knockdown C2C12 myocytes. Genes upregulated in red and downregulated in blue (FDR <0.05, $\log_2FC > 0.5$). N=4-5.

(B) Network of ontology terms enriched in the differentially expressed genes. Groups of similar terms were manually curated and encircled as indicated.

(C, D) Gene ontology enrichment of downregulated and upregulated genes.

(E) Panel of myogenic differentiation markers differentially regulated by Nr2f6 knockdown with Myogenic Regulatory Factors (MRFs) and myosin isoforms with their respective fiber expression pattern^{77,78}.

(F) Insulin signaling pathway schematic displaying differentially expressed genes after Nr2f6 knockdown and other components of the pathway. Metabolites are depicted in yellow borders and unchanged genes are in orange borders.

(G) Gene expression measured by RT-qPCR of markers of myogenic differentiation in primary human skeletal muscle cells transfected with control non-target RNAi (siScr) or siNr2f6. N = 5-6. Boxplot with whiskers spanning minimum to maximal and box edges 25th-75th percentile, the line at the median and + at the mean. * Indicates $p < 0.05$ using unpaired two-tailed Student's t-test.

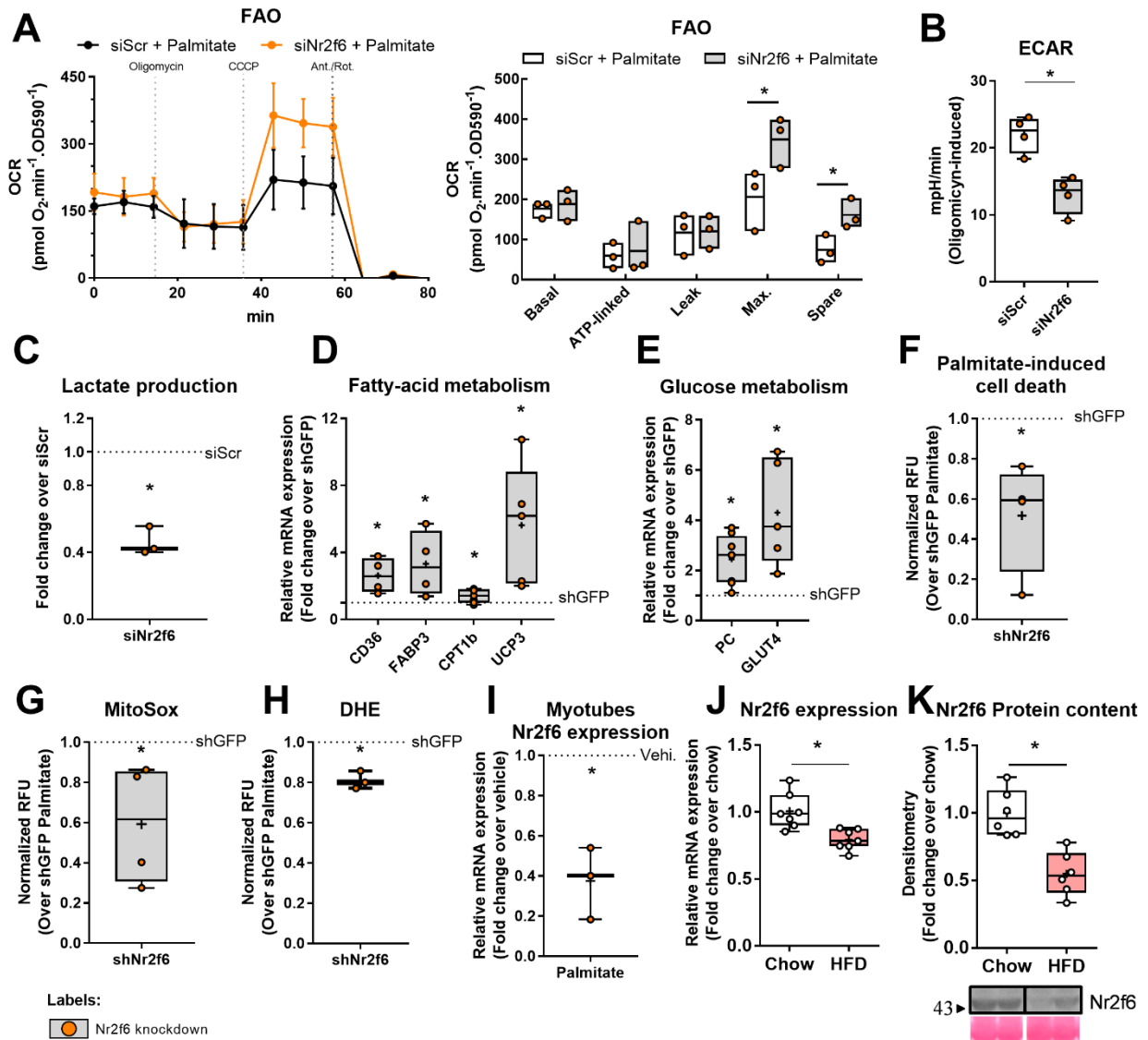


Figure 2. Nr2f6 depletion increases fatty acid oxidation and protects cells against lipid-induced stress.

(A) Fatty-acid-dependent oxygen consumption assay in control siScr and siNr2f6 C2C12 myocytes. Data displayed as mean $\pm$ SD. On the right, calculated respiratory parameters are displayed as a line on the mean and minimum to max bars. N = 3. * Indicates $p < 0.05$ using unpaired two-tailed Student's t-test.

(B) Oligomycin-induced extracellular acidification rate during a high-glucose oxygen consumption assay. N=4.

(C) Lactate measurement in cell culture media of C2C12 myocytes transfected with control siScr and siNr2f6. N=3.

(D, E) Relative gene expression using RT-qPCR in stable Nr2f6 knockdown (shNr2f6) C2C12 cells and control shGFP stable cells.

(F) Cell death as measured by propidium iodide in control (shGFP) and shNr2f6 myocytes following treatment with 500 μ M palmitate for 20 hours. N=3.

(G, H) Mitochondrial and total superoxide production following palmitate treatment in shGFP and shNr2f6 stable C2C12 cells. N=3-4.

(I) Relative Nr2f6 mRNA expression in C2C12 myotubes treated with 500 μ M palmitate or vehicle for 20 hours. N=3.

(J) Relative Nr2f6 mRNA expression in the gastrocnemius of mice undergoing a control chow or high-fat diet for 16 weeks. N=7.

(K) Densitometry and representative western blot image of Nr2f6 in gastrocnemius lysates from mice fed HFD or control chow for 16 weeks. N=6.

Boxplot with whiskers spanning minimum to maximal and box edges 25th-75th percentile, the line at the median and + at the mean. * Indicates $p < 0.05$ using unpaired two-tailed Student's t-test.

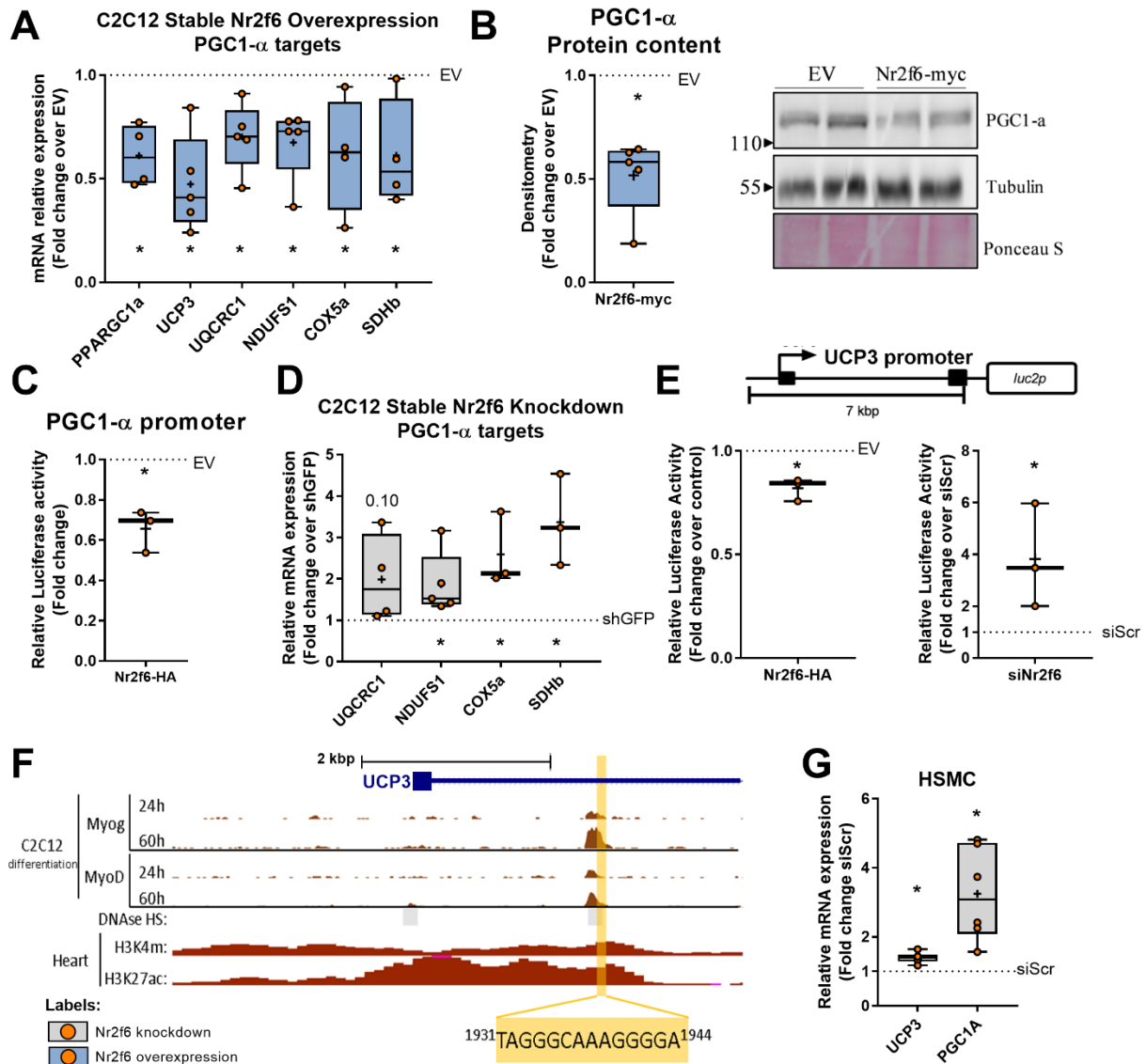


Figure 3. Nr2f6 directly regulates PGC1- α and UCP3 gene expression.

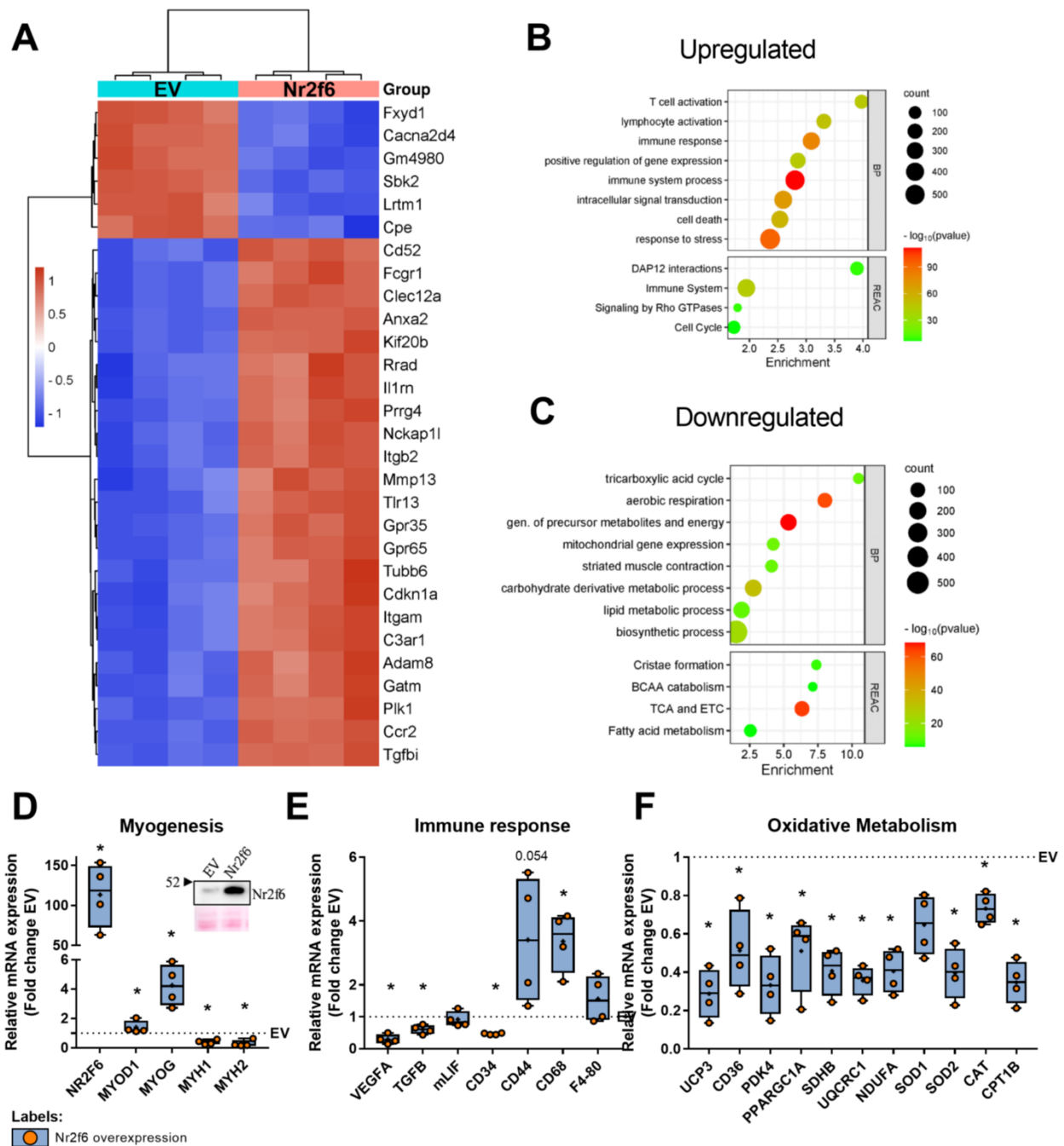
- (A) Relative gene expression using RT-qPCR in stable Nr2f6-myc overexpression myotubes. N=4-5.
- (B) Densitometry and representative images of PGC1- α western blot in stable Nr2f6-myc overexpression myotubes. N=5.
- (C) Relative gene expression using RT-qPCR in stable Nr2f6 knockdown myotubes. N=3-5.
- (D) Luciferase reporter assay in HEK293 cells with 2 kbp PGC1A promoter overexpressing HA-tagged Nr2f6 or control empty vector (EV).

(E) Luciferase activity of UCP3 promoter transactivation assay in cells overexpressing Nr2f6-myc and siNr2f6 transfected cells. N=3.

(F) Mouse UCP3 genomic locus retrieved from UCSC Genome Browser with the Nr2f6 response element highlighted. Top tracks: ChIP-seq of Myogenin and MyoD at 24h and 60h of differentiation. Middle track: DNase hypersensitivity assay, with open sensitive regions in grey. Bottom tracks: histone marks ChIP-seq.

(G) Relative gene expression using RT-qPCR in human primary skeletal myotubes transfected with siNr2f6 or siScr. N=6.

Boxplot with whiskers spanning minimum to maximal and box edges 25th-75th percentile, the line at the median and + at the mean. * Indicates $p < 0.05$ using unpaired two-tailed Student's t-test. The numbers above some bars indicate the p-value.



(D, E, F) Validation of selected markers modulated in the microarray by RT-qPCR. N=4. Insert on D: representative western blot for validation of Nr2f6 protein content in *tibialis anterior* samples under control and electroporated conditions. Boxplot with whiskers spanning minimum to maximal and box edges 25th-75th percentile, the line at the median and + at the mean. * Indicates $p < 0.05$ using unpaired two-tailed Student's t-test. The numbers above some bars indicate the p-value.

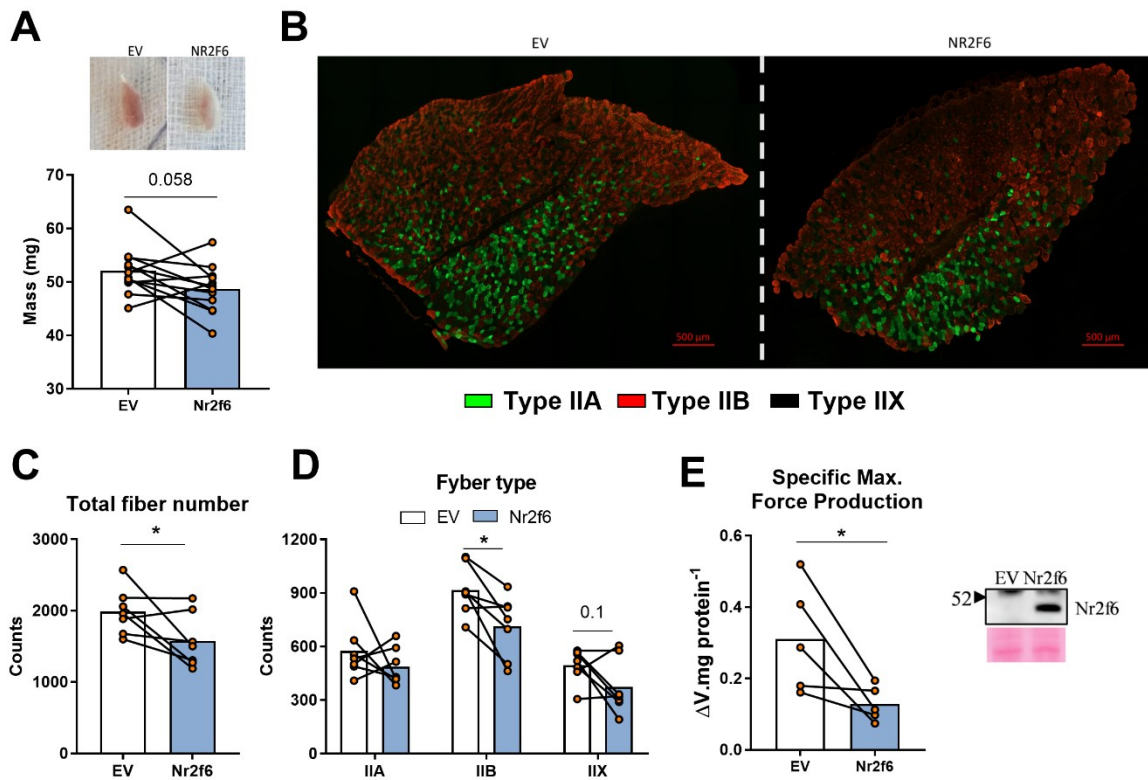


Figure 5. Overexpression of Nr2f6 induces muscle atrophy and impairs muscle force production.

(A) Weight of *tibialis anterior* muscles (TA) electroporated with empty vector or Nr2f6 coding plasmid. Top: representative photo. N=12.

(B) Representative images of myosin heavy chain staining in the electroporated TAs for fiber type determination. In green, MHC IIA; in red, MHC IIB; unstained fibers as IIX. No significant number of MHCI fibers were stained, therefore the corresponding channel was omitted. N=7.

(C, D) Total and type-segmented number of fibers. N=7.

(E) *Ex-vivo* contraction maximal force production in FDB muscles electroporated with control empty vector (EV) or Nr2f6 coding plasmid. N=5.

Data are displayed as individual animals and bars at the mean. * Indicates $p < 0.05$ using ratio paired two-tailed Student's t-test.

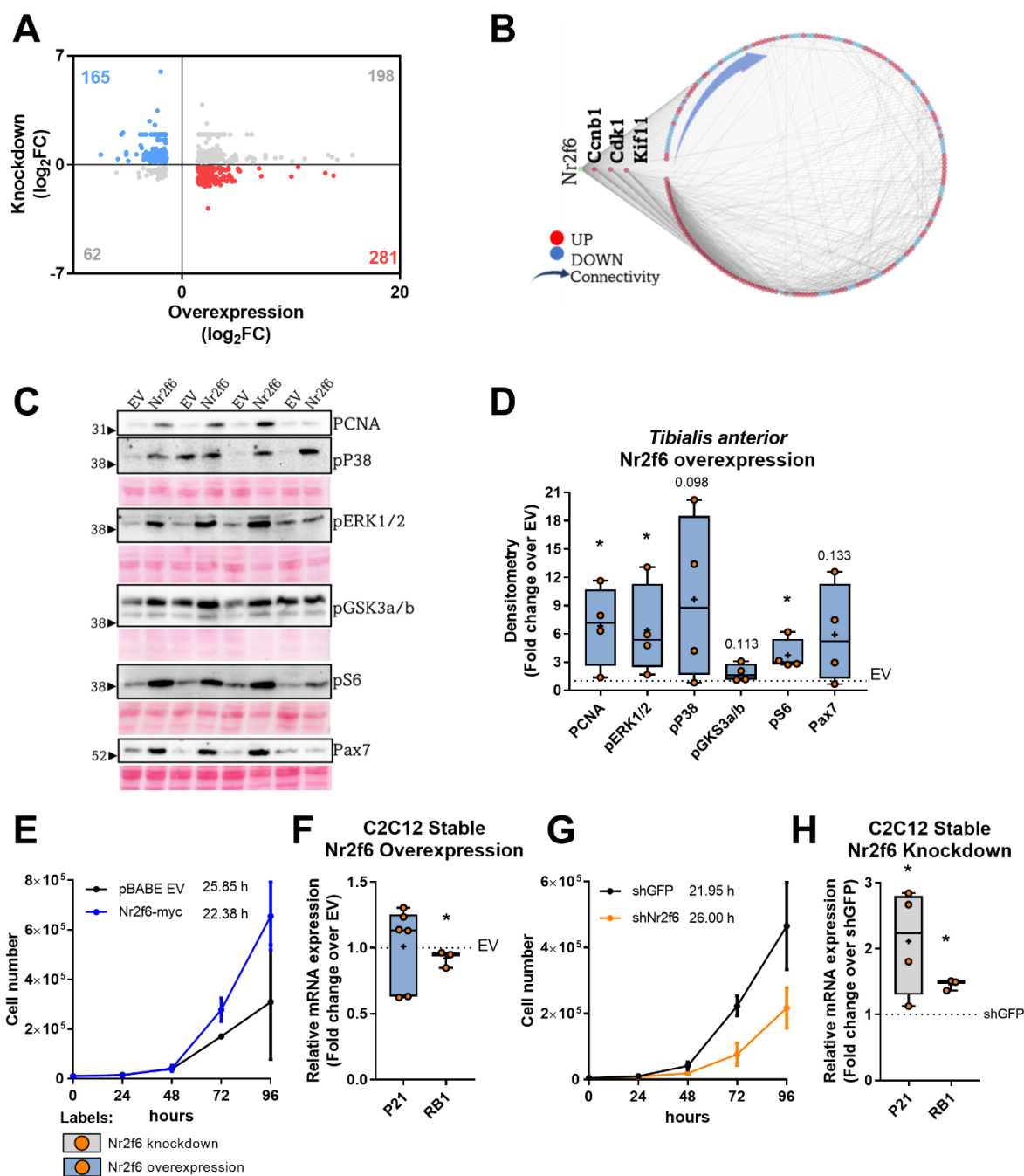


Figure 6. Nr2f6 promotes myoblast proliferation.

(A) Scatter plot of differentially expressed genes in Nr2f6 knockdown in C2C12 myocytes and Nr2f6 overexpression in mice TA. In red: genes upregulated by Nr2f6; in blue: genes downregulated by Nr2f6; in grey: genes with the same direction of modulation by Nr2f6 overexpression and knockdown.

(B) Interaction network of genes consistently regulated by Nr2f6 overexpression and knockdown and with detected Nr2f6 binding motif at the promoter region. In blue: genes downregulated; in red: genes upregulated. The number of connections of each gene increases clockwise.

(C, D) Representative images of western blot of the electroporated *tibialis anterior* and densitometric quantitation of protein bands. N=4.

(E, G) Proliferation curves of stable Nr2f6 knockdown and overexpression cell lines and the calculated doubling time.

(F, H) RT-qPCR of cell cycle arrest markers in Nr2f6 knockdown and overexpression stable cell lines, respectively. N=4-6. Boxplot with whiskers spanning minimum to maximal and box edges 25th-75th percentile, the line at the median and + at the mean. * Indicates $p < 0.05$ using unpaired two-tailed Student's t-test. The numbers above some bars indicate the p-value.

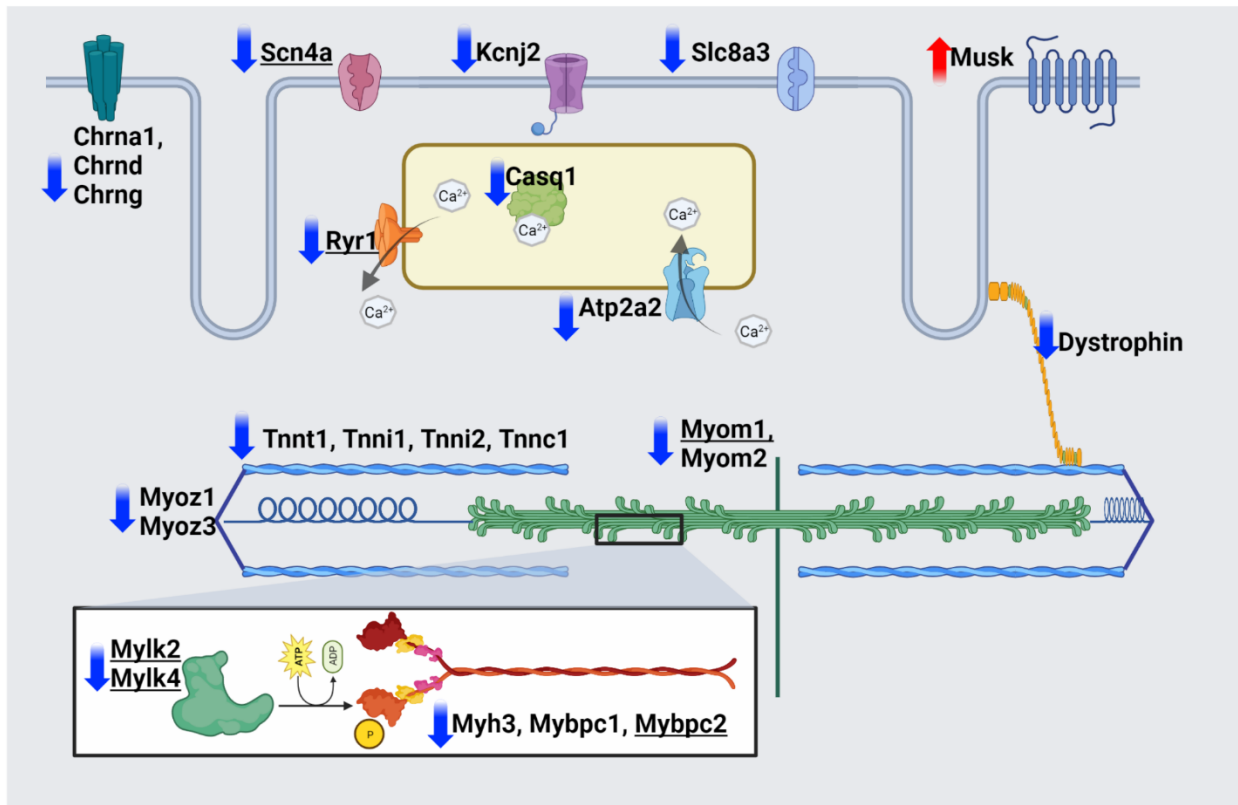


Figure 7. Nr2f6 represses core genes of muscle contraction.

Nr2f6 overexpression reduces the expression of several genes of the contractile apparatus, myofiber calcium handling, and action potential transduction. Genes with Nr2f6 binding motif at the promoter are underscored. Differentially expressed genes following Nr2f6 overexpression in mouse TA were selected according to ontology terms related to muscle contraction and function. The arrows indicate the up- or downregulation. Sodium Voltage-Gated Channel Alpha Subunit 4 (Scn4a), Potassium Inwardly Rectifying Channel Subfamily J Member 2 (Kcnj2), Solute Carrier Family 8 Member A3 (Slc8a3), Muscle Associated Receptor Tyrosine Kinase (Musk), Ryanodine Receptor 1 (Ryr1), Calsequestrin 1 (Casq1), ATPase Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} Transporting 2 (SERCA2, Atp2a2), Cholinergic Receptor Nicotinic Alpha 1/delta/gamma subunit Chrna1/d/g), Troponin T1/I1/I2/C1 (Tnnt1/Tnni1/Tnni2/c1), Myom1/2 (Myomesin1/2), Myozenin1/3 (Myoz1/3), Myosin light chain kinase 2/4 (Mylk2/4), Myosin heavy chain 3 (Myh3), Myosin binding protein C1/2 (Mybpc1/2)

STAR METHODS

Resource availability

The materials originally produced in this study are available upon request to the lead contact. The transcriptomic data generated in this study can be accessed at GSE229102 and GSE228202. This paper analyzed publicly available datasets listed in the key resource table.

Experimental model details

Cell culture Human primary skeletal muscle cells were isolated from healthy female and male donors⁷⁹, age 55 ± 5 years old, BMI 25.6 ± 1.5 kg.m⁻². Myoblasts were maintained in Growth Media (DMEM/F12 High Glucose (Gibco, #31331093) supplemented with 10 mM HEPES (Gibco #15630-056), 16% Fetal calf serum (Sigma, #F7524), and antibiotics (Gibco #15240-062) and differentiated at the confluence with fusion media (74% DMEM High Glucose (Gibco, 31966-021), 20% 199 Medium (Gibco #31150-022), 20 mM HEPES, antibiotics, 0.03 µg/mL Zinc Sulfate (Sigma #Z4750), 1.4 mg/mL Vitamin B12 (Sigma #V6629), and 2% Fetal Calf Serum) supplemented with 100ug/mL Apotransferrin (Biotechne #3188-AT-001G) and 1.7 mM Insulin (Actrapid Penfill, Novo Nordisk #13509) before use. After 5 days of fusion, apo transferrin and insulin were removed from the media, and cells were incubated for 4 more days. Cells were cultivated in a humidified atmosphere containing 7.5% CO₂ and regularly tested for mycoplasma. C2C12s, MEFs, and HEK cells were maintained in DMEM High Glucose (Gibco, 31966-021) supplemented with 4 mM L-glutamine, 10% fetal bovine serum, 1 mM sodium pyruvate, and antibiotics. Fetal bovine serum was substituted by 2% horse serum to induce myogenesis in C2C12 cells when 90-100% confluence was reached, and experiments were performed 5 days later.

Primary mouse skeletal muscle cells Mice's primary skeletal muscle cells were isolated from wild-type C57Bl6/JUnib as described⁸⁰. After euthanasia, hindlimb muscles were dissected and digested with collagenase II, trypsin, and DNase I. Cells were sifted through a 70 µm cell strainer and plated in 0.1% Matrigel-coated plates. Myoblasts were maintained for 2 days in DMEM High Glucose supplemented with 2 mM L-glutamine, 10% fetal bovine serum, 10% horse serum, 1 mM sodium pyruvate, and antibiotics. Myogenesis was induced by removing fetal bovine serum from the media when confluence was reached, and cells were cultivated for 5 more days. The experiments were approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA/Unicamp #5626-1/2020).

Animals All electroporation experiments were conducted following the guidelines of animal welfare and were approved by the Stockholm North Animal Ethical Committee (Stockholm, Sweden). Male C57Bl6/J mice were acquired from Jackson Labs and maintained at 12/12h light/dark cycle under controlled temperature and humidity, and *ad libitum* access to food (Specialized Research Diets, # 801722) and water. The use of animals for high-fat diet experiments was approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA/Unicamp #5626-1/2020) and all the welfare guidelines of the National Council of Control of Animal Experimentation (CONCEA) were followed. Male C57Bl6/JUnib mice were kept under the same conditions described above. Mice were provided a high-fat diet (PragSolucoes #0015, 60% kcal from lipids) at 4 weeks of age for 16 weeks; littermates were fed a standard chow diet as a control.

Method details

Reactive oxygen species measurement Cells were incubated with 5 nM MitoSOX (Invitrogen, #M36008) or 5 μ M DHE (Invitrogen, #D11347) in DMEM without phenol red supplemented with 1 mM Sodium Pyruvate, 4 mM L-glutamine, and 25 mM Glucose for 30 min and washed three times before reading in a plate reader 510/580 nm (ex/em) or 520/610 nm (ex/em) for DHE. Samples were fixed and stained with Crystal Violet for normalization.

RT-qPCR Total RNA was extracted from cells with TRIzol (Invitrogen #15596-018) following the manufacturer's instruction and cDNA was synthesized with a High-Capacity Reverse Transcription kit (Applied Biosystems #4368814). cDNA was diluted to 10 ng/ μ L and 20 ng was used for qPCR reactions. NormFinder⁸¹ was used to decide the best combination of internal controls among RPL39, PPIA, HPRT, 18S, ACTB, and GAPDH. In the *in vivo* electroporation experiments, gene expression was normalized using HPRT-PPIA geomean with TaqMan probes or HPRT-RPL39 geomean when SYBER green was used. For other experiments, gene expression was normalized with multiplexed HPRT when TaqMan probes were used or with RPL39 when SYBER was used. Relative expression was calculated by the $\Delta\Delta C_T$ method⁸² and is expressed as fold change over the indicated control.

RNA-seq Total RNA was extracted with TRIzol and the upper phase containing RNA was loaded into RNeasy columns (Qiagen, #74004) after the addition of isopropanol, following the manufacturer's instructions. cDNA libraries were prepared with TruSeq Illumina Total RNA Stranded (Illumina) with Ribo-zero rRNA depletion (Illumina). Sequencing was outsourced to Macrogen Inc. (Seoul, South Korea) and performed in a HiSeq X (Illumina), producing an average

of 50.8 Mreads, 95% above Q30. Sequence trimming and adapter removal were done with Trimmomatic⁸³ with the following modifications: HEADCROP = 10, MINLEN = 20, AVGQUAL = 20. Reminiscent reads were aligned to the mouse genome (Ensembl GrCm38) with RNA Star 2.7.2b and gene-level counts were calculated with featureCounts v1.6.4. Differential expression was performed with EdgeR with TMM normalization and p-value adjustment using Benjamini and Hochberg normalization with a 0.05 false discovery rate (FDR) cut-off. The Galaxy platform was used to process all data. Pathway enrichment analysis was done in g:Profiler with an FDR cutoff of 0.01. Interaction networks were generated by String.db and analyzed with CytoScape v3.8 using the EnrichmentMap plugin.

Palmitate treatment Palmitate (Sigma, #P5585) in absolute ethanol was conjugated with 1% fatty-acid-free bovine serum albumin (Sigma, #A7030) in cell media for 15 min at 55 °C to a 500 µM final concentration. Cells were treated with fresh solutions of palmitate or vehicle (1%BSA, 1% ethanol) for 20 hours.

Promoter transactivation assays Luciferase reporter assays were performed in MEF cells transfected with a UCP3 reporter plasmid⁸⁴ (UCP3 EP1, Addgene #71743) or PGC-1 α 2kb promoter⁸⁵ (Addgene #8887), normalization plasmid coding for *Renilla* luciferase (pRL-SV40) and either control empty vector or Nr2f6 coding plasmid (Gift from Dr. Gottfried Baier, Medical University of Innsbruck, Austria) using Lipofectamine 3000. Luciferase activity was measured with DualGlo Luciferase Reporter Assay (Promega, #E2920). For knockdown assays, cells were transfected with siRNAs one day before the transfection of the reporter plasmids.

siRNA knockdown C2C12 cells were transfected with 200 nM non-target siRNA (siScr, Qiagen) or siNr2f6 (Sigma) using Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen) following manufacturer's instructions concomitantly with the myogenesis media switch. Experiments were performed on the third or fiftieth day of differentiation. Primary human skeletal muscle cells were transfected at the fiftieth day of differentiation with 5 nM siScr (Ambion) or siNr2f6 (Ambion).

Stable cell lines The Nr2f6-myc insert was subcloned from the Nr2f6-myc-flag plasmid into the pBABE-Puro vector using standard PCR with primers spanning the transcription start site and the myc tag. The viral particles for generating the overexpression HEK293T cells were transfected with pCMV-VSVG, pCL-Eco, and the pBABE-Nr2f6-myc or empty vector. For producing viral particles with the knockdown plasmid, HEK293T cells were transfected with packaging vectors pCMV-dR8.2 dvpr, pCMV-VSVG, and pLKO.1-shGFP or shNr2f6 (TRCN0000026147). Cell

medium containing virions was collected, filtered at 0.45 μm , and stored at -80°C until further use. Virus concentrations were titrated by the minimal dilution method, C2C12 cells were transduced with 1 MOI, and cells were selected with 2 $\mu\text{g/mL}$ puromycin for 4 days. The clonal selection was performed in the knockdown cells and the clones were validated as indicated. The modified cells and their respective controls were cultivated synchronously under the same conditions.

Electroporation Mice were kept under 2% isoflurane-induced anesthesia and the *tibialis anterior* muscles were injected with 30 μL of 1 mg/mL hyaluronidase (Sigma, #H3506). After 2 hours, the lateral and contralateral *tibialis anterior* were injected with 30 μg of either control empty vector pCMV6 or Nr2f6-myc-flag overexpression plasmid (Origene, #MR206083) and 220V/cm were applied in 8 pulses of 20/200 ms on/off (ECM 830 Electroporator, BTX). Terminal experiments were performed 9 days after electroporation with 13 weeks old mice. For electroporation of FDB muscles, after anesthesia 10 μL of 1 mg/mL hyaluronidase were injected into the footpads and after 1 hour, 20 μg of the control or Nr2f6 coding plasmids. Mice rested for 15 minutes and then 75V/cm were applied in 20 pulses of 20/99 ms on/off with the aid of sterile gold acupuncture needles.

Contraction Mouse FDB muscles were electroporated as described and dissected 8 days later. With the muscles still attached to the tendons, contraction threads were tied at the most distal and proximal tendons, and the muscles were transferred to contraction chambers containing prewarmed and continuously oxygenated KHB buffer at 30°C . The optimal muscle length was determined, and all subsequent measurements were performed at this length. For maximal force production mice, FDBs were stimulated at 10, 30, 50, 80, 100, and 120 Hz for 1 second and with 0.1 ms pulses. Muscles were left to rest for 5 minutes before starting the fatigue protocol as follows: 0.1 s train duration, 0.3 s train delay, and pulses of 0.1 ms at 50 Hz. The maximal force was evaluated again 5 min after the end of the fatigue protocol to check muscle integrity. Muscles were weighed and protein extraction was performed to normalize. The maximal force was calculated with the difference of the peak force at 120 Hz and the baseline and time to fatigue taken as the time necessary to reach 50% intensity of the first peak.

MHC Staining Electroporated *tibialis anterior* muscles were embedded in O.C.T, immediately frozen in nitrogen-cooled isopentane, and stored at -80°C until cryosectioning. Muscle slices were blocked (5% Goat serum, 2% BSA, 0.1% sodium azide in PBS) for 3 hours at room temperature and probed with primary antibodies overnight at 4°C in a humidified chamber. The slides were washed 3 times with PBS and incubated with Alexa Fluor conjugated secondary antibodies for 2

hours at room temperature. Coverslips were mounted with ProLong antifade Diamond and whole sections were imaged with a fluorescent scanning microscope at 20x magnification.

Oxygen consumption assays Oxygen consumption rates were measured in a Seahorse XF24 extracellular flux analyzer according to the manufacturer's instructions. The following drugs were used in the assay: 1 μ M oligomycin (Oligo), 2 μ M carbonyl cyanate m-chlorophenyl hydrazone (CCCP), and 1 μ M rotenone/antimycin (Rot./Ant). ATP-linked OCR was calculated by subtracting OCR post oligomycin addition from the OCR measured before. Reserve capacity was determined by subtracting basal from maximal OCR. Non-mitochondrial values were subtracted before all calculations. For fatty-acid oxidation assays, cell media was switched to low glucose 12 hours before the measurements, and cells were equilibrated in KHB supplemented with 1g/L glucose, 4 mM L-glutamine, and 1 mM sodium pyruvate for 1 hour. Immediately before the assay, BSA-conjugated palmitate was added to a final concentration of 200 μ M, and the drugs were added in the same manner. During routine oxygen consumption assays, cells were maintained in phenol red-free DMEM, supplemented with 4.5g/L glucose, 4 mM L-glutamine, and 1 mM sodium pyruvate, without sodium bicarbonate.

Lactate measurement Cells were grown in 96 well plates and then incubated for 3 h with 50 μ L Krebs-Henseleit Buffer (1.2 mM Na₂HPO₄, 2 mM MgSO₄, 4.7 mM KCl, 111 mM NaCl, pH 7.3) supplemented with 25 mM glucose, 1 mM pyruvate, and 4 mM Glutamine. Lactate production was enzymatically quantified as NADH fluorescence (360 nm/460 nm) by the reverse reaction of L-lactate dehydrogenase (Rabbit muscle, L25005KU, Sigma) in a reaction containing 20 μ L cell media, 2 μ g enzyme, 50 mM Tris, and 625 mM Hydrazine in PBS. Following the assay, the cells were fixed and stained with crystal violet for cell number normalization.

Western blot Protein extracts from cells and tissues were obtained with RIPA Buffer (Thermo Scientific, # 89900) and 30 μ g loaded into SDS-PAGE gels. Proteins were then transferred to 0.45 μ m PVDF membranes, probed with the indicated primary antibodies, and detected with ECL. Band intensities were normalized by Ponceau S intensity and data is shown as fold-change over control.

Microarray RNA was extracted with TRIzol and subsequently column-purified using RNeasy Mini Kit (Qiagen). Sample integrity was assessed, and the library was prepared using Affymetrix Whole Transcript (WT) Assay kit probed in CGAS cartridge for Clariom S (mouse) following manufacturer's instructions. Total RNA quality was assessed by Agilent Technologies 2200 TapeStation and concentrations were measured by NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer. Total

RNA (150 ng) was used to generate amplified sense strand cDNA targets using GeneChip® WT Plus Reagent Kit (ThermoFisher Scientific) followed by fragmentation and labeling. 2.3 µg of ss cDNA target was hybridized to Clariom™ S Mouse Arrays for 16 hours at 45°C under rotation in Affymetrix Gene Chip Hybridization Oven 645 (ThermoFisher Scientific). Washing and staining were carried out on Affymetrix GeneChip® Fluidics Station 450 (ThermoFisher Scientific), according to the manufacturer's protocol. The fluorescent intensities were determined with Affymetrix GeneChip Scanner 3000 7G (ThermoFisher Scientific). Transcriptome Analysis Console (TAC) software (v4.0.3, ThermoFisher Scientific) was used for the analysis of microarray data. Signal values were log2-transformed, and quantile normalized using the Signal Space Transformation (SST-RMA) method. Paired comparisons of gene expression levels between sample groups were performed using moderated t-test as implemented in BioConductor package limma. Gene ontology enrichment tests were performed with g:profiler excluding electronic annotations.

Cell-death assays Cell-death assays were performed as described⁸⁶, with slight modifications. Propidium iodide was added to a concentration of 5 µg/mL in cell culture media and incubated for 20 minutes. Hoechst 33342 was then added to a final concentration of 1 µg/mL and samples were incubated for another 10 minutes. Fluorescence was measured at 530/620 nm (ex./em.) and 350/460 (ex./em.) nm in a plate reader.

Cell doubling time Cells (10^4) were plated in four replicates in 12-well plates. Thereafter, cells were collected every 24 hours using trypsin and counted in a Neubauer chamber. The normalized data of three independent experiments were used to obtain the doubling-time regression curve with the initial number constraint.

ATP measurement Cells were grown in opaque 96-well white plates and then processed according to the manufacturer's instructions of the CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay kit (Promega). The standard curve of ATP was determined in parallel for absolute quantitation.

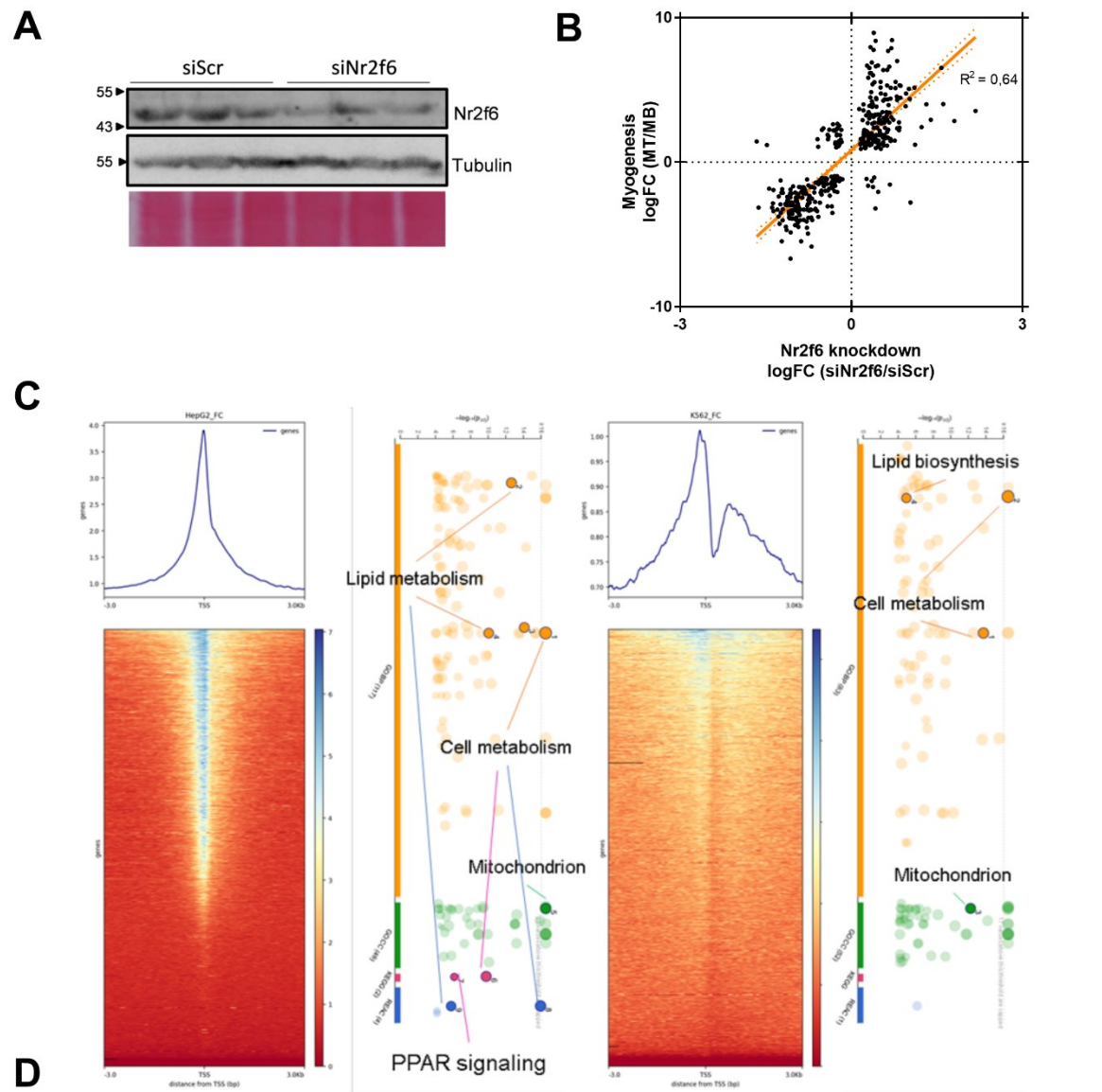
Bioinformatic analysis of public datasets Nr2f6 ChIP-seq bigwig files from the ENCODE project (GSM2797593 and GSM2534343) available on GEO were used. Using the Galaxy platform, the anchoring position matrix was generated using the compute matrix command from the deeptools package, relative to human genome annotations extracted from the UCSC Genome Browser in bed format. The heatmap was obtained using the plotheatmap tool, also from the deeptools package. Pathway enrichment was analyzed using the g.profiler program (<https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost>),

with a significance threshold of 0.01 using the g:SCS parameter, without considering electronic term annotations. The correlation in Figure S1B was produced with fold-changes of differentially expressed genes from RNA-seq (FDR <0.05) and fold-change values (expression in myotube/expression in myoblast) from the C2C12 cell differentiation array (GSE4694) considering a p-value cut-off of 0.01, according to GEO2R. UCP3 genome locus in Figure 3E was extracted from the UCSC genome browser with the ChIP-seq tracks of Myogenin (wgEncodeEM002136, wgEncodeEM002132), MyoD (wgEncodeEM002127, wgEncodeEM002129), H3K4me (wgEncodeEM001450), H3K27Ac (wgEncodeEM001450) and DNA hypersensitivity track (wgEncodeEM003399) over NCBI37/mm9 mouse genome assembly.

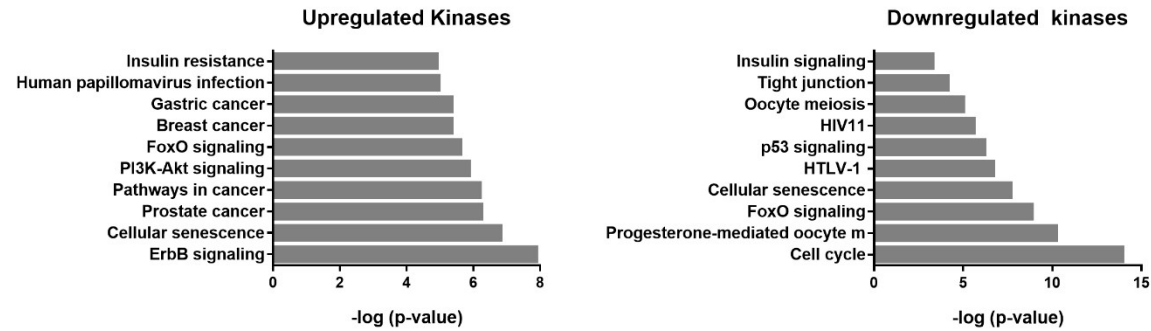
Statistical analysis and quantification

GraphPad Prism v7.0 was used for plotting the data and for statistical analysis. Cell culture experiments were performed independently several times with 3-4 technical replicates. Ratio paired comparison using Student's t-test was used for the analysis of human cells and electroporation experiments, otherwise, an unpaired comparison was chosen, and in both cases, a 0.05 p-value cutoff was used. Details for microarray and RNA-seq statistics are described in their respective methods section and further statistical details are presented in figure labels.

SUPPLEMENTARY INFORMATION



KEGG Pathways



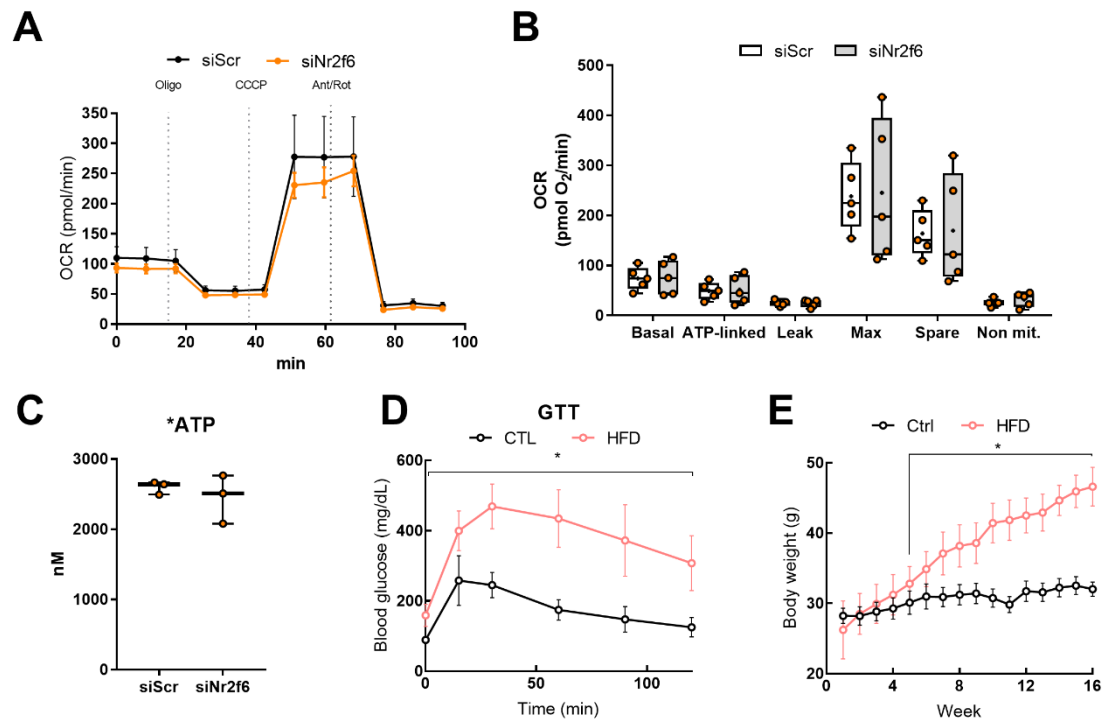
Supplementary Figure 1. Nr2f6 regulates myogenesis and binds to the promoters of genes involved in metabolism in different cell types.

(A) Representative western blot of Nr2f6 and tubulin in control siScr and siNr2f6 myocytes for protein-level validation of the knockdown.

(B) Correlation of differentially expressed genes in the transcriptome of siNr2f6 myocytes and public C2C12 differentiation microarray.

(C) Nr2f6 DNA binding profile in the ENCODE ChIP-seq data of HepG2 (right) and K562 (left) cells. Gene ontology analysis of the genes with binding within ± 3 kbp of the transcription start site.

(D) Enrichment of KEGG pathway terms in the upregulated (left) and downregulated (right) kinases in the siNr2f6 transcriptome.



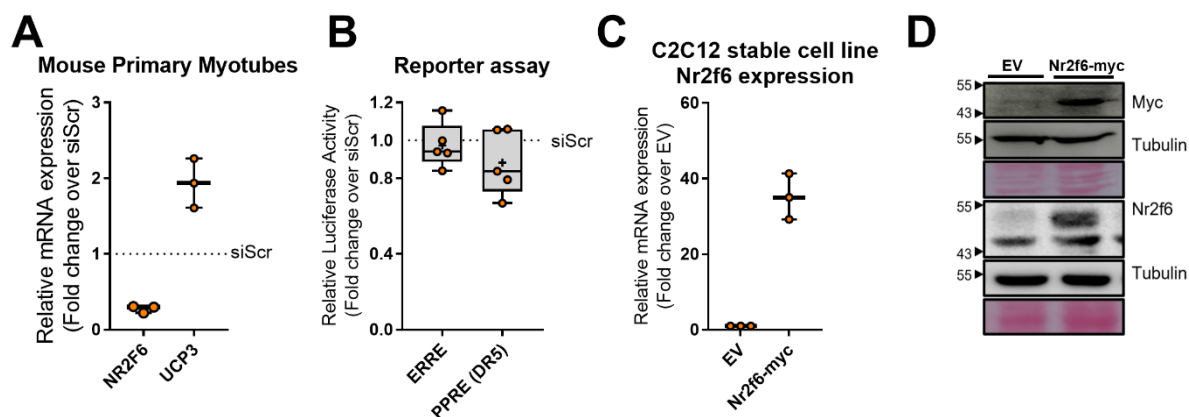
Supplementary Figure 2. Nr2f6 depletion enhances metabolism in skeletal muscle.

(A, B) Oxygen consumption assay in C2C12 myocytes transfected with siScr (control) and siNr2f6. On the right, are the calculated metabolic parameters.

(C) ATP content in siScr and siNr2f6 myocytes.

(D, E) Body weight and glucose tolerance test of mice undergoing 16 weeks of a high-fat diet. Data displayed as mean $\pm$ SD.

Boxplot with whiskers spanning minimum to maximal and box edges 25th-75th percentile, the line at the median and + at the mean. * Indicates $p < 0.05$ using unpaired two-tailed Student's t-test.



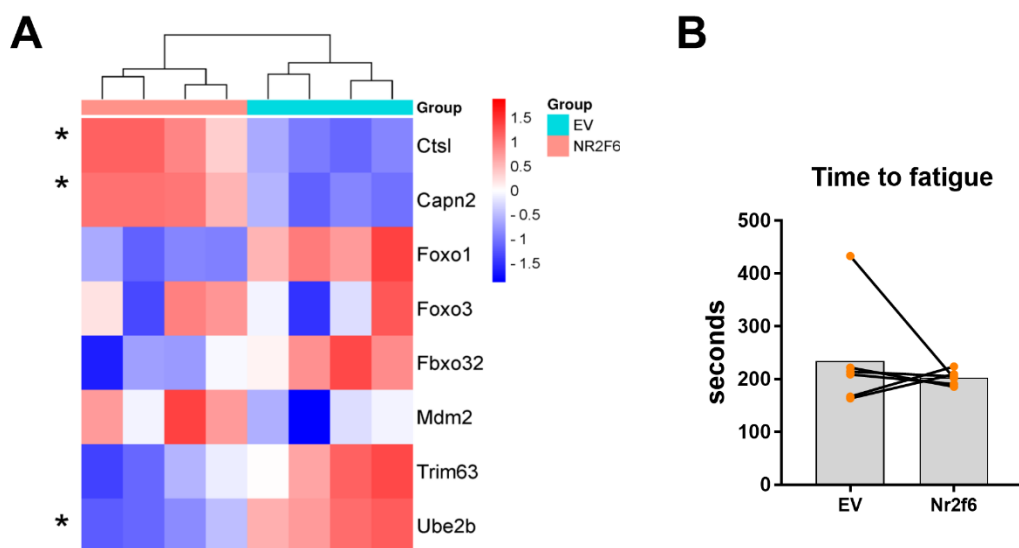
Supplementary Figure 3. Nr2f6 regulates UCP3 and PGC-1 α expression.

(A) Gene expression measured by RT-qPCR in primary mouse skeletal muscle cells transfected with siScr (control) and siNr2f6. N=3.

(B) Luciferase reporter assay of the responsive elements of the Estrogen Related Receptor (ERRE) and PPAR (PPRE) in MEF cells transfected with siScr or siNr2f6. N=5.

(C, D) Gene expression (N=3) and representative western blot for validation of Nr2f6-myc stable myotubes.

Boxplot with whiskers spanning minimum to maximal and box edges 25th-75th percentile, the line at the median and + at the mean. * Indicates $p < 0.05$ using unpaired two-tailed Student's t-test.



Supplementary Figure 4. Nr2f6 overexpression impairs muscle function.

(A) Atrogenes regulated by Nr2f6 overexpression in the *tibialis anterior* muscle. * Denotes significant modulation in the microarray.

(B) Time to fatigue in *ex vivo* contraction was set as the necessary time to reach 50% of the maximal force with constant stimulation. N=6.

KEY RESOURCE TABLE

Reagent or resource	Source	Identifier
Antibodies		
Rabbit anti ACC	Cell Signaling	Cat#3676; RRID:AB_2219397
Rabbit anti Akt	Cell Signaling	Cat#9272; RRID:AB_329827
Mouse anti Anti-PGC-1 α (4C1.3)	Millipore	Cat#ST1202; RRID:AB_2237237
Rabbit anti GLUT4	Millipore	Cat#07-1404; RRID:AB_1587080
Rabbit anti Glycogen synthase	Cell Signaling	Cat#3893; RRID:AB_2279563
Rabbit anti GSK3a/b	Cell Signaling	Cat#5676; RRID:AB_10547140
Rabbit anti MEF2C	Cell Signaling	Cat#5030; RRID:AB_10548759
Mouse anti MHC I (Myh7)	Santa Cruz	Cat#sc-53089; RRID:AB_2147281
Mouse anti MHC II (Myh1/2)	Santa Cruz	Cat#53088; RRID:AB_784722
Mouse anti Myf5	Abcam	Cat#ab125301;
Mouse anti MYH2	Santa Cruz	Cat#53095; RRID:AB_784698 Cat#sc-377460;
Mouse anti Myod	Santa Cruz	RRID:AB_2813894
Mouse anti Myogenin	Santa Cruz	Cat#12732; RRID:AB_627980
Rabbit anti Nr2f6	Sigma	Cat#AV32256; RRID:AB_1854623
Rabbit anti p-ACC (Ser79)	Cell Signaling	Cat#3661; RRID:AB_330337
Rabbit anti p-Akt Ser473	Cell Signaling	Cat#9271; RRID:AB_329825
Mouse anti Pax7	DSHB	Cat#; RRID:AB_2299243
Mouse anti PCNA	Santa Cruz	Cat#sc-56; RRID:AB_628110
Mouse anti Flag M2	Sigma	Cat#F3165; RRID:AB_259529
Rabbit anti PDK4	Abcam	Cat#ab63157; RRID:AB_2161489
Rabbit anti p-ERK1/2 (Thr202/Tyr204)	Cell Signaling	Cat#4370; RRID:AB_2315112
Rabbit anti p-Glycogen synthase (Ser641)	Cell Signaling	Cat#3891; RRID:AB_2116390
Rabbit anti p-GSK-3 α/β (Ser21/9)	Cell Signaling	Cat#9331; RRID:AB_329830
Rabbit anti p-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (3D7)	Cell Signaling	Cat#9215; RRID:AB_331762
Mouse anti Total OXPHOS Rodent	Abcam	Cat#ab110413; RRID:AB_2629281
Goat Anti-Rabbit IgG (H + L)-HRP Conjugate	Biorad	Cat#1721011; RRID:AB_2617113
anti HRP-Conjugated Anti-rabbit	Biorad	Cat#1706515; RRID:AB_2617113
Mouse anti Myosin Heavy Chain Type IIA (IgG1)	DSHB	Cat#SC-71; RRID:AB_2147165
Mouse anti Myosin Heavy Chain Type IIB (IgM)	DSHB	Cat#BF-F3; RRID:AB_2266724
Mouse anti Myosin heavy chain (slow, alpha- and beta-) (IgG2b)	DSHB	Cat#BA-F8; RRID:AB_10572253
Goat anti anti mmu IgG2b AlexaFluor 350	Thermo Fisher Scientific	Cat#A-21140; RRID:AB_2535777
Goat anti anti mmu IgG1 AlexaFluor 488	Thermo Fisher Scientific	Cat#A32723; RRID:AB_2633275

Goat anti anti mmu IgM AlexaFluor 555	Thermo Fisher Scientific	Cat#A32727; RRID:AB_2633276
---------------------------------------	--------------------------	-----------------------------

Recombinant DNA

shNr2f6 (NM_010150)	Sigma	SHCLNG TRCN0000026147
shGFP	Addgene_30323	RRID:Addgene_30323
pBAPE-Puro (EV)	Addgene_1764	RRID:Addgene_1764
pBABE-mNr2f6-myc	This paper	
pCMV6-mNr2f6-myc-FLAG	Origene	Cat#MR206083
pCVM6-Empty (EV)	Origene	Cat#PS100001
pEF-Neo-hNr2f6-HA	Prof. Gottfried Baier	Hermann-Kleiter et al., 2008
PPRE X3-TK-luc	Addgene_1015	RRID:Addgene_1015
3xERRE-luciferase	Addgene_37851	RRID:Addgene_37851
pRL-SV40	Promega	Cat#E2231
pCMV-dR8.2 dvpr	Addgene_8455	RRID:Addgene_8455
pCMV-VSVG	Addgene_8454	RRID:Addgene_8454
UCP3 EP1	Addgene_71743	RRID:Addgene_71743
PGC1a 2kb	Addgene_8887	RRID:Addgene_8887
pEF-Neo Empty vector	Prof. Gottfried Baier	Hermann-Kleiter et al., 2008

Critical commercial assays

Dual-Glo® Luciferase Assay	Promega	Cat#E2920
CellTiter-Glo® 2.0 Cell Viability Assay	Promega	Cat#G9241
MitoSOX	Invitrogen	Cat#M36008
DHE	Invitrogen	Cat#D11347
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor	Applied Biosystems	Cat#4374967
FAST Syber Green	Applied Biosystems	Cat#4385618
TaqMan™ Fast Advanced Master Mix	Applied Biosystems	Cat#4444963
TruSeq Illumina Total RNA Stranded	Illumina	Cat#20020597
Ribo-zero rRNA depletion	Illumina	Cat#4444963

Softwares and algorithms

Galaxy		RRID:SCR_006281; https://usegalaxy.org.au/
Bioinformatics.cn		https://www.bioinformatics.com.cn/
ImageJ		RRID:SCR_003070
Cytoscape	Ideker, T. (2003).	RRID:SCR_003032
ZEN Digital Imaging for Light Microscopy	Zeiss	RRID:SCR_013672
Prism 7	GraphPad	RRID:SCR_002798
Python Programming Language	Python Foundation	RRID:SCR_008394
Transcriptome Analysis Console (TAC) (v4.0.3)	ThermoFisher Scientific	

STRING
 EnrichmentMap
 g.profiler
 RRID:SCR_005223;
<http://string.embl.de/>
 RRID:SCR_016052
 Uku Raudvere, et al.
 (2019)

Experimental models: cell lines

C2C12	BCRJ	Cat#0058; RRID:CVCL_0188
HEK293T	ATCC	Cat#CRL-3216
MEF	BCRJ	Cat#0405; RRID:CVCL_4240
Human Primary Skeletal Muscle Cells		N/A
Mouse Primary Skeletal Muscle Cells	This paper	N/A
Experimental models: Organisms/strains		
C57Bl6/JUnib	CEMIB	RRID:MGI:7264953
C57Bl6/J	Jackson Labs	RRID:IMSR_JAX:000664

Oligonucleotides

siRNA targeting mouse Nr2f6	Sigma	SASI_Mm01_00073566
siRNA targeting human Nr2f6, Silencer		
Select human NR2F6	Invitrogen	Cat#4390825, s4776
Control non-target (siScr) siRNA for mouse cells:		
AllStars Neg. Control siRNA	Qiagen	Cat#1027281
Control non-target (siScr) siRNA for human cells: Silencer™ Select Negative		
Control No. 2 siRNA	Invitrogen	Cat#4390847

For RT-qPCR primers and probes please see Supplementary Table 1

Supplemental table 1 - List of primers and TaqMan probes used for gene expression

Target gene	Probe # or Primer Sequence (5'-3')	Species
Glut4	Hs00168966_m1	Human
Ucp3	Hs01106052_m1	Human
Pax7	Hs00242962_m1	Human
Myh1	Hs00428600_m1	Human
Myh2	Hs00430042_m1	Human
Myh7	H01110632_m1	Human
Myod1	Hs00159528_m1	Human
Myogenin	Hs01072232_m1	Human
HPRT1	4326321E	Human
PPIA	Hs04194521_s1	Human
Beta-Actin	4346315E-046005	Human
18S	4319413E-1002048	Human
18S	4319413E-1002048	Mouse
ACTB	4352341E-1112017	Mouse
GAPDH	4352339E-1002027	Mouse
HPRT1	Mm00446968_m1	Mouse
PPIA	Mm02342429_g1	Mouse
Fabp4	Mm00445878_m1	Mouse
Myog	Mm00446195_g1	Mouse
Pax7	Mm01354484_m1	Mouse
Ki67	Mm01278617_m1	Mouse
Pdk4	Mm01166879_m1	Mouse
Glut4	Mm01245502_m1	Mouse
PPARGC1a	Mm01208835_m1	Mouse
NDUFS2	Mm00467603_g1	Mouse
CD36	Mm01135198_m1	Mouse
Myh1	Mm01332489_m1	Mouse
Myh2	Mm01332564_m1	Mouse
Myh7B	Mm01249941_m1	Mouse
Ucp3	Mm00494077_m1	Mouse
Nr2f6	F:GAGCGGCAAGCATTACGGT	Human
Nr2f6	R:GGCAGGTGTAGCTGAGGTT	Human
Nr2f6	F:CTCTTCACGCCTGATGCCT	Mouse
Nr2f6	R:GTACTGGGCACGCACATACT	Mouse
Myogenin	F:GAGACATCCCCCTATTTCTACCA	Mouse
Myogenin	R:GCTCAGTCCGCTCATAGCC	Mouse
Myod1	F:CCACTCCGGGACATAGACTTG	Mouse
Myod1	R:AAAAGCGCAGGTCTGGTGAG	Mouse
VEGFa	F:CTGCTGTAACGATGAAGCCCTG	Mouse
VEGFa	R:GCTGTAGGAAGCTCATCTCTCC	Mouse
PDK4	F:GGATTACTGACCGCCTCTTTAG	Mouse
PDK4	R:GTAACCAAAACCAGCCAAAGG	Mouse

Scd1	F:TGCGATACACTCTGGTGCTC	Mouse
Scd1	R:TAGTCGAAGGGGAAGGTGTG	Mouse
Uqcr1	F:AGACCCAGGTCAGCATCTTG	Mouse
Uqcr1	R:GCCGATTCTTTGTTCCCTTGA	Mouse
Ucp3	F:GACCCACGGCCTTCTACAAA	Mouse
Ucp3	R:TCAAAACGGAGATTCCCGCA	Mouse
Cpt1b	F:CCCATGTGCTCCTACCAGAT	Mouse
Cpt1b	R:CGAGGATTCTCTGGAAGTGC	Mouse
Rpl39	F:CAAAATCGCCCTATTCCTCA	Mouse
Rpl39	R:AGACCCAGCTTCGTTCTCCT	Mouse
F4/80	F:TGCATCTAGCAATGGACAGC	Mouse
F4/80	R:GCCTTCTGGATCCATTTGAA	Mouse
PPARGC1A	F:ACCAGTACAACAATGAGCCTGCGA	Mouse
PPARGC1A	R:TCCAGTGTCTCTGTGAGAACCGC	Mouse
CD68	F:TTCTGCTGTGGAAATGCAAG	Mouse
CD68	R:AGAGGGGCTGGTAGGTTGAT	Mouse
CD44	F:CACCATTGCCTCAACTGTGC	Mouse
CD44	R:TTGTGGGCTCCTGAGTCTGA	Mouse
CD34	F:ATCCCCATCAGTTCCTACCAAT	Mouse
CD34	R:TGGTGTGGTCTTACTGCTGTC	Mouse
TGFb	F:CTCCCGTGGCTTCTAGTGC	Mouse
TGFb	R; GCCTTAGTTTGGACAGGATCTG	Mouse

REFERENCES

1. Ma, Z., Zhong, Z., Zheng, Z., Shi, X. M. & Zhang, W. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 β attenuates glucocorticoid-induced suppression of myogenic differentiation in vitro. *PLoS One* (2014) doi:10.1371/journal.pone.0105528.
2. Duan, D., Goemans, N., Takeda, S., Mercuri, E. & Aartsma-Rus, A. Duchenne muscular dystrophy. *Nature Reviews Disease Primers* at <https://doi.org/10.1038/s41572-021-00248-3> (2021).
3. Coen, P. M., Musci, R. V., Hinkley, J. M. & Miller, B. F. Mitochondria as a target for mitigating sarcopenia. *Frontiers in Physiology* at <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01883> (2019).
4. Brown, J. L. *et al.* Mitochondrial degeneration precedes the development of muscle atrophy in progression of cancer cachexia in tumour-bearing mice. *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle* (2017) doi:10.1002/jcsm.12232.
5. De Bosscher, K., Desmet, S. J., Clarisse, D., Estébanez-Perpiña, E. & Brunsveld, L. Nuclear receptor crosstalk — defining the mechanisms for therapeutic innovation. *Nature Reviews Endocrinology* at <https://doi.org/10.1038/s41574-020-0349-5> (2020).
6. Kumar, Ashok, and V. A. N. Nuclear receptors as potential therapeutic targets in peripheral arterial disease and related myopathy. *FEBS J.* (2022) doi:10.1111/febs.16593.
7. Robinson-Rechavi, M., Garcia, H. E. & Laudet, V. The nuclear receptor superfamily. *Journal of Cell Science* at <https://doi.org/10.1242/jcs.00247> (2003).
8. Nettles, K. W. & Greene, G. L. Ligand control of coregulator recruitment to nuclear receptors. *Annual Review of Physiology* at <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.66.032802.154710> (2005).
9. Klepsch, V., Siegmund, K. & Baier, G. Emerging next-generation target for cancer immunotherapy research: The orphan nuclear receptor NR2F6. *Cancers* at <https://doi.org/10.3390/cancers13112600> (2021).
10. Zhou, B. *et al.* The Nuclear Orphan Receptor NR2F6 Promotes Hepatic Steatosis through Upregulation of Fatty Acid Transporter CD36. *Adv. Sci.* (2020) doi:10.1002/advs.202002273.
11. Li, H. *et al.* Nuclear orphan receptor NR2F6 confers cisplatin resistance in epithelial ovarian cancer cells by activating the Notch3 signaling pathway. *Int. J. Cancer* (2019) doi:10.1002/ijc.32293.
12. Hermann-Kleiter, N. *et al.* Nuclear orphan receptor NR2F6 directly antagonizes NFAT and ROR γ t binding to the Il17a promoter. *J. Autoimmun.* (2012) doi:10.1016/j.jaut.2012.07.007.
13. Klepsch, V. *et al.* Nuclear receptor NR2F6 inhibition potentiates responses to PD-L1/PD-1 cancer immune checkpoint blockade. *Nat. Commun.* (2018) doi:10.1038/s41467-018-04004-2.
14. Zhao, Y. *et al.* ‘Stripe’ transcription factors provide accessibility to co-binding partners in mammalian genomes. *Mol. Cell* **82**, 3398-3411.e11 (2022) 10.1016/j.molcel.2022.06.029.
15. Warnecke, M., Oster, H., Revelli, J., Alvarez-bolado, G. & Eichele, G. Abnormal development of the locus coeruleus in. *Genes Dev.* (2005) doi:10.1101/gad.317905.mice.
16. Hermann-Kleiter, N. *et al.* The Nuclear Orphan Receptor NR2F6 Is a Central Checkpoint for Cancer Immune Surveillance. *Cell Rep.* (2015) doi:10.1016/j.celrep.2015.08.035.
17. Kaliman, P., Viñals, F., Testar, X., Palacín, M. & Zorzano, A. Phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors block differentiation of skeletal muscle cells. *J. Biol. Chem.* (1996) doi:10.1074/jbc.271.32.19146.
18. Rochard, P. *et al.* Mitochondrial activity is involved in the regulation of myoblast differentiation through myogenin expression and activity of myogenic factors. *J. Biol. Chem.* (2000) doi:10.1074/jbc.275.4.2733.

19. Halevy, O. *et al.* Correlation of terminal cell cycle arrest of skeletal muscle with induction of p21 by MyoD. *Science* (80-.). (1995) doi:10.1126/science.7863327.
20. De la Serna, I. L., Roy, K., Carlson, K. A. & Imbalzano, A. N. MyoD Can Induce Cell Cycle Arrest but Not Muscle Differentiation in the Presence of Dominant Negative SWI/SNF Chromatin Remodeling Enzymes. *J. Biol. Chem.* (2001) doi:10.1074/jbc.M107281200.
21. Kobayashi, Y. *et al.* Cyclin-Dependent Kinase 1 Is Essential for Muscle Regeneration and Overload Muscle Fiber Hypertrophy. *Front. Cell Dev. Biol.* (2020) doi:10.3389/fcell.2020.564581.
22. Sato, T., Yamamoto, T. & Sehara-Fujisawa, A. MiR-195/497 induce postnatal quiescence of skeletal muscle stem cells. *Nat. Commun.* (2014) doi:10.1038/ncomms5597.
23. Zhang, J. M., Wei, Q., Zhao, X. & Paterson, B. M. Coupling of the cell cycle and myogenesis through the cyclin D1-dependent interaction of MyoD with cdk4. *EMBO J.* (1999) doi:10.1093/emboj/18.4.926.
24. Abdelmoez, A. M. *et al.* Comparative profiling of skeletal muscle models reveals heterogeneity of transcriptome and metabolism. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* (2020) doi:10.1152/ajpcell.00540.2019.
25. Casimiro, I., Stull, N. D., Tersey, S. A. & Mirmira, R. G. Phenotypic sexual dimorphism in response to dietary fat manipulation in C57BL/6J mice. *J. Diabetes Complications* (2021) doi:10.1016/j.jdiacomp.2020.107795.
26. Lima, T. I. *et al.* Role of NCoR1 in mitochondrial function and energy metabolism. *Cell Biology International* at <https://doi.org/10.1002/cbin.10973> (2018).
27. Lima, T. I. *et al.* Opposing action of NCoR1 and PGC-1 α in mitochondrial redox homeostasis. *Free Radic. Biol. Med.* (2019) doi:10.1016/j.freeradbiomed.2019.08.006.
28. Narkar, V. A. *et al.* AMPK and PPAR δ Agonists Are Exercise Mimetics. *Cell* (2008) doi:10.1016/j.cell.2008.06.051.
29. Badin, P. M. *et al.* Exercise-like effects by Estrogen-related receptor-gamma in muscle do not prevent insulin resistance in db/db mice. *Sci. Rep.* (2016) doi:10.1038/srep26442.
30. Taillandier, D. & Polge, C. Skeletal muscle atrogenes: From rodent models to human pathologies. *Biochimie* at <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.07.014> (2019).
31. Allen, D. G., Lamb, G. D. & Westerblad, H. Skeletal muscle fatigue: Cellular mechanisms. *Physiological Reviews* at <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2007> (2008).
32. Dietrich, D. R. Toxicological and pathological applications of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), a novel endogenous marker for cell proliferation. *Crit. Rev. Toxicol.* (1993) doi:10.3109/10408449309104075.
33. Pansters, N. A. M. *et al.* Muscle-specific GSK-3 β ablation accelerates regeneration of disuse-atrophied skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* (2015) doi:10.1016/j.bbadis.2014.12.006.
34. Michailovici, I. *et al.* Nuclear to cytoplasmic shuttling of ERK promotes differentiation of muscle stem/progenitor cells. *Dev.* (2014) doi:10.1242/dev.107078.
35. Jones, N. C., Fedorov, Y. V., Rosenthal, R. S. & Olwin, B. B. ERK1/2 is required for myoblast proliferation but is dispensable for muscle gene expression and cell fusion. *J. Cell. Physiol.* (2001) doi:10.1002/1097-4652(200101)186:1<104::AID-JCP1015>3.0.CO;2-0.
36. Hermann-Kleiter, N. *et al.* The Nuclear Orphan Receptor NR2F6 Suppresses Lymphocyte Activation and T Helper 17-Dependent Autoimmunity. *Immunity* (2008) doi:10.1016/j.immuni.2008.06.008.
37. Olson, W. J. *et al.* Orphan Nuclear Receptor NR2F6 Suppresses T Follicular Helper Cell Accumulation through Regulation of IL-21. *Cell Rep.* (2019) doi:10.1016/j.celrep.2019.08.024.

38. Yang, S. L. *et al.* The expression and biological effect of NR2F6 in non-small cell lung cancer. *Front. Oncol.* **12**, 940234 (2022).
39. Kupr, B., Schnyder, S. & Handschin, C. Role of nuclear receptors in exercise-induced muscle adaptations. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* at <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a029835> (2017).
40. Verbrugge, S. A. J. *et al.* Genes whose gain or loss-of-function increases skeletal muscle mass in mice: A systematic literature review. *Frontiers in Physiology* at <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00553> (2018).
41. Mayeuf-Louchart, A. *et al.* Rev-erb- α regulates atrophy-related genes to control skeletal muscle mass. *Sci. Rep.* (2017) doi:10.1038/s41598-017-14596-2.
42. Yamamoto, H. *et al.* NCoR1 is a conserved physiological modulator of muscle mass and oxidative function. *Cell* **147**, 827–839 (2011).
43. Shimizu, N. *et al.* A muscle-liver-fat signalling axis is essential for central control of adaptive adipose remodelling. *Nat. Commun.* (2015) doi:10.1038/ncomms7693.
44. Avram, D. *et al.* Heterodimeric interactions between chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor family members ARP1 and Ear2. *J. Biol. Chem.* (1999) doi:10.1074/jbc.274.20.14331.
45. Lee, H.-J. *et al.* Dysregulation of nuclear receptor COUP-TFII impairs skeletal muscle development OPEN. doi:10.1038/s41598-017-03475-5.
46. Xie, X., Tsai, S. Y. & Tsai, M. J. COUP-TFII regulates satellite cell function and muscular dystrophy. *J. Clin. Invest.* (2016) doi:10.1172/JCI87414.
47. Pearen, M. A. *et al.* The nuclear receptor, Nor-1, markedly increases type II oxidative muscle fibers and resistance to fatigue. *Mol. Endocrinol.* (2012) doi:10.1210/me.2011-1274.
48. Chen, W., Zhang, X., Birsoy, K. & Roeder, R. G. A muscle-specific knockout implicates nuclear receptor coactivator MED1 in the regulation of glucose and energy metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2010) doi:10.1073/pnas.1005626107.
49. Seth, A. *et al.* The Transcriptional Corepressor RIP140 Regulates Oxidative Metabolism in Skeletal Muscle. *Cell Metab.* (2007) doi:10.1016/j.cmet.2007.08.004.
50. Son, C. *et al.* Reduction of diet-induced obesity in transgenic mice overexpressing uncoupling protein 3 in skeletal muscle. *Diabetologia* (2004) doi:10.1007/s00125-003-1272-8.
51. Darcy MacLellan, J. *et al.* Physiological increases in uncoupling protein 3 augment fatty acid oxidation and decrease reactive oxygen species production without uncoupling respiration in muscle cells. *Diabetes* (2005) doi:10.2337/diabetes.54.8.2343.
52. Clapham, J. C. *et al.* Mice overexpressing human uncoupling protein-3 in skeletal muscle are hyperphagic and lean. *Nature* (2000) doi:10.1038/35019082.
53. Son, C. *et al.* Up-regulation of uncoupling protein 3 gene expression by fatty acids and agonists for PPARs in L6 myotubes. *Endocrinology* (2001) doi:10.1210/endo.142.10.8446.
54. Weigle, D. S. *et al.* Elevated free fatty acids induce uncoupling protein 3 expression in muscle: A potential explanation for the effect of fasting. *Diabetes* (1998) doi:10.2337/diab.47.2.298.
55. Cruz-Jentoft, A. J. & Sayer, A. A. Sarcopenia. *The Lancet* (2019) doi:10.1016/S0140-6736(19)31138-9 (2019).
56. Picca, A. *et al.* Update on mitochondria and muscle aging: All wrong roads lead to sarcopenia. *Biological Chemistry* at <https://doi.org/10.1515/hsz-2017-0331> (2018).
57. Bakay, M. *et al.* Nuclear envelope dystrophies show a transcriptional fingerprint suggesting disruption of Rb-MyoD pathways in muscle regeneration. *Brain* (2006) doi:10.1093/brain/awl023.

58. Salinas, S., Proukakis, C., Crosby, A. & Warner, T. T. Hereditary spastic paraplegia: clinical features and pathogenetic mechanisms. *The Lancet Neurology* at [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(08\)70258-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(08)70258-8) (2008).
59. Fink, J. K. Hereditary spastic paraplegia: Clinico-pathologic features and emerging molecular mechanisms. *Acta Neuropathologica* at <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1115-8> (2013).
60. Klepsch, V. *et al.* Nuclear orphan receptor NR2F6 as a safeguard against experimental murine colitis. *Gut* (2018) doi:10.1136/gutjnl-2016-313466.
61. Pelletier, L. *et al.* In vivo RyR1 reduction in muscle triggers a core-like myopathy. *Acta Neuropathol. Commun.* (2020) doi:10.1186/s40478-020-01068-4.
62. Sakakibara, I. *et al.* Myofiber androgen receptor increases muscle strength mediated by a skeletal muscle splicing variant of Mylk4. *iScience* (2021) doi:10.1016/j.isci.2021.102303.
63. Lee, N. K. L. & Maclean, H. E. Polyamines, androgens, and skeletal muscle hypertrophy. *Journal of Cellular Physiology* at <https://doi.org/10.1002/jcp.22569> (2011).
64. Cervelli, M. *et al.* Skeletal Muscle Pathophysiology: The Emerging Role of Spermine Oxidase and Spermidine. *Med. Sci.* (2018) doi:10.3390/medsci6010014.
65. Wang, L. *et al.* Circular RNA circRHOT1 promotes hepatocellular carcinoma progression by initiation of NR2F6 expression. *Mol. Cancer* (2019) doi:10.1186/s12943-019-1046-7.
66. Liu, J., Li, T. & Liu, X. L. DDA1 is induced by NR2F6 in ovarian cancer and predicts poor survival outcome. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* (2017).
67. Weatherford, E. T., Liu, X. & Sigmund, C. D. Regulation of renin expression by the orphan nuclear receptors Nr2f2 and Nr2f6. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* (2012) doi:10.1152/ajprenal.00362.2011.
68. Chu, K. & Zingg, H. H. The nuclear orphan receptors COUP-TFII and Ear-2 act as silencers of the human oxytocin gene promoter. *J. Mol. Endocrinol.* (1997) doi:10.1677/jme.0.0190163.
69. Jin, C. *et al.* MiR-142-3p suppresses the proliferation, migration and invasion through inhibition of NR2F6 in lung adenocarcinoma. *Hum. Cell* (2019) doi:10.1007/s13577-019-00258-0.
70. Raichur, S., Lau, P., Staels, B. & Muscat, G. E. O. Retinoid-related orphan receptor γ regulates several genes that control metabolism in skeletal muscle cells: Links to modulation of reactive oxygen species production. *J. Mol. Endocrinol.* (2007) doi:10.1677/jme.1.00010.
71. Iqbal, J. *et al.* Deletion of retinoic acid-related orphan receptor gamma reduces body weight and hepatic lipids in mice by modulating the expression of lipid metabolism genes. *Vessel Plus* (2019) doi:10.20517/2574-1209.2019.28.
72. Fang, Y., Yu, H., Liang, X., Xu, J. & Cai, X. Chk1-induced CCNB1 overexpression promotes cell proliferation and tumor growth in human colorectal cancer. *Cancer Biol. Ther.* (2014) doi:10.4161/cbt.29691.
73. Huang, V. *et al.* Upregulation of Cyclin B1 by miRNA and its implications in cancer. *Nucleic Acids Res.* (2012) doi:10.1093/nar/gkr934.
74. Bao, B., Yu, X. & Zheng, W. MiR-139-5p Targeting CCNB1 Modulates Proliferation, Migration, Invasion and Cell Cycle in Lung Adenocarcinoma. *Mol. Biotechnol.* (2022) doi:10.1007/s12033-022-00465-5.
75. Rao, V. K. *et al.* G9a promotes proliferation and inhibits cell cycle exit during myogenic differentiation. *Nucleic Acids Res.* (2016) doi:10.1093/nar/gkw483.
76. Knight, J. D. R. & Kothary, R. The myogenic kinome: Protein kinases critical to mammalian skeletal myogenesis. *Skeletal Muscle* at <https://doi.org/10.1186/2044-5040-1-29> (2011).

77. Tajsharghi, H. & Oldfors, A. Myosinopathies: Pathology and mechanisms. *Acta Neuropathologica* at <https://doi.org/10.1007/s00401-012-1024-2> (2013).
78. Schiaffino, S. Muscle fiber type diversity revealed by anti-myosin heavy chain antibodies. *FEBS Journal* at <https://doi.org/10.1111/febs.14502> (2018).
79. Al-Khalili, L., Krämer, D., Wretenberg, P. & Krook, A. Human skeletal muscle cell differentiation is associated with changes in myogenic markers and enhanced insulin-mediated MAPK and PKB phosphorylation. *Acta Physiol. Scand.* (2004) doi:10.1111/j.1365-201X.2004.01259.x.
80. Araujo, H. N. *et al.* Regulation of Lin28a-miRNA let-7b-5p pathway in skeletal muscle cells by peroxisome proliferator-activated receptor delta. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* (2020) doi:10.1152/ajpcell.00233.2020.
81. Andersen, C. L., Jensen, J. L. & Ørntoft, T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* (2004) doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-0496.
82. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* (2001) doi:10.1006/meth.2001.1262.
83. Bolger, A. M., Lohse, M. & Usadel, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* (2014) doi:10.1093/bioinformatics/btu170.
84. Harmancey, R., Haight, D. L., Watts, K. A. & Taegtmeyer, H. Chronic hyperinsulinemia causes selective insulin resistance and down-regulates uncoupling protein 3 (ucp3) through the activation of sterol regulatory element-binding protein (srebp)-1 transcription factor in the mouse heart. *J. Biol. Chem.* (2015) doi:10.1074/jbc.M115.673988.
85. Handschin, C., Rhee, J., Lin, J., Tarr, P. T. & Spiegelman, B. M. An autoregulatory loop controls peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α expression in muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2003) doi:10.1073/pnas.1232352100.
86. Lima, T. I. & Silveira, L. R. A microplate assay for measuring cell death in C2C12 cells. *Biochem. Cell Biol.* (2018) doi:10.1139/bcb-2018-0005.

APÊNDICES

Declaração sobre direitos autorais

As cópias dos documentos de minha autoria ou de minha coautoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam na minha Tese de Doutorado intitulada CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL E MOLECULAR DO PAPEL DO RECEPTOR NUCLEAR NR2F6 NO MÚSCULO ESQUELÉTICO não infringem os dispositivos da Lei nº 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas – SP, 8 de maio de 2023



Dimitrius Santiago Passos Simões Fróes Guimarães
RG: 16.591.016
Autor

Leonardo dos Reis
Silveira

Assinado de forma digital por
Leonardo dos Reis Silveira
Dados: 2023.05.08 11:13:27 -03'00'

Leonardo dos Reis Silveira
RG: 5654810
Orientador

Declaração de Bioética e Biossegurança

Em observância ao §5º do Artigo 1º da Informação CCPGUNICAMP/001/15, referente a Bioética e Biossegurança, declaramos que os experimentos apresentados nesta tese intitulada “CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL E MOLECULAR DO PAPEL DO RECEPTOR NUCLEAR NR2F6 NO MÚSCULO ESQUELÉTICO” foram devidamente protocolados e aprovados pela Comissão Interna de Biossegurança no projeto “Modulação da expressão de genes associados ao controle molecular do processo de biogênese mitocondrial” sob o número 10/2016. Os experimentos com animais realizados no Instituto de Biologia da Unicamp foram aprovado pelo CEUA/Unicamp sob o projeto “Busca e caracterização de novos reguladores da transcrição de genes associados à biogênese mitocondrial”, registrado com o nº 5626-1/2020, sob a responsabilidade de Prof. Dr. Leonardo dos Reis Silveira e Dimitrius Santiago P. S. F. Guimarães, de acordo com os preceitos da LEI No 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do DECRETO No 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP, em reunião de 15/10/2020.

Campinas – SP, 8 de maio de 2023



Dimitrius Santiago Passos Simões Fróes Guimarães

RG: 16.591.016

Autor

**Leonardo dos Reis
Silveira**

Assinado de forma digital por
Leonardo dos Reis Silveira
Dados: 2023.05.08 11:15:07 -03'00'

Leonardo dos Reis Silveira

RG: 5654810

Orientador