

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto De Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia

Amanda Carla Clemente de Oliveira

Participação do TNF e da IL-18 no remodelamento do tecido adiposo induzido pela baixa disponibilidade de nutrientes.

Belo Horizonte,
2024

Amanda Carla Clemente de Oliveira

Participação do TNF e da IL-18 no remodelamento do tecido adiposo induzido pela baixa disponibilidade de nutrientes.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Fisiologia.

Orientadora: Prof. Dra. Adaliene Versiani Matos Ferreira

Coorientador: Prof. Dr. André Gustavo de Oliveira

Belo Horizonte,

2024

043 Oliveira, Amanda Carla Clemente de.
Participação do TNF e da IL-18 no remodelamento do tecido adiposo induzido pela baixa disponibilidade de nutrientes [manuscrito] / Amanda Carla Clemente de Oliveira. – 2024.
90 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Adaliene Versiani Matos Ferreira. Coorientador: André Gustavo de Oliveira.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Farmacologia. 2. Jejum. 3. Tecido Adiposo. 4. Cirurgia Bariátrica. 5. Fator de Necrose Tumoral. 6. Interleucina-18. I. Ferreira, Adaliene Versiani Matos. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO N° 381 DE AMANDA CARLA CLEMENTE DE OLIVEIRA

"PARTICIPAÇÃO DO TNF E DA IL-18 NA REDUÇÃO DE ADIPOSIDADE"

AMANDA CARLA CLEMENTE DE OLIVEIRA

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **04 de abril de 2024**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

PROFA. DRA. ADALIENE VERSIANI MATOS FERREIRA
ESCOLA DE ENFERMAGEM/UFMG

PROF. DR. André Gustavo de Oliveira
ICB/UFMG

PROF. DR. NIELS OLSEN CÂMARA
ICB/USP

PROF. DR. LUIZ CARLOS NAVEGANTES
FMRP/USP

PROFA. DRA. MARISTELA DE OLIVEIRA POLETINI
ICB/UFMG

PROF. DR. CÂNDIDO CELSO COIMBRA
ICB/UFMG

Belo Horizonte, 04 de abril de 2024



Documento assinado eletronicamente por **Candido Celso Coimbra, Professor do Magistério Superior**, em 10/04/2024, às 15:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Adaliene Versiani Matos Ferreira, Professora do Magistério Superior**, em 10/04/2024, às 15:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Andre Gustavo de Oliveira, Professor do Magistério Superior**, em 11/04/2024, às 12:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Carlos Carvalho Navegantes, Usuário Externo**, em 11/04/2024, às 16:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Niels Olsen Saraiva Câmara, Usuário Externo**, em 12/04/2024, às 06:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Maristela de Oliveira Poletini, Professora do Magistério Superior**, em 22/04/2024, às 11:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3173816** e o código CRC **22C32D09**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora professora Adaliene “Dadá”, muito obrigada por todos esses anos de ensinamentos, discussões, paciência e muitas risadas. Muito obrigada por aceitar me formar, levarei seus ensinamentos por toda vida.

Agradeço as companheiras de caminhada do IME, Joyce, Gabi, Mariele, Laura, Francine, Ana Luísa, Bruna e Ana Maria. Muito obrigada pelo apoio, graças a vocês a vida na pós-graduação foi mais leve.

Agradeço às IC que ajudaram durante essa caminhada, Gabi, Maria Eduarda, Eduarda e Betanya.

Agradeço as amigas que a ciência me deu Adma, Ana Letícia e Larisse. Muito obrigada pelas conversas, por ouvir meus desabafos e pelas risadas.

Agradeço ao grupo de pesquisa Imunofarmacologia. Em especial ao professor Mauro por gentilmente abrir as portas do seu laboratório.

Agradeço também aos professores do Imunofarmacologia: Caio, Frederico, Flávio, Vivian, Vanessa e Daniele. Muito Obrigada pelos esclarecimentos das dúvidas e ajuda no dia a dia.

Agradeço também aos alunos desses professores, em especial Amanda, Celso e Fernando.

Agradeço ao meu coorientador professor André pela ajuda.

Agradeço a professora Leda Quercia Vieira por gentilmente fornecer os camundongos knockout.

Agradeço aos técnicos Domenico, Ilma, Rose, Hermes, Frank, Fatiha, Christine e Flavian.

Agradeço ao meu programa de pós graduação, em especial a coordenação e ao secretário Alexander

Agradeço à professora Karine Clement por gentilmente me receber durante o doutorado sanduíche no grupo Nutriomique.

Agradeço à Geneviève Marcelin por todos os ensinamentos e pela ajuda durante o meu doutorado sanduíche.

Agradeço aos colegas do Nutriomique Clementine, Dounia, Eli, Paul, Lise e Simon.

Agradeço às pessoas que tornaram a jornada do doutorado sanduíche incrível: Simone, Mateus, Flávia, Edmar, Rita, Sávio, Maia, Gabriel, Gabriel P, Fabricio, Livia e Tony.

Agradeço à CAPES COFECUB pelo financiamento do meu doutorado sanduíche.

Agradeço às agências de fomento FAPEMIG, CAPES pelo financiamento.

Agradeço ao CNPq pela minha bolsa de doutorado e pelo financiamento.

Agradeço aos membros da banca por aceitarem avaliar o meu trabalho.

Agradeço aos amigos da vida David, Paloma e Vitor. Muito obrigada por mesmo longe sempre estarem presentes me apoiando.

Agradeço a todos que de algum modo me acompanharam durante essa jornada.

Por fim, agradeço aos meus pais Nívia e Expedito, pois sem o apoio deles a minha carreira acadêmica não seria possível.

RESUMO

Introdução: Nas últimas décadas tem sido descrita a participação de mediadores inflamatórios no remodelamento do tecido adiposo, decorrente tanto da obesidade como do emagrecimento. Paradoxalmente, tanto à baixa quanto a alta disponibilidade de nutrientes induz uma resposta inflamatória no tecido adiposo branco (WAT) que favorece o aumento ou a redução da adiposidade. O fator de necrose tumoral (TNF) é uma citocina que está aumentada no WAT tanto no contexto da obesidade como sob o estímulo do jejum. Consistentemente, trabalhos *in vitro* demonstram que essa citocina participa do estímulo lipolítico. Adicionalmente, a sinalização do TNF em adipócitos estimula a secreção da interleucina 18 (IL-18), citocina que também participa da regulação lipolítica. Todavia, ainda é desconhecido o papel *in vivo* de ambas as citocinas na redução da massa adiposa induzida pela restrição alimentar. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a participação do TNF e da IL-18 no remodelamento do tecido adiposo induzido pela baixa disponibilidade de nutrientes em modelos animais e em humanos.

Métodos: Foram realizadas cinco abordagens experimentais. Inicialmente, utilizamos camundongos machos C57/B16, *wild-type* (WT), *knockout* para o receptor 1 do TNF (TNFR1^{-/-}) e *knockout* para a IL-18 (IL-18^{-/-}) submetidos ou não (controle) ao jejum de 24 ou 48h para avaliação da morfometria, metabolismo e inflamação do tecido adiposo epididimal (eWAT) e subcutâneo (iWAT). Como forma de mimetizar a resposta ao jejum, camundongos WT e TNFR1^{-/-} foram tratados com CL316,243, um agonista seletivo do receptor adrenérgico β3, ou PBS e após 24h foram eutanasiados e avaliados. Realizamos a análise *ex-vivo* de porções do eWAT e iWAT de camundongos que foram condicionados em meio de cultura, tratados com um anticorpo inibidor do TNF, Infliximab, por 24h e estimulados por 90 minutos com CL316,243. Camundongos também foram tratados com Infliximab ou PBS e submetidos ou não (controle) ao jejum de 48h. Em uma abordagem mais translacional, analisamos a expressão dos genes para o TNFR1, ATGL, HSL, adiponectina, leptina e IL-18 no tecido adiposo omental (oWAT) e tecido adiposo subcutâneo (sWAT) de pacientes com obesidade grave. A expressão desses genes foi correlacionada com dados antropométricos e metabólicos antes e um ano após a cirurgia bariátrica. **Resultados:** Camundongos WT submetidos ao jejum de 24h apresentaram redução de adiposidade ao passo que os TNFR1^{-/-} são resistentes a perda do tecido adiposo mesmo quando em jejum prolongado de 48h. A não responsividade dos camundongos TNFR1^{-/-} parece ser decorrente da menor expressão de lipases e citocinas no WAT. Camundongos TNFR1^{-/-} são também resistentes a redução de adiposidade induzida pelo CL316,243. Além disso, camundongos tratados com infliximab, e submetidos ao jejum de 48h são resistentes a perda de adiposidade e apresentam menor número de macrófagos residentes no iWAT. Diferente do TNF, a IL-18 parece não participar da redução de adiposidade induzida pelo jejum ou cirurgia bariátrica uma vez que camundongos IL-18^{-/-} respondem ao jejum de forma similar aos animais WT. Além disso, a expressão da IL-18 no oWAT ou sWAT não se correlacionou com a perda de peso e gordura corporal um ano após a cirurgia bariátrica. **Conclusão:** Identificamos um efeito citocina-específico na regulação da perda de adiposidade induzida pelo jejum TNF exerce papel chave no remodelamento do tecido adiposo, ao passo que a IL-18 parece não exercer papel significativo.

Palavras-chave: Jejum, remodelamento do tecido adiposo, cirurgia bariátrica, TNF, IL-18.

ABSTRACT

Introduction: The role of inflammatory mediators in adipose tissue remodeling resulting from both obesity and weight loss has been described in the literature. Paradoxically, both low and high nutrient availability induce an inflammatory response in white adipose tissue (WAT), which favors an increase or reduction in adiposity. Tumor necrosis factor (TNF) is a cytokine that increases in WAT both in the context of obesity and under the stimulus of fasting. In vitro studies have consistently demonstrated that this cytokine participates in lipolytic stimulation. Additionally, TNF signaling in adipocytes stimulates the secretion of interleukin 18 (IL-18), a cytokine that participates in lipolytic regulation. However, the role of both cytokines in adiposity reduction induced by dietary restriction remains unknown. The objective of the present study was to evaluate the participation of TNF and IL-18 in adipose tissue remodeling induced by low nutrient availability in animal models and humans. **Methods:** This work included 5 five experimental approaches. Initially, we used C57/B16 male mice, wild-type (WT), knockout of TNF receptor 1 (TNFR1^{-/-}), and knockout of IL-18 (IL-18^{-/-}) subjected or not (control) to fasting for 24 or 48 h to evaluate the morphometry, metabolism, and inflammation of epididymal adipose tissue (eWAT) and subcutaneous adipose tissue (iWAT). To mimic the response to fasting, WT and TNFR1^{-/-} mice were treated with CL316,243, a selective β_3 adrenergic receptor agonist, or PBS and after 24h they were euthanized. We performed an ex vivo evaluation in which portions of eWAT and iWAT from C57/B16 mice were collected, conditioned in culture medium, treated with a TNF inhibitor antibody (infliximab, for 24h and stimulated for 90 min with CL316,243. C57/B16 mice were also treated with Infliximab or PBS and fasted for 48 h (control). In a more translational approach, we analyzed the expression of TNFR1, ATGL, HSL, adiponectin, leptin, and IL-18 in omental adipose tissue (oWAT) and subcutaneous adipose tissue (sWAT) of patients with severe obesity. The expression of these genes was correlated with anthropometric and metabolic data before and one year after bariatric surgery. **Results:** WT mice fasted for 24 h showed reduced adiposity, whereas TNFR1^{-/-} mice were resistant to fat pad loss, even after fasting for a prolonged period of 48 h. The non-responsiveness of TNFR1^{-/-} mice appears to be due to lower expression of lipases and cytokines in WAT. TNFR1^{-/-} mice were also resistant to CL316,243 induced adiposity reduction. Furthermore, mice treated with infliximab and fasted for 48 h were resistant to adiposity loss and had a lower number of resident macrophages in the iWAT. Interestingly, TNFR1 expression in the oWAT of obese patients was positively correlated with weight loss ($r=0.5846$) and adiposity ($r=0.5352$) one year after bariatric surgery. Unlike TNF, IL-18 does not appear to participate in the adiposity loss induced by fasting or bariatric surgery, since IL-18^{-/-} mice respond to fasting in a similar way to WT animals. Furthermore, IL-18 expression in oWAT and sWAT was not correlated with weight and body fat loss one year after bariatric surgery. **Conclusion:** We identified a cytokine-specific effect on the regulation of adiposity loss induced by fasting or bariatric surgery, where TNF plays a key role in adipose tissue remodeling, while IL-18 does not appear to play a significant role.

Keyword: Fasting, adipose tissue remodeling, bariatric surgery, TNF, IL-18.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Ilustração 1.** Mobilização de gordura no WAT. 24
- Ilustração 2.** O TNF exerce um papel chave no remodelamento do tecido adiposo induzido pelo jejum em camundongos. 70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência dos primers utilizados para avaliação de expressão gênica por RT-PCR.	39
Tabela 2. Dados clínicos e metabólicos de pacientes com obesidade grave submetidos à cirurgia bariátrica.	56

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** O desafio do jejum de 24h reduz a adiposidade ao mesmo tempo que aumenta a expressão de TNF no WAT. 41
- Figura 2.** Camundongos TNFR1 são resistentes a perda de peso e adiposidade visceral induzida pelo jejum. 42
- Figura 3.** Participação do TNFR1 na redução de adiposidade e na biometria de adipócitos induzida pelo jejum. 43
- Figura 4.** Participação da sinalização do TNF no processo lipolítico. 44
- Figura 5.** Participação da sinalização do TNF na expressão de citocinas induzidas pelo jejum. 45
- Figura 6.** Camundongos com ausência de sinalização do TNF são resistentes a perda de peso corporal e adiposidade induzida pelo jejum de 48h. 46
- Figura 7.** Camundongos com ausência de sinalização do TNF são resistentes a redução do peso dos tecidos eWAT e iWAT induzida pelo jejum de 48h. 47
- Figura 8.** Ausência de sinalização do TNF não altera o conteúdo de tirosina hidroxilase no tecido adiposo. 48
- Figura 9.** Ausência de sinalização do TNF o altera o conteúdo de β 3-AR no tecido adiposo. 49
- Figura 10.** Experimento *ex vivo* para avaliar o efeito do TNF na mobilização de gordura e expressão de citocinas. 51
- Figura 11.** Ausência de sinalização do TNF inibe a redução do eWAT e iWAT induzida pelo tratamento com o CL316,243. 52
- Figura 12.** Ausência de sinalização do TNF inibe a expressão de citocinas induzidas pelo tratamento com o CL316,243. 53
- Figura 13.** Tratamento com anti-TNF inibe a redução de adiposidade e o número de macrófagos residentes induzido pelo jejum. 55
- Figura 14.** TNF se correlaciona com a expressão de lipases e adipocinas no WAT de indivíduos com obesidade. 57
- Figura 15.** Expressão do TNFR1 em tecido adiposo de indivíduos obesos se correlaciona com perda de peso e gordura corporal após cirurgia bariátrica. 58
- Figura 16.** A IL-18 não participa na redução de adiposidade induzida pelo jejum. 59
- Figura 17.** A IL-18 não participa da redução da área de adipócitos induzida pelo jejum. 60

Figura 18. Concentrações séricas de FFA e leptina e expressão de TNF de camundongos IL-18^{-/-} submetidos ou não ao jejum. 61

Figura 19. IL-18 se correlaciona com a expressão de lipases e adipocinas no WAT de indivíduos com obesidade. 62

Figura 20. Expressão da IL-18 em tecido adiposo de indivíduos obesos não se correlaciona com perda de peso, gordura corporal ou marcadores metabólicos após cirurgia bariátrica. 63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

24h - 24 horas

48h - 48h horas

AC – Adenilato ciclase

ACTH - Hormônio adrenocorticotrófico

AMPC - Monofosfato cíclico de adenosina

ANGPTL4 - Semelhante a agiopepitina 4

ATGL - Lipase triglicerídica adiposa

BAT – Tecido adiposo marrom

BMP - Proteína morfogenética óssea

BNST - Núcleo do leito da estria terminal

CD36 – Transportadores de ácido graxo

CD8+ - Linfócitos T CD8+

CEBP α - Proteína alfa CCAAT/enhancer-binding

CGI-58 - Comparativo de identificação de genes-58

ChREBP - Proteína ligação ao elemento responsivo a carboidratos

CRH - Hormônio liberador de corticotrofina

DM2 - Diabetes do tipo 2

ERK1 - Quinase relacionada ao sinal extracelular 1

ERK2 - Quinase relacionada ao sinal extracelular 2

eWAT - Tecido adiposo epididimal

FFA- Ácidos graxos livres

GH – Hormônio do crescimento

Gi - Proteína G inibitória

GLUT4 – Transportador de glicose 4

HIV - Vírus da imunodeficiência humana

HSL - Lipase hormônio sensível

IL-10 – Interleucina 10

IL-18 – Interleucina 18

IL-18BP - Proteína de ligação da IL-18

IL-18R – Receptor da IL-18

IL-1 β - Interleucina 1 β

IL-6 - Interleucina 6
IMC - Índice de massa corporal
INF γ - Interferom gamma
iNOS - Oxido nitrico sintase induzida
iWAT - Tecido adiposo inguinal
JNK - c-Jun N-terminal quinase
LIPE – Gene que codifica HSL
LPL - Lipase lipoproteica
M1 - Macrófagos classicamente ativados
MAPK - Proteína quinase ativada por mitogenos
mbTNF – TNF transmembrana
MCP-1 - Proteína quimioatraente de macrófagos 1
MGL - Monoacilglicerol lipase
NAFLD - Doença do fígado gorduroso não alcoólico
NF κ B - Fator nuclear kappa B
NLRP1 - Domínio pirina da família NLR contendo 1
NLRP3 - Domínio pirina da família NLR contendo 3
NNC - Co-transportador de NaCl
oWAT - Tecido adiposo omental
PAFR - Receptor para o fator de ativação plaquetária
PBS - Salina tamponada com fosfato
PDGFR α - Fator de crescimento derivado de plaquetas- α
PDGFR β - Fator de crescimento derivado de plaquetas- β
PKA - Proteína quinase A
PNPLA2 - Gene que codifica ATGL
PPAR γ - Receptor ativado por proliferador de peroxissoma γ
PVH - Núcleo paraventricular do hipotálamo
qPCR - Reação em cadeia polimerase
RPLP0 - Proteína ribossomal ácida 60S P0
RYGB - Bypass gástrico em Y-de-Roux
SAM - Macrófagos associados ao nervo simpático
SLC6A2 - Membro 2 da família de transportadores de soluto 6
SREBP1c - Proteína de ligação ao elemento responsivo a esteróis 1 c
sTNF – TNF solúvel

sWAT - Tecido adiposo subcutâneo
TACE - Enzima conversora de TNF
TG - Triglicerídeos
TGF β - Fator de crescimento transformador beta
Th1 – Linfócito T CD4+ do tipo 1
TNF – Fator de necrose tumoral
TNFR1 – Receptor 1 do TNF
TNFR2 – Receptor 2 do TNF
Trib1 - Homólogo 1 de Tribbles
UCP-1 - Proteína desacopladora de próton
VSG - Gastrectomia vertical
vWAT - Tecido adiposo visceral
WAT - Tecido adiposo branco
 α 2-AR – Receptor adrenérgico alfa 2
 α SMA - α actina de músculo liso
 β 3-AR – Receptor adrenérgico beta 3

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1 Tecido adiposo.....	18
2.2 Remodelamento Do Tecido Adiposo.....	19
2.2.1 Expansão da Adiposidade	19
2.2.2 Redução da adiposidade induzida pela baixa disponibilidade de nutrientes.....	22
2.2.2.1 Redução de adiposidade induzida pela cirurgia bariátrica.....	25
2.2.3 Vias Inflamatórias e a redução da adiposidade.....	26
2.2.4 TNF: um sinalizador da lipólise.....	27
2.2.5 IL-18 e a biologia do tecido adiposo.....	29
3 JUSTIFICATIVA, HIPÓTESE E OBJETIVOS	31
3.1 Objetivo Geral.....	32
3.2 Objetivos Específicos.....	32
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
4.1 Delineamentos experimentais.....	34
4.1.1 Modelos animais.....	34
4.1.2 Análises em humanos.....	36
4.2 Dosagens Sorológicas.....	36
4.3 Lâminas histológicas.....	36
4.4 Morfometria do tecido adiposo.....	37
4.5 Lipólise <i>ex vivo</i>	37
4.6 Imunofluorescência.....	37
4.7 Quantificação da intensidade de fluorescência.....	38
4.8 Citometria de fluxo.....	39
4.9 Expressão de genes por PCR em tempo real.....	39
4.10 Análise estatística.....	40
5 RESULTADOS.....	41
5.1 A sinalização via TNFR1 é importante para redução do tecido adiposo induzida pelo jejum em camundongos.....	41
5.2 A via do TNF participa da redução do tecido adiposo induzida por CL316,243.....	50

5.3 O tratamento com anti-TNF, infliximab, inibe a redução de adiposidade induzida pelo jejum e diminui o número de macrófagos residentes no tecido.....	54
5.4 Maior expressão do TNFR1 correlaciona com maior perda de adiposidade e peso corporal induzida pela cirurgia bariátrica.....	56
5.5 A IL-18 não participa na redução do tecido adiposo induzida pelo déficit calórico.....	59
6 DISCUSSÃO.....	64
7 CONCLUSÃO.....	70
8 AGRADECIMENTO ÀS AGÊNCIAS DE FOMENTO	71
REFERÊNCIAS	
BIBLIOGRÁFICAS.....	72
ANEXO A.....	84
ANEXO B.....	88

1 INTRODUÇÃO

O tecido adiposo branco (WAT) é um órgão que possui como função principal o armazenamento e mobilização de energia na forma triglicérides (SECOR et al., 2016). Nesse sentido, o WAT remodela de acordo com o estado energético do organismo. Em situações de baixa disponibilidade de energia, como o jejum e a restrição no consumo de calorias, o WAT reduz o seu tamanho a fim de fornecer substrato de energético e proteger o organismo contra a hipoglicemia (LAFONTAN; LANGIN, 2009). As baixas concentrações da glicose no hipotálamo fazem com que essa região do cérebro aumente o tônus simpático no WAT (SHI et al., 2001; BARTNESS et al., 2014). Com isso, ocorre a liberação de noradrenalina que interage com o receptor beta3-adrenérgico (β 3-AR) e inicia uma cascata de sinalização que culmina na ativação da lipólise. Assim, as enzimas, lipase triglicéridica adiposa (ATGL) e lipase hormônio sensível (HSL) são ativadas e os triglicérides (TG) nos adipócitos são clivados em ácidos graxos livres (FFA) e glicerol, que, por sua vez, serão utilizados como substrato energético por outros órgãos e tecidos, como músculos e fígado (FRÜHBECK et al., 2014).

Nos últimos anos, vários autores têm demonstrado que existe uma resposta inflamatória no WAT que acompanha a redução do tecido adiposo em situações de baixa disponibilidade energética. Como exemplo, o jejum de 24h aumenta a expressão proteínas de fase aguda no tecido adiposo inguinal (iWAT) de camundongos (ASTERHOLM et al., 2012). Já no tecido adiposo epididimal (eWAT) o desafio do jejum aumenta o infiltrado de macrófagos (KOSTELI et al., 2010), neutrófilos e os níveis de TNF, IL-6, IL-10 e TGF- β (LACERDA et al., 2019). De forma interessante, humanos submetidos a 10 dias de jejum também apresentam níveis séricos elevados de TNF, IL-6 e IL-10, além de aumento no número de macrófagos no tecido adiposo subcutâneo (FAZELI et al., 2020). A mimetização simpática da lipólise por meio do agonista seletivo do β 3-AR, CL316,243, também induz a resposta inflamatória no tecido adiposo de camundongos (MOTTILLO et al., 2007; GRANNEMAN et al., 2005; FLACH et al., 2013). Condizente com esses dados, camundongos que possuem resposta inflamatória reduzida, quando são submetidos ao desafio do jejum, apresentam comprometimento na redução da adiposidade (LACERDA et al., 2020). Curiosamente, camundongos obesos submetidos a 24 horas de jejum também são resistentes à redução do tecido adiposo. Esses animais já apresentam a inflamação crônica de baixa intensidade decorrente da obesidade, e por esse motivo parecem não ativar uma resposta inflamatória adequada quando estimulados pelo jejum o que compromete o remodelamento do tecido adiposo, um evento que nosso grupo de pesquisa tem denominado de “inflexibilidade inflamatória” da obesidade (LACERDA et al., 2019).

O TNF é uma citocina que se apresenta aumentada no WAT durante o jejum e está relacionada a mobilização de gordura decorrente da restrição alimentar consequente da cirurgia bariátrica (JÜRETS et al., 2017). Ensaios *in vitro* iniciados na década de 90 já demonstravam que o TNF estimula a lipólise. Nos adipócitos, a sinalização do TNF por meio do receptor transmembrana, TNFR1, ativa o fator nuclear- κ B (NF- κ B), que reduz a expressão da lipoproteína lipase (LPL) e aumenta a transcrição dos genes de HSL e perilipina (GREEN et al., 1994; LAURENCIKIENE et al., 2007; SETHI et al., 2000). Além disso, a sinalização do TNF com seu receptor TNFR1 inibe o receptor de adenosina acoplado à proteína inibitória G (Gi), aumentando a produção de AMP cíclico (cAMP) e, conseqüentemente, a ativação da proteína quinase A (PKA), que culmina na ativação de ATGL e HSL (BOTION et al., 2001; GASIC et al., 1999). Consistentemente, humanos tratados com doses subclínicas de TNF apresentam maior mobilização de gordura (PLOMGAARD et al., 2008). Esses dados corroboram com uma extensa literatura que indicam o TNF como uma citocina envolvida em doenças que determinam alterações no remodelamento do tecido adiposo, como a obesidade e a caquexia. Entretanto, ainda é pouco conhecido o papel dessa citocina no controle do remodelamento do WAT em situações de déficit energético.

Os inflamassomas são vias imunes inatas ativadas pelo TNF (BAUERNFEIND et al., 2016). Após ativação, o inflamassoma cliva a pro-IL-1 β e a pro-IL-18 em IL-1 β e IL-18. O papel da IL-18 é amplamente descrito em doenças autoimunes (IHIM et al., 2022). Contudo, sua participação na biologia do tecido adiposo, em especial, na mobilização de gordura é pouco explorada. Animais *knockout* para o receptor de IL-1 β , com maior ativação do inflamassoma NLRP1 e aumento da expressão de IL-18, apresentam maior lipólise com consequente desenvolvimento de caquexia (MURPHY et al., 2016). Além disso, o tratamento de pacientes com lipodistrofia com acipimox e insulina, droga e hormônio que têm efeito antilipolítico, promove redução nas concentrações plasmáticas de IL-18 (LINDEGAARD et al., 2013). Nesse contexto, há evidências de que a IL-18 também possa estar envolvida na regulação da via lipolítica. Entretanto, é desconhecida sua participação no remodelamento do tecido adiposo decorrente da baixa disponibilidade de nutrientes, como ocorre no jejum ou cirurgia bariátrica.

Existe uma vasta literatura que demonstra o envolvimento de células imunológicas e citocinas do WAT em doenças como a obesidade e a caquexia (GREGOR et al., 2011; REILLY et al., 2017, PATEL et al., 2017). Mais recentemente, o sistema imunológico também tem sido identificado como um importante modulador das funções básicas do WAT, principalmente em situações de baixa disponibilidade energética (ASTERHOLM et al., 2012; FLACH et al., 2013; KOSTELI et al., 2010;

LACERDA et al., 2019, 2020). Entretanto, ainda são incipientes os dados que demonstram quais citocinas e como essas citocinas modulam a fisiologia do tecido adiposo e, principalmente, seu remodelamento. Nesse sentido, no presente trabalho buscamos investigar o papel do TNF e da IL-18 no remodelamento do tecido adiposo induzido pela baixa disponibilidade de nutrientes, tanto em modelos animais como em humanos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 TECIDO ADIPOSEO

Os seres vivos possuem a habilidade de se adaptarem a alterações causadas pelo ambiente, como a disponibilidade de nutrientes. O tecido adiposo branco (WAT) é um dos órgãos essenciais nesse contexto, uma vez que ele atua na manutenção da homeostase energética por meio do armazenamento e da mobilização de energia na forma de triglicérides (TG) (CHOUCHANI; KAJIMURA, 2019). Anatomicamente esse órgão é dividido em WAT subcutâneo (sWAT), localizado principalmente abaixo da derme e WAT visceral (vWAT) que está concentrado na cavidade abdominal, em torno dos órgãos (CHOE et al., 2016). As populações celulares que compõem o WAT são basicamente divididas em adipócitos e a fração do estroma vascular. Na organização funcional do tecido adiposo, os adipócitos são considerados as células principais desse órgão (MEIZLISH et al., 2021) uma vez que são especializadas em armazenar gordura por meio de uma única gota lipídica que ocupa cerca de 90% da sua área. Além disso, fornecem substrato energético por meio da ação das enzimas lipase triglicerídica adiposa (ATGL) e lipase hormônio sensível (HSL) (CHOUCHANI; KAJIMURA, 2019). A fração do estroma vascular, por sua vez, é considerada um grupo de células que possui a função de suporte no tecido adiposo. Ou seja, essas células não são capazes de fornecer ou armazenar energia e sim facilitar a “performance” dos adipócitos (MEIZLISH et al., 2021). A fração do estroma vascular é composta por uma variedade de células compreendendo a microvasculatura do tecido adiposo e células imunológicas. As células imunológicas incluem principalmente macrófagos, linfócitos T e B, células linfóides inatas, mastócitos, eosinófilos, neutrófilos e células dendríticas (MASSIER et al., 2023). Além dessas células, o estroma é constituído também por células endoteliais, fibroblastos e pré-adipócitos (CHOE et al., 2016).

O advento da técnica de single-cell e da bioinformática permitiu a ciência avançar no conhecimento da real composição celular dos órgãos e tecidos (WANG et al., 2010). Nesse sentido, MASSIER e colaboradores (2023) realizaram uma metanálise com a criação de um “*meta-map*” celular do tecido adiposo. Os autores analisaram os 10 mais recentes trabalhos de *single cell* realizado em amostras de vWAT e sWAT e identificaram a composição das células do tecido adiposo de humanos e camundongos. Os adipócitos e células imunológicas estão presentes no WAT em uma razão de 1:1, constituindo juntos 40% das células totais do tecido. Além disso, o grupo celular com maior percentual no WAT são os fibroblastos e pré-adipócitos, que compõem 40% das células desse órgão. É importante destacar que a maioria dos tipos celulares descritos pelos trabalhos de *single cell*

estão presentes tanto no sítio visceral como no sítio subcutâneo (MASSIER et al., 2023). Contudo, a localização anatômica desses depósitos de tecido adiposo parece interferir em algumas populações celulares, como por exemplo as células mesoteliais que são encontradas apenas no sítio visceral (GUPTA; GUPTA, 2015) e os macrófagos metabólicos reguladores redox que são encontrados somente no sítio subcutâneo (MASSIER et al., 2023).

A composição celular diversa do tecido adiposo é a responsável pelo acúmulo e mobilização de gordura. Esses processos fazem com que o WAT remodele alterando a sua morfologia. Isso permeia desde alterações no tamanho e no número dos adipócitos, até o infiltrado de leucócitos e a deposição de matriz extracelular. O remodelamento do tecido adiposo também compreende mecanismo moleculares como a ativação de lipases, a sinalização de fatores de transcrição, o aumento ou redução da atividade da proteína desacopladora de próton (UCP-1) e a sinalização de citocinas e outros mediadores inflamatórios (CHOE et al., 2016; MARCELIN et al., 2019). Dessa forma, o remodelamento do tecido adiposo pode ser induzido por doenças como a caquexia (DAAS et al., 2018), mas principalmente por alterações ambientais como a temperatura e a disponibilidade de nutrientes (LIM et al., 2012; KERSTEN et al., 2023). Assim, dentre os tipos de remodelamento do tecido adiposo mais investigados na literatura podemos destacar: o escurecimento do WAT induzido pelo frio ou caquexia (LIM et al., 2012; XIE et al., 2022), a redução de adiposidade induzida pelo déficit energético (KERSTEN et al., 2023) e a expansão do tecido adiposo decorrente da sobrecarga de nutrientes (SUN et al., 2011).

2.2 REMODELAMENTO DO TECIDO ADIPOSEO

2.2.1 Expansão da adiposidade

Situações de alta disponibilidade de nutrientes, estimulam a expansão do WAT por meio de dois processos caracterizados pelo aumento do tamanho dos adipócitos, a hipertrofia, e pela formação de novos adipócitos, a hiperplasia (GHABEN; SCHERER, 2019). Células semelhantes a fibroblastos são precursores da linhagem mesenquimal que expressão o receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas- α (PDGFR α), o PDGFR β e a α actina de músculo liso (α SMA). Essas células se tornam pré-adipócitos por meio da etapa de comprometimento onde ocorre a ativação da proteína morfogenética óssea (BMP) (WANG et al., 1993). Posteriormente, a ativação do receptor ativado por proliferador de peroxissoma γ (PPAR γ) (BARAK et al., 1999; ROSEN et al., 1999) faz com que o pré-adipócito interrompa seu crescimento e comece a expressar proteínas relacionadas ao adipócito maduro como a proteína de ligação de ácidos graxos e adipócitos (AP2) e do transportador de glicose

insulino-dependente, GLUT4. Ao término da diferenciação os adipócitos maduros expressam moléculas características da sua função de armazenamento e mobilização de gordura como, as adipocinas, adiponectina e leptina; as lipases como, ATGL, lipase lipoproteica (LPL) e HSL; e a proteína perilipina que envolve a gotícula lipídica dos adipócitos (TONTONOZ; HU; SPIEGELMAN, 1994; WANG et al., 2013). A adipogênese é um processo que também acontece durante desenvolvimento embrionário, no caso do sWAT e após o nascimento no caso do vWAT. Todavia, a sobrecarga de nutrientes estimula também a criação de novos adipócitos afim de armazenar o excesso de energia gerado na vida adulta (WANG et al.,2013).

A hipertrofia dos adipócitos ocorre por meio do armazenamento da gordura dietética, empacotada nos quilomícron ou pela lipogênese de novo que acontece no tecido adiposo ou fígado (JEFFERY et al., 2015). Refeições de alta densidade energética são geralmente caracterizados pelo alto conteúdo de carboidratos, principalmente refinados e de gordura saturada. A glicose oriunda dessas refeições estimula a secreção de insulina pelas células β do pâncreas. Nos adipócitos a interação da insulina com o seu receptor estimula a translocação do GLUT4 para a membrana da célula estimulando a captação de glicose. Além disso, esse hormônio tanto nos hepatócitos quanto nos adipócitos estimula a lipogênese de novo (CZECH, 2017). A sinalização da insulina com o seu receptor e a presença da glicose na célula também ativam os fatores de transcrição da proteína ligação ao elemento responsivo a carboidratos (chREBP) e da proteína de ligação ao elemento responsivo a esteróis 1 c (SREBP1c). As ativações desses fatores de transcrição estimulam a síntese de enzimas lipogênicas, ativando ainda mais a lipogênese *de novo* no fígado e no WAT (RÉGNIER et al., 2023; SHIMANO; SATO, 2017). Assim, os TG formados nos hepatócitos são então empacotados com as lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e os quilomícron remanescentes e transportados da circulação para o tecido adiposo (SONG; XIAOLI; YANG, 2018). No endotélio vascular desse tecido, os triglicerídeos são clivados em ácidos graxos livres (FFA) e glicerol pela ação da LPL estimulada pela insulina. Os adipócitos por meio dos transportadores de ácidos graxos (CD36) e de glicerol (aquaporina) captam e internalizam os FFA e glicerol que são reesterificados à TG (MERKEL; ECKEL; GOLDBERG, 2002). Esses lipídios são armazenados nos adipócitos juntamente com os triglicerídeos sintetizados pela lipogênese *de novo* nessas células aumentando assim o tamanho dos adipócitos e do WAT (ENDEMANN et al., 1993; WU et al., 2006).

A expansão do tecido adiposo ocorre no organismo com objetivo de manter as reservas energéticas para situações de privação como o jejum noturno. Contudo, a expansão exagerada do tecido adiposo culmina na obesidade que, por sua vez, está relacionada com o aumento da secreção

de adipocitocinas leptina e resistina e de moléculas inflamatórias como o TNF, a IL-1 β , a IL-6, o CXCL1 e proteína quimioatraente de macrófagos 1 (MCP-1) (GUZIK et al., 2017). Nesta condição ocorre aumento do recrutamento de linfócitos, neutrófilos e monócitos para o tecido adiposo (ELGAZAR-CARMON et al., 2008; KINTSCHER et al., 2008; WEISBERG et al., 2003). Esses linfócitos são ativados em T CD4⁺ do tipo 1 (Th1) e linfócitos T CD8⁺ (CD8⁺) e secretam interferon γ (IFN γ) (KINTSCHER et al., 2008; NISHIMURA; MANABE; NAGAI, 2009). Essa citocina aumenta a expressão de iNOS nos macrófagos polarizando essas células para o fenótipo do tipo M1. Com isso os macrófagos M1 secretam ainda mais TNF, IL-1 β e IL-6 no tecido adiposo, mantendo a inflamação no tecido de forma crônica e em baixa intensidade (LUMENG; BODZIN; SALTIEL, 2007).

O TNF, a IL-1 β e a IL-6 ativam a via lipolítica por meio da sinalização da proteína quinase ativada por mitogenos (MAPK) aumentando a liberação de FFA e glicerol (FRÜHBECK et al., 2014; YANG; VIJAYAKUMAR; KAHN, 2018). Os FFA interagem com os receptores do tipo Toll 4 (TLR4) presentes nos adipócitos e macrófagos do tecido adiposo (SCHAEFFLER et al., 2009). Essa sinalização estimula a translocação do fator nuclear kappa B (NF κ B) do citoplasma para o núcleo das células estimulando a transcrição de mais citocinas próinflamatórias, mas, também do inflamassoma, domínio pirina da família NLR contendo 3(NLRP3). Essa proteína é composta por um sensor que é o próprio NLRP3, o adaptador ASC e o efetor que é a caspase-1. Com a formação do inflamassoma a caspase-1 é ativada e cliva a pró-IL-1 β e a pró-IL-18 nas suas versões ativas que são secretadas intensificando ainda mais a inflamação no WAT (SWANSON; DENG; TING, 2019; VANDANMAGSAR et al., 2011; WEN et al., 2011).

Esse contexto inflamatório decorrente do infiltrado de células imunológicas no tecido adiposo e do aumento na produção de mediadores inflamatórios é denominado inflamação crônica de baixa intensidade. Essa inflamação em conjunto com os FFA liberados pelos adipócitos fosforilam o resíduo de serina do receptor de insulina ao invés do resíduo de tirosina. Assim, a insulina fica com a sua sinalização prejudicada reduzindo a translocação do GLUT4 para a membrana do adipócito e, conseqüentemente, a captação de glicose pelas células é diminuída (HOTAMISLIGIL et al., 1996; HOTAMISLIGIL; SHARGILL; SPIEGELMAN, 1993). Essa sinalização inadequada da insulina é denominada resistência à insulina e está relacionada ao desenvolvimento de diabetes melitos do tipo 2 (DM2) e doença do fígado gorduroso não alcoólico (NAFLD) (BERGIN; EZRA LOZINSKI; FROHLICH, 1942; KHAN et al., 2019).

Apesar do papel deletério da inflamação na obesidade, ela parece ter um efeito fisiológico contra regulando a expansão exagerada do tecido adiposo, pelo menos, no início do desenvolvimento da doença. Nosso grupo de pesquisa e outros demonstraram que animais knockouts para diferentes genes que determinam ausência de algumas vias sinalizadoras inflamatórias desenvolvem maior adiposidade. Como exemplo, animais knockout para os genes TNF, IL-6, IL1 β , IL-18 e do receptor para o fator de ativação plaquetária (PAFR) apresentam aumento da massa adiposa mesmo quando consomem dieta equilibrada (GARCÍA et al., 2006; MARTINS et al., 2018; MENEZES-GARCIA et al., 2014; NETEA et al., 2006; WALLENIUS et al., 2002). Além disso, o grupo do professor Philipp Scherer demonstrou que camundongos com ausência de vias inflamatórias no tecido adiposo prejudica a adipogênese e leva a uma piora na resistência à insulina (ASTERHOLM et al., 2014; ZHU et al., 2020). Esse cenário também acontece em humanos, uma vez que a expressão do PAFR se correlaciona negativamente o percentual de gordura de indivíduos obesos (COSTA et al., 2021). Assim, a inflamação é importante para que o WAT armazene o excesso de energia expandindo de forma saudável sem o comprometimento metabólico.

2.2.2 Redução da adiposidade induzida pela baixa disponibilidade de nutrientes

A baixa disponibilidade de nutrientes promovida por situações como o jejum ou restrição calórica reduz as concentrações plasmáticas de glicose (LAFONTAN; LANGIN, 2009). Isso estimula o hipotálamo a aumentar o tônus simpático na medula das glândulas suprarrenais que, por sua vez, aumentam a secreção das catecolaminas adrenalina e noradrenalina. Essas aminas juntamente com a baixa disponibilidade de glicose estimulam a secreção de glucagon pelas células alfa das ilhotas pancreáticas (BORG et al., 1994; UYAMA; GEERTS; REYNAERT, 2004). O glucagon tem como função aumentar a disponibilidade de glicose para o organismo por meio da sua sinalização no fígado ativando a glicogenólise e a gliconeogênese (OZCAN et al., 2012; WANG et al., 2012). Existem trabalhos que sugerem que as catecolaminas secretadas pela medula das suprarrenais e o glucagon iniciam a lipólise no tecido adiposo durante o jejum (JENSEN et al., 1987; PEREIRA et al., 2020; SCHADE et al., 1979). Todavia, também é demonstrado na literatura que mamíferos demedulados submetidos ao jejum apresentam aumento de FFA e glicerol (NISHIZAWA; BRAY, 1978; TAKAHASHI; SHIMAZU, 1981). Além disso, VASILEVA e colaboradores (2022) demonstraram que camundongos com deleção do receptor do glucagon apenas nos adipócitos e submetidos ao jejum apresentaram mobilização de gordura similar aos animais que possuíam o receptor de glucagon (VASILEVA et al., 2022).

Em contraste com esses dados o tônus simpático no tecido adiposo é o principal responsável pela mobilização de gordura induzida pelo jejum (MIGLIORINI; GAROFALO; KETTELHUT, 1997; NISHIZAWA; BRAY, 1978; TAKAHASHI; SHIMAZU, 1981). A baixa disponibilidade de glicose no hipotálamo também ativa os nervos simpáticos no tecido adiposo, aumentando a secreção de noradrenalina que interage com o receptor β adrenérgico (β -AR) (SHI et al., 2001; BARTNESS et al., 2014). Em camundongos é demonstrado que o β -AR do tecido adiposo receptor adrenérgico β 3 (β 3-AR). Em amostras de tecido adiposo de humanos esse receptor também apresenta atividade (HOFSTEDT et al., 1995). Contudo, os receptores β 1-AR e β 2-AR também estão envolvidos na lipólise do WAT (ARNER et al., 1990). Adicionalmente, é importante destacar que muitas amostras de tecido adiposo são oriundas de paciente com obesidade, doença essa que leva a redução da expressão do β 3-AR (VALENTINE et al., 2022). Posto isso, a interação da noradrenalina com o β 3-AR acoplado a proteína G leva a dissociação da proteína Gs trimérica acoplada ao receptor e ativando a adenilato ciclase (AC), isso resulta na síntese de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc). O AMPc atua como segundo mensageiro ativando a proteína quinase A (PKA) (STEINBERG; HUTTUNEN, 1972). Uma vez ativada, a PKA fosforila a HSL e a perilipina. A fosforilação da proteína que envolve a gota lipídica deixa os TG armazenados nela disponíveis para ação das lipases. Além disso, a ativação da perilipina libera o cofator da ATGL, comparativo de identificação de genes-58 (CGI-58), que fica ancorado na perilipina (LASS et al., 2006; YU et al., 2020). Com isso as lipases começam a hidrolisar os FFA dos TG na seguinte ordem, primeiro ATGL (ZIMMERMANN et al., 2004) seguido pela HSL e pôr fim a monoacilglicerol lipase (MGL), hidrolisa o ácido graxo no grupamento hidroxila terminal ou intermediário da estrutura do glicerol, para gerar glicerol e FFA (M VAUGHAN, 1964). Essas moléculas são transportadas para circulação para outros tecidos respetivamente pela aquaporina e CD36. Assim, o glicerol e os FFA serão utilizados como substrato energético alternativo a glicose, o que, por sua vez, determinará a redução do volume do adipócito em decorrência do menor acúmulo de TG em seu citoplasma (FRÜHBECK et al., 2014) (Ilustração 1).

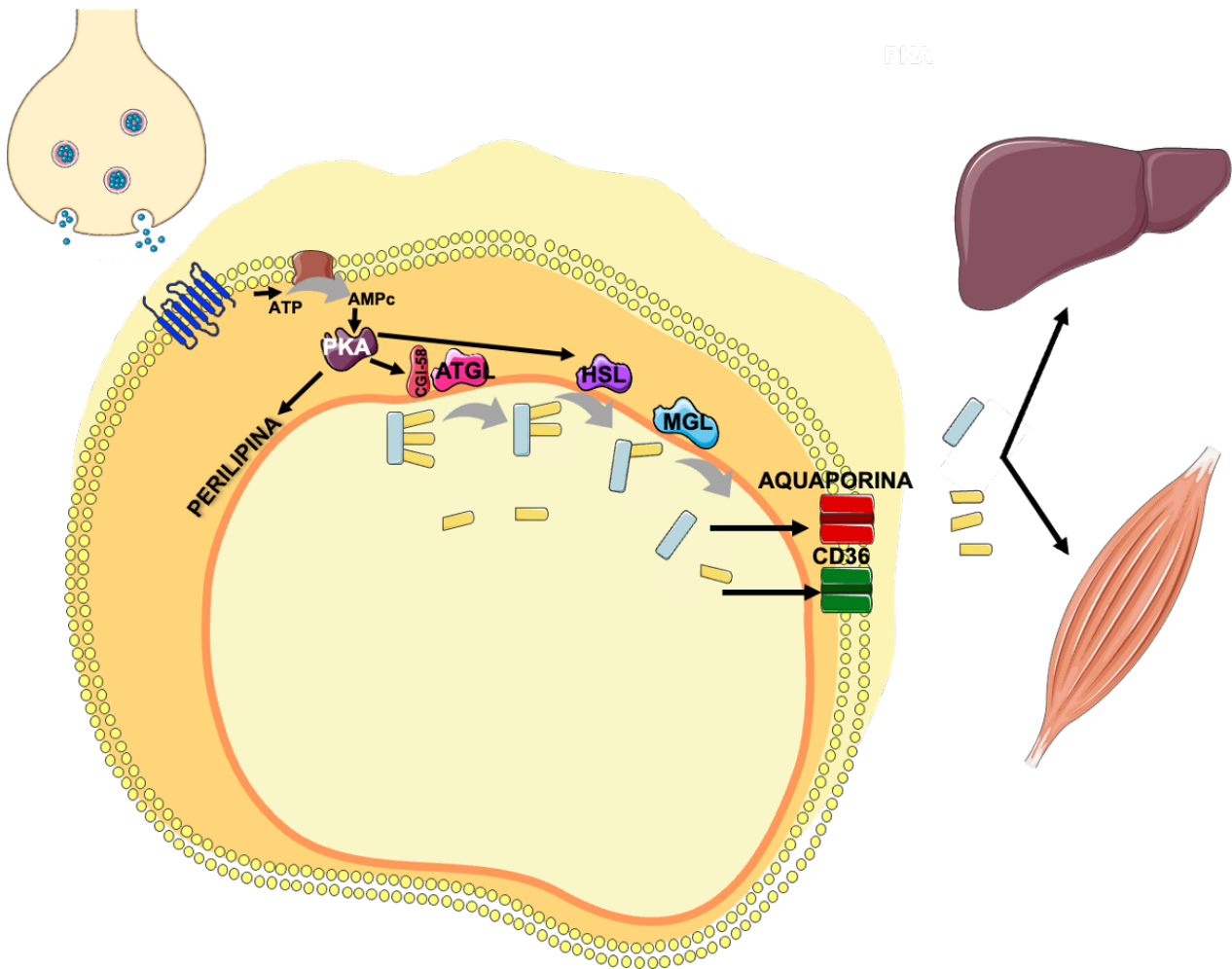


Ilustração 1. Mobilização de gordura no WAT. A baixa disponibilidade de nutrientes induzida pelo jejum e restrição energética aumenta o tônus simpático no WAT, o que promove a sinalização da noradrenalina com o β_3 -AR que culmina na ativação da PKA. Essa proteína fosforila a perilipina, o CGI-58 e a HSL para então os triglicerídeos armazenados nos adipócitos serem clivados em FFA e glicerol em sequência pela ATGL, HSL e MGL. Assim, os FFA e o glicerol são transportados pelo CD36 e aquaporina do citosol para o interstício onde eles serão transportados, para órgãos como fígado e músculo.

A lipólise varia conforme a localização anatômica do WAT. Experimentos *ex-vivo* demonstraram que o tecido adiposo visceral é mais lipolítico que o tecido adiposo subcutâneo. A variação na funcionalidade do receptor adrenérgico α_2 (α_2 -AR) nesses sítios de tecido adiposo é um dos motivos (ÖSTMAN et al., 1979). Visto que, esse receptor possui estímulo antilipolítico no WAT (LAFONTAN; DANG-TRAN; BERLAN, 1979). Assim, o estímulo da adrenalina em adipócitos do sWAT tem efeito prioritariamente antilipolítico, face a maior afinidade com os receptores α_2 -AR. Já nos adipócitos do tecido adiposo omental o estímulo da adrenalina tem efeito exclusivamente lipolítico (MAURIEGE; GALITZKY; BERLAN, 1987). Adicionalmente, o oWAT possui maior expressão do β_3 -AR (KRIEF et al., 1993) e é mais sensível a catecolaminas com maior capacidade

de ligação entre seus receptores β -AR e essas moléculas (HELLMÉR et al., 1992). Assim como sinalização adrenérgica, a organização dos nervos simpáticos varia conforme a localização anatômica do WAT. O vWAT apresenta uma estrutura de nervos simpáticos amorfa ao passo que o sWAT apresenta uma estrutura organizada em lóbulos discretos (CHI et al., 2018). Essa variação da intensidade da lipólise entre os sítios de tecido adiposo pode estar relacionada a quais órgãos o WAT está próximo. O vWAT está localizado próximo do espaço porta. Logo, os FFA e o glicerol gerado na lipólise são direcionados para o fígado que irá utilizá-los como substrato alternativo à glicose. O sWAT, por sua vez, está próximo dos músculos fornecendo FFA e glicerol majoritariamente para esses órgãos.

Como dito anteriormente, a ativação do tônus simpático no WAT durante o jejum é a via canônica de mobilização de gordura e redução de adiposidade (BARTNESS et al., 2014; MIGLIORINI; GAROFALO; KETTELHUT, 1997). Adicionalmente, existe um controle neuroendócrino que auxilia na mobilização e perda de gordura. Durante o jejum o WAT reduz a secreção de leptina que juntamente com a hipoglicemia aumentam a atividade dos neurônios AgRP/NPY (AHLMA et al., 1996; ROUTH, 2010). Uma vez ativados esses neurônios AgRP excitam os neurônios que secretam o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVH). Isso acontece por meio da inibição dos axons terminais do núcleo do leito da estria terminal (BNST) (DOUGLASS et al., 2023). Assim, o CRH é liberado e estimula os corticotropos presentes na hipófise anterior a secretar o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). Esse homônimo interage com o seu receptor no córtex das glândulas suprarrenais estimulando a secreção do cortisol que, por sua vez, possui efeito permissivo na mobilização de gordura durante o jejum, amplificando a ação da noradrenalina (LACASA; AGLI; GIUDICELLI, 1988; STIMSON et al., 2017). O hormônio de crescimento (GH) tem também as suas concentrações plasmáticas elevadas durante o jejum. De forma interessante o tratamento *in vitro* e *in vivo* com GH reduz a expressão da LPL, enzima que possui sua atividade reduzida durante o jejum e aumenta a fosforilação da HSL (DIETZ; SCHWARTZ, 1991; RICHELSEN et al., 2000). Todavia, esses dados parecem estar mais relacionados a lipólise relacionada a resistência à insulina do que ao jejum, necessitando de mais investigação (SHARMA et al., 2018, 2019).

2.2.2.1 Redução de adiposidade induzida pela cirurgia bariátrica

Existem outros contextos além do jejum que estimulam a redução de adiposidade. A cirurgia bariátrica é uma intervenção cirúrgica de alta eficiência para o emagrecimento de indivíduos com índice de massa corporal (IMC) acima de 35kg/m². De forma geral essa cirurgia tem como objetivo

promover redução na ingesta energética do indivíduo por meio da obstrução da alimentação ou diminuir a absorção de nutrientes. Assim, o balanço energético torna-se negativo, aumentando a lipólise no tecido adiposo fazendo com que o indivíduo começa a perder peso e gordura corporal (LI; RICHARD, 2017; SKOGAR et al., 2017). Os tipos de procedimento mais realizados atualmente são a gastrectomia vertical (VSG) e o bypass gástrico em Y-de-Roux (RYGB). A VSG consiste na remoção de aproximadamente 80% do estômago. Já o RYGB envolve a redução do tamanho do estômago por meio da criação de uma pequena bolsa gástrica abaixo do esôfago com a reorganização da anatomia intestinal de forma que os nutrientes sejam desviados da parte superior para a parte média do intestino delgado (SANDOVAL; PATTI, 2023)

A cirurgia bariátrica está associada a declínios sustentados da gordura corporal de 1 até 12 meses (HAGHIGHAT et al., 2021) Além disso, ratos obesos submetidos ao RYGB apresentaram menor acúmulo de gordura induzido por dieta rica em gordura saturada sem perda de massa livre de gordura (FURNES et al., 2009). Da mesma forma, em humano, a perda de peso induzida pelo RYGB ocorre principalmente como consequência de gordura corporal com baixo impacto na perda de massa livre de gordura (PALAZUELOS-GENIS et al., 2008). Dessa forma, sugere-se que o déficit calórico induzido pela cirurgia bariátrica promove o remodelamento do tecido adiposo que compreende a redução de adiposidade.

2.2.3 Vias Inflamatórias e a redução da adiposidade

Como exposto acima o tônus simpático é a via principal para a mobilização de gordura e redução de adiposidade do WAT. Contudo, outros sistemas ou ainda a integração entre eles parece ter papel importante para que a redução de adiposidade induzida pela baixa disponibilidade de nutrientes aconteça de forma adequada. Dentre esses sistemas destaca-se o imunológico. Trabalho anterior demonstrou que camundongos após o jejum apresentam aumento na expressão das proteínas de fase aguda soro amiloide A1, A2 e A3 no tecido adiposo inguinal (iWAT) (ASTERHOLM et al., 2012). No tecido adiposo epididmal (eWAT) de camundongos magros o jejum de 24h aumenta o conteúdo de TNF, IL-6, IL-10, TGF β e CXCL-1 (LACERDA et al., 2019). Esse aumento de citocinas induzido pelo jejum é acompanhado por aumento no recrutamento de neutrófilos (LACERDA et al., 2019) e macrófagos (KOSTELI et al., 2010). De forma consistente, camundongos com deleção para o PAFR, mediador lipídico que induz a síntese de citocinas como TNF, IL-6 e IL1 β , quando submetidos ao jejum de 24h apresentam menor redução de adiposidade assim como menor resposta inflamatória no eWAT (LACERDA et al., 2020). Animais knockout para ATGL quando submetidos ao jejum, consistentemente, apresentam menor infiltrado de macrófagos no eWAT (KOSTELI et al.,

2010). Em humanos o desafio do jejum também induz uma resposta inflamatória no WAT. Fazeli et al. (2020) demonstraram que indivíduos submetidos a 10 dias de jejum apresentaram elevação nas concentrações plasmáticas de TNF, IL-6 e IL-10 e aumento no número de macrófagos no sWAT (FAZELI et al., 2020).

De forma interessante a mimetização da sinalização simpática por meio do tratamento de camundongos com o agonista seletivo do β 3-AR, CL316,243 também induz uma resposta inflamatória no WAT. O CL316,243 induz aumento na expressão de TNF, IL-6, L-1 β e CCL2 no eWAT até 24h após o tratamento (FLACH et al., 2013). Esse aumento na expressão dessas citocinas está relacionado com o recrutamento de células imunológicas que são recrutadas no WAT durante o jejum incluindo neutrófilos (FLACH et al., 2013) e macrófagos (GRANNEMAN et al., 2005). De forma interessante, três dias após o tratamento com o CL316,243 o infiltrado de células no WAT, em especial os macrófagos, reduz. De forma interessante, na ausência da lipólise adequada, como em modelos de camundongos knockout para a HSL estimulados com CL313,243, paralelo a redução da lipólise, ocorre também menor infiltrado inflamatório (MOTTILLO; XIANG; GRANNEMAN, 2007). Ou seja, é possível que a resposta inflamatória que acontece no WAT mediante o jejum tenha função de suporte para que os adipócitos sejam capazes de fornecer de forma eficiente substratos energéticos alternativo para outros órgãos e tecidos.

De forma interessante, camundongos com obesidade moderada quando submetidos ao desafio do jejum apresentam menor resposta inflamatória induzida pela baixa disponibilidade de nutrientes e comprometimento no remodelamento do tecido adiposo (LACERDA et al., 2019). Isso acontece, devido a inflamação crônica de baixa intensidade decorrente da obesidade. Pois, apesar dessa resposta ser um estado inflamatório subclínico, ela leva a um desequilíbrio inflamatório no WAT fazendo com que esse tecido não seja capaz de ativar a resposta inflamatória induzida pelo jejum e assim remodelar mediante a baixa disponibilidade de nutrientes. Nosso grupo de pesquisa denomina essa incapacidade que animais obesos possuem em ativar a resposta inflamatória induzida pelo déficit energético como “inflexibilidade inflamatória”. Diversas citocinas que estão aumentadas no WAT na resposta inflamatória induzida pelo jejum, também se apresentam aumentadas no WAT na obesidade. Contudo, são incipientes os dados que demonstram se esses mediadores inflamatórios de fato resposta inflamatória induzida pelo jejum no WAT.

2.2. 4 TNF: um sinalizador da lipólise

O TNF é uma citocina produzida por uma variedade de células imunes e células não hematopoiéticas, como os adipócitos. A produção dessa molécula pode ser regulada desde a

transcrição do RNA mensageiro (mRNA) até a tradução da proteína. O TNF possui duas isoformas, ambas sendo trímeros transmembrana de 26-kDA (mbTNF) ou 17-kDA (sTNF), sendo esse último solúvel. Para essa molécula se tornar solúvel ela é clivada na membrana da célula produtora pela ação da enzima conversora de TNF (TACE). A sinalização de ambas isoformas do TNF acontece via os receptores, receptor 1 do TNF (TNFR1) e o receptor 2 do TNF (TNFR2). O TNFR1 é expresso constitutivamente durante a homeostase em várias células como macrófagos e adipócitos. O TNFR2, por sua vez, é expresso somente em linfócitos e células endoteliais. Tanto o TNFR1 como o TNFR2 quando interagem com o sTNF podem ser clivados pela TACE. Isso gera as versões solúveis dos receptores que podem ser detectados nos tecidos e na circulação (SETHI; HOTAMISLIGIL, 2021).

A participação do TNF na biologia do tecido adiposo foi inicialmente relatada com a descoberta da caquexina. Essa molécula foi identificada como um fator humoral secretado por macrófagos mediante o estímulo de infecções (BEUTLER et al., 1985a) capaz de levar a hipertrigliceridemia por meio da redução da atividade da LPL no WAT (KAWAKAMI et al., 1987; KAWAKAMI; CERAMI, 1981). Após esses achados foi demonstrado que a caquexina e o TNF eram a mesma proteína, que exercia uma série de funções em contextos inflamatórios como a infecção (BEUTLER et al., 1985b). Nos anos subsequentes foi demonstrado o efeito lipolítico do TNF em cultura de adipócito imortalizados (KAWAKAMI et al., 1987) ou em adipócitos primários de ratos (GREEN et al., 1994). Esse estímulo lipolítico do TNF acontece por meio da interação dessa citocina com seu receptor TNFR1 (SETHI et al., 2000). Em adipócitos isolados do sWAT de humanos essa sinalização reduz a expressão da perilipina e aumenta a expressão e fosforilação da HSL por meio de dois mecanismos. O primeiro é pela translocação do fator de transcrição NF- κ B do citoplasma para o núcleo da célula. Já o segundo acontece via a ativação das quinases pertencentes a família da MAPK, quinase relacionada ao sinal extracelular 1 e 2 (ERK1 e ERK2) e c-Jun N-terminal quinase (JNK). A ativação de ERK nos adipócitos aumenta a disponibilidade de AMPc por meio da redução na expressão da enzima responsável pela degradação de AMPc, fosfodiesterase 3B (PDE3B). Assim, ocorre a ativação da PKA e consequente fosforilação da HSL e perilipina o que ativa a lipólise. Já em adipócitos de roedores a interação do TNF com o TNFR1 inibe o receptor de adenosina acoplado à proteína G inibitória (Gi) aumentando a produção AMPc e, consequentemente, a ativação da PKA, que culmina na fosforilação da HSL e da perilipina (BOTION et al., 2001; GASIC; TIAN; GREEN, 1999). In vivo o estímulo lipolítico do TNF também é descrito. Uma vez que, humanos que receberam doses subclínicas de TNF apresentaram um aumento nas concentrações plasmáticas de FFA. Os autores desses trabalhos sugerem que esse estímulo lipolítico do TNF está relacionado com a

fisiopatologia da obesidade. Uma vez que, a sobrecarga de nutrientes promove o aumento do TNF e da lipólise no WAT o que estimula a resistência à insulina nesse órgão.

Situações de baixa disponibilidade energética, como o jejum também aumentam a lipólise no WAT. De forma interessante, humanos e camundongos submetidos a longos períodos de jejum apresentam um aumento de TNF no soro e no WAT. Além disso, o TNF também controla a atividade da LPL durante o jejum por meio da ativação do semelhante a agiopepitina 4 (ANGPTL4). Além disso, essa citocina está aumentada no sWAT dos indivíduos um ano após a cirurgia bariátrica, outra situação de déficit energético (JÜRETS et al., 2017). Assim, apesar do TNF está relacionado a situações de sobrecarga de energia no WAT parece que ele também está relacionado a situações de baixa disponibilidade de nutrientes. Contudo, ainda é desconhecido se o TNF atua na biologia do WAT durante a privação energética.

2.2.5 IL-18 e a biologia do tecido adiposo

A IL-18 é uma citocina da superfamília da IL-1 β que possui a sua produção relacionada a ativação da caspase-1. Estímulos inflamatórios determinam a translocação do NF κ B para o núcleo da célula que, por sua vez, aumenta a expressão do inflamassoma, como NLRP1 e NLRP3 (KAPLANSKI et al., 2018). O inflamassoma é formado junto com o adaptador ACS e a caspase-1, que cliva a pró-IL-1 β e a pró-IL-18 nas suas versões ativas que são secretadas (SWANSON; DENG; TING, 2019; VANDANMAGSAR et al., 2011; WEN et al., 2011). Logo, as células que secretam IL-18 são células que expressam caspase-1 e os inflamassomas, por exemplo macrófagos e adipócitos (AHMAD et al., 2017; GERDES et al., 2002). A sinalização da IL-18 acontece classicamente via o seu receptor IL-18R que consiste em uma cadeia α responsável pela ligação com a IL-18 e uma cadeia β responsável para sinalização. Além disso, a IL-18 pode ser também neutralizada devido a sua interação com a proteína de ligação da IL-18 (IL-18BP) (KAPLANSKI et al., 2018).

No controle do metabolismo energético a IL-18 é uma molécula considerada como um regulador homeostático que é elevado de forma compensatória na obesidade para se opor ao excesso de energia, algo análogo a leptina (ZORRILLA et al., 2007). Tanto humanos quanto camundongos com obesidade apresentam maiores concentrações de IL-18 no WAT, apesar de animais knockout para IL-18 desenvolverem obesidade (NETEA et al., 2006). Nosso grupo de pesquisa recentemente demonstrou que as células não hematopoiéticas do WAT possivelmente são a fonte de IL-18 que modula a expansão do WAT nesses camundongos knockout (LANA et al., 2024). De fato, a IL-18 controla a sinalização de insulina e a expansão do sWAT via a interação com o IL-18R. Por outro lado, essa citocina possui um outro receptor, o co-transportador de NaCl (NNC) que está presente no

tecido adiposo marrom (BAT) controlando a termogênese (ZHANG et al.,2022). Assim, a interação da IL-18 com o NNC pode estar relacionada ao fato do tratamento com IL-18 reduzir o ganho de peso, o consumo alimentar de camundongos e aumentar o escurecimento no sWAT (PAZOS et al.,2015; ZORRILLA et al.,2007; ZORRILLA et al.,2014).

Além da IL-18 participar do metabolismo da glicose e da termogênese no BAT, parece que ela participa da mobilização de gordura. A ausência de sinalização da IL-18 com o NCC reduz a expressão de ATGL e HSL no BAT durante o tratamento crônico com CL316,243 em camundongos (ZHANG et al.,2022). Adicionalmente, animais knockout para NLRP1 apresentam menor produção de IL-18 e lipólise no vWAT ao passo que a hiperativação de NLRP1 aumenta concentrações plasmáticas de IL-18, reduz a adiposidade de camundongos devido ao catabolismo intenso de gordura (MURPHY et al.,2016). Em humanos a IL-18 também parece participar da mobilização de gordura. Indivíduos com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e lipodistrofia tratados com droga ou hormônio antilipolítico apresentam menores concentrações plasmáticas de IL-18 (LINDEGAARD et al.,2013). Ou seja, essa citocina aparenta participar em processos lipolíticos ligados a termogênese ou a doenças. Dessa forma, existe uma lacuna sobre qual o papel da IL-18 no WAT em situações de baixa disponibilidade energética onde a lipólise é uma via importante.

3 JUSTIFICATIVA, HIPÓTESE E OBJETIVOS

A redução da adiposidade induzida por situações de déficit calórico, como o jejum ou a cirurgia bariátrica, notavelmente se baseia no maior estímulo lipolítico (FRÜHBECK et al., 2014; LI et al., 2017). De forma complementar, dados mais recentes também indicam que a baixa disponibilidade de nutrientes induz uma resposta inflamatória no WAT que favorece a redução de adiposidade (ASTERHOLM et al., 2012; KOSTELI et al., 2010; MOTTILLO et al., 2007; GRANNEMAN et al., 2005; FLACH et al., 2013; FAZELI et al., 2020; LAERDA et al., 2019;). Uma citocina de destaque que está aumentada no WAT durante o jejum tanto em animais (LACERDA et al., 2019) como em humanos (FAZELI et al., 2020), assim como um ano após a cirurgia bariátrica (JÜRETS et al., 2017) é o TNF. Apesar de nenhum outro trabalho ter avaliado o papel direto do TNF no remodelamento do tecido adiposo durante sua redução, trabalhos *in vitro* já demonstraram que a sinalização do TNF com seu receptor TNFR1 induz a lipólise por meio da inibição da proteína Gi, ativação do NF κ B e da MAPK (BOTION et al., 2001; GASIC et al., 1999; RYDEN et al., 2004; RYDEN et al., 2002; ZHANG et al., 2002), indicando que essa citocina possa ser um sinalizador chave para a redução da adiposidade.

A sinalização do TNF com o seu receptor nos adipócitos também estimula a secreção da IL-18. De maneira interessante, a diminuição da lipólise em indivíduos promove a redução das concentrações séricas da IL-18 (LINDEGAARD et al., 2013). Adicionalmente, a hiperexpressão dessa citocina em camundongos faz com que eles morram devido a um catabolismo intenso de gordura (MURPHY et al., 2016). Assim, num contexto geral, especula-se que tanto o TNF como a IL-18, para além de participarem em contextos patológicos do remodelamento do tecido adiposo, parecem também estar envolvidos num contexto fisiológico desse remodelamento. Dessa forma hipotetizamos que exista um efeito citocina específico envolvido na redução do tecido adiposo induzido pela baixa disponibilidade de nutrientes onde o TNF e a IL-18 parecem ser candidatos chaves enquanto mediadores do remodelamento da massa adiposa.

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a participação do TNF e da IL-18 no remodelamento do tecido adiposo induzido pela baixa disponibilidade de nutrientes.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a participação do TNFR1 no remodelamento do tecido adiposo induzido pelo jejum. Para isso, em camundongos WT e TNFR1^{-/-} submetidos ao jejum de 24h ou 48h, avaliamos a biometria corporal, a morfometria dos tecidos adiposos visceral e subcutâneo, analisamos enzimas da via lipolítica, tirosina hidroxilase e β 3-AR e FFA no sorro. Também foram avaliadas a expressão de citocinas nos sítios adiposos.
- Avaliar *ex-vivo*, o efeito do TNF na mobilização de gordura induzida pelo agonista do receptor β 3-AR, CL316,243. Para isso, coletamos fragmentos dos tecidos adiposos visceral e subcutâneo de camundongos C57BL/6, condicionados em meio de cultura, tratados com o anti-TNF infliximab ou PBS e estimulados com CL316,243 ou não. No meio de cultura dessas amostras foram avaliados o glicerol e nos fragmentos dos tecidos adiposos a expressão de citocinas.
- Avaliar *in vivo*, a participação do TNFR1 no remodelamento do tecido adiposo induzido pelo tratamento com o CL316,243. Para isso, em camundongos WT e TNFR1^{-/-} tratados com PBS ou CL316,243 avaliamos a biometria corporal, a morfometria dos tecidos adiposos visceral e subcutâneo, analisamos a expressão de citocinas nos sítios adiposos.
- Avaliar se o jejum e o TNF alteram as populações de células imunológicas no WAT. Para isso, em camundongos tratados com o anti-TNF, infliximab ou PBS submetidos ao jejum de 48h, avaliamos a biometria corporal e realizamos citometria de fluxo nos tecidos adiposos visceral e subcutâneo onde avaliamos a população de eosinófilos, macrófagos residentes e macrófagos recrutados.
- Avaliar a participação do TNFR1 no remodelamento do tecido adiposo induzido pela restrição alimentar decorrente da cirurgia bariátrica. Para isso, analisamos a expressão de TNFR1 no oWAT e sWAT de pacientes com obesidade grave e correlacionamos com marcadores antropométricos e metabólicos um ano após a cirurgia bariátrica.
- Avaliar a participação da IL-18 no remodelamento do tecido adiposo induzido pelo jejum. Para isso, em camundongos WT e IL-18^{-/-} submetidos ao jejum de 24h avaliamos a biometria corporal, a morfometria dos tecidos adiposos visceral e subcutâneo, analisamos as

concentrações plasmáticas de leptina e FFA. Também foram avaliadas a expressão de TNF nos sítios adiposos.

- Avaliar a participação da IL-18 no remodelamento do tecido adiposo induzido pela restrição alimentar decorrente da cirurgia bariátrica. Para isso, analisamos a expressão da IL-18 no oWAT e SAT de pacientes com obesidade grave e correlacionamos com marcadores antropométricos e metabólicos um ano após a cirurgia bariátrica.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Delineamentos experimentais

4.1.1 Modelos animais

Esse trabalho é composto por 5 delineamentos experimentais realizados em modelos experimentais e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais com os números de protocolo 16/2020 (Anexo A) e 22/2023 (Anexo B). Animais entre 24 e 30 semanas de idade foram alocados em caixas com até 6 animais em um ambiente com a temperatura à 28°C, com ciclo de luz/escuro de 12 horas (7:00-19:00) no biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Os camundongos WT (*The Jackson Laboratory*) foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais. Já os camundongos TNFR1^{-/-} e IL-18^{-/-} foram obtidos do Laboratório de Gnotobiologia e Imunologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais.

O primeiro delineamento experimental utilizou animais WT e TNFR1^{-/-} que foram pareados conforme o peso corporal e posteriormente divididos nos grupos: (I) camundongos WT submetidos a retirada da dieta por 3h, grupo controle (*Wild Type* ctl); (II) camundongos WT submetidos ao jejum por 24h (*Wild Type* 24h); (III) camundongos TNFR1^{-/-} submetidos a retirada da dieta por 3h, grupo controle (TNFR1^{-/-} ctl); (IV) camundongos TNFR1^{-/-} submetidos ao jejum por 24h (TNFR1^{-/-} 24h). Trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa demonstrou que no estado pós-prandial ocorre aumento da inflamação no tecido adiposo e no fígado, mesmo de animais controles (RODRIGUES et al., 2014). Assim, para evitar essa resposta em animais controles a dieta foi retirada por 3h entre o começo e a primeira hora do ciclo claro (ZT0 e ZT1). Além disso, o protocolo de jejum de 24h foi iniciado entre a segunda e terceira hora do ciclo claro (ZT1 e o ZT3). Todos os animais tiveram livre acesso a água durante o período experimental.

Em um segundo *set* de experimentos foi incluído a análise do efeito de um jejum mais prolongado, ou seja, de 48h. Os animais foram pareados pelo peso corporal e divididos em grupos na seguinte forma: (I) camundongos WT submetidos a retirada da dieta por 3h, grupo controle (*Wild Type* ctl); (II) camundongos WT submetidos ao jejum por 24h (*Wild Type* 24h); (III) camundongos WT submetidos ao jejum por 48h (*Wild Type* 48h); (IV) camundongos TNFR1^{-/-} submetidos a retirada da dieta por 3h, grupo controle (TNFR1^{-/-} ctl); (V) camundongos TNFR1^{-/-} submetidos ao jejum por 24h (TNFR1^{-/-} 24h); camundongos TNFR1^{-/-} submetidos ao jejum por 48h (TNFR1^{-/-} 48h). Assim como no primeiro delineamento experimental a retirada da dieta ocorreu entre o começo e a primeira hora do ciclo claro (ZT0 e ZT1). Os protocolos de jejum de 24h e 48h começaram entre a segunda e

terceira hora do ciclo claro o ZT1 e o ZT3. Além disso, todos os animais tiveram livre acesso a água durante o período experimental.

Para confirmar os achados dos delineamentos 1 realizamos um segundo delineamento experimental que consistiu em tratar camundongos WT e TNFR1^{-/-} com uma injeção intraperitoneal do agonista do receptor β 3-AR, CL316,243 (Sigma Aldrich, San Luis, Missouri, EUA, C5976-5MG) na dose de 1 mg/kg ou no volume correspondente de PBS 1x estéril. O tratamento aconteceu entre a segunda e a terceira hora do ciclo claro (ZT2-ZT3) e os animais foram divididos nos seguintes grupos: (I) animais selvagens tratados com PBS (*Wild Type* PBS); (II) animais selvagens tratados com CL316,243 (*Wild Type* CL316); (III) animais knockout para o receptor 1 do TNF tratados com PBS (TNFR1^{-/-} PBS); (IV) animais knockout para o receptor 1 do TNF tratados com CL316,243 (TNFR1^{-/-} CL316). Os animais foram eutanasiados após 24h do tratamento para analisarmos não somente a mobilização de gordura induzida pelo agonista, mas também a resposta inflamatória no WAT induzida pelo CL316,243. Durante o tratamento os camundongos tiveram livre acesso à água e comida.

A fim de comprovar os dados obtidos com os animais TNFR1^{-/-} tratamos camundongos machos C57BL/6J com uma injeção intraperitoneal de infliximab (Merk, Darmstadt, Alemanha, Y0002047) na dose de 10 mg/kg (DI PAOLA et al., 2013) ou PBS 1x estéril em volume equivalente entre a primeira e a terceira hora do ciclo claro (ZT1–ZT3). Uma segunda dose de infliximab ou PBS 1x estéril foi injetada nos animais após 24h de jejum entre o ZT1 e ZT3. Os animais completaram 48h de jejum e foram então eutanasiados. Os animais do grupo controle receberam uma injeção intraperitoneal de PBS 1x estéril e a dieta foi retirada por 3h no ZT0. Os grupos foram divididos da seguinte maneira: (I) camundongos tratados com PBS e submetidos a 3h de retirada da dieta (PBS ctl); (II) camundongos tratados com PBS e submetidos a 48h de jejum (PBS 48h); (III) camundongos tratados com infliximab e submetidos a 48h de jejum (Infliximab 48h). Durante todo o protocolo experimental os camundongos tiveram livre acesso a água.

Como último delineamento experimental utilizamos animais WT e IL-18^{-/-} pareados conforme o peso corporal e posteriormente divididos nos grupos: (I) camundongos WT submetidos a retirada da dieta por 3h, grupo controle (*Wild Type* ctl); (II) camundongos WT submetidos ao jejum por 24h (*Wild Type* 24h); (III) camundongos IL-18^{-/-} submetidos a retirada da dieta por 3h, grupo controle (IL-18^{-/-} ctl); (IV) camundongos IL-18^{-/-} submetidos ao jejum por 24h (IL-18^{-/-} 24h). O protocolo de jejum de 24h foi iniciado entre a segunda e terceira hora do ciclo claro (ZT1 e o ZT3) e a retirada da

dieta aconteceu entre o começo e a primeira hora do ciclo claro (ZT0 e ZT1). Todos os animais tiveram livre acesso a água durante todo o período experimental.

os camundongos foram pesados no começo e ao final dos tratamentos. Ao término eles foram anestesiados com injeção intraperitoneal na dose de 12,5ml/kg de solução de cloridrato de xilasina e cloridrato de ketamina diluídos em NaCl 0,9% e posteriormente mortos por exsanguinação. Foram coletados o sangue para coleta do soro, os tecidos adiposos eWAT, mesentérico (mWAT), retroperitoneal (rWAT) e iWAT. Todos os tecidos foram pesados, sendo que, foram utilizados o peso dos tecidos eWAT, mWAT e rWAT, juntamente com o peso corporal, para o cálculo do índice de adiposidade visceral. Todas as amostras foram armazenadas em freezer -80°C, exceto porções do eWAT e iWAT que foram também armazenadas em solução de formol a 10% para análises histológicas.

4.1.2 Análises em humanos

Pacientes participantes da coorte BARICAN foram recrutados e acompanhados no Departamento de Nutrição do Hospital Pitié-Salpêtrière (Paris, França). Essa coorte é aprovada pela CNIL (Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés; No. 1222666), bem como pelo Ministério da Pesquisa da França. Os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido para fazer parte de vários estudos registrados na plataforma <https://clinicaltrials.gov> (P050318 Les Comités de Protection des Personnes (CPP) aprovação: 24 de novembro de 2006, NCT01655017, NCT01454232). Todos os pacientes atendem às indicações padrão para cirurgia bariátrica e são monitorados de acordo com as diretrizes nacionais e internacionais.

As amostras dos tecidos adiposos omental (oWAT) e subcutâneo (sWAT) foram coletadas durante a cirurgia bariátrica e posteriormente armazenadas em freezer -80°C. Os dados antropométricos foram mensurados pela técnica de absorciometria de raios-x de dupla energia (DEXA) do corpo inteiro com feixe de leque (software Hologic Discovery W, versão 12.6; Hologic Inc). O sangue foi coletado após jejum noturno de 12h e foi analisado no soro, por meio de ensaios colorimétrico, a glicemia, a insulinemia e a hemoglobina glicada (HbA1c).

4.2 Dosagens Sorológicas

Glicemia de jejum, colesterol total, triglicérides, foram dosados por meio de kits enzimáticos (Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brasil). A quantificação da leptina foi determinada pelo ensaio de ELISA, conforme as instruções do fabricante (R & D Systems Europe Ltd., Abington, Reino Unido).

4.3 Lâminas histológicas

Porções do eWAT e do iWAT foram fixadas por 72h com formol a 4% tamponado, e adicionadas à álcool 70% por 24h. Ao término deste período, as amostras foram submetidas à desidratação realizada em concentrações crescentes de álcool (70%, 80%, 90% e absoluto I, II e III) permanecendo por 30 minutos em cada solução. Posteriormente, foi realizada a diafanização. Os tecidos foram banhados em xilol durante 1 hora. Os tecidos foram impregnados com parafina durante 1 hora e incluídos na mesma. Os blocos de parafina, contendo os tecidos adiposos incluídos, foram cortados a 5 μm por meio da microtomia. As colorações com H&E (Hematoxilina-Eosina) foram utilizadas para avaliação morfológica.

4.4 Morfometria do tecido adiposo

Imagens de seis campos dos eWAT e iWAT de cada animal foram capturadas usando uma câmera digital acoplada ao microscópio (200x). A área de 50 células foi medida em cada animal usando o software ImageJ (Instituto Nacional de Saúde, Bethesda, Maryland, EUA) para calcular a área de cada adipócito (μm^2). Posteriormente, foi calculado a média da área de adipócitos de cada animal. Os valores das áreas dos adipócitos também foram utilizados para avaliar a distribuição no tamanho dos adipócitos. Os valores de tamanho escolhidos para a análise da distribuição foram a partir de $100\mu\text{m}^2$ até valores maiores que $5000\mu\text{m}^2$.

4.5 Lipólise *ex vivo*

Porções dos eWAT e iWAT de camundongos C57BL/6J foram pesados, cortados grosseiramente e incubados com meio de cultura DMEM, sem fenol vermelho, em placas de cultura. Primeiramente, as amostras foram tratadas com $2\mu\text{g/mL}$ (DE LA CÁMARA et al., 2014) de infliximab (Merk, Darmstadt, Alemanha, Y0002047) ou PBS estéril no volume equivalente, por 24h. Após esse período, as amostras foram estimuladas ou não CL316,243 na dose de 10^{-5} por 90 minutos. Ao término do tempo do estímulo com o CL316,243, o meio de cultura e os fragmentos de WAT foram coletados e armazenados para posterior quantificação de glicerol e avaliação de expressão de genes por PCR em tempo real (qPCR), respectivamente. A avaliação do glicerol secretado pelos fragmentos de WAT foi feita com o kit *Glycerol assay kit* (Sigma Aldrich, San Luis, Missouri, EUA, MAK117), conforme as instruções do fabricante.

4.6 Imunofluorescência

Cortes de eWAT e iWAT embebidos em parafina e em lâminas polarizadas foram desparafinizados com duas soluções de xilol por 5 minutos cada e hidratadas com soluções de álcool nas concentrações de 100%, 95%, 75% e 30% por 6 minutos cada. Posteriormente, as amostras passaram por recuperação de antígeno em solução de citrato com pH 6 por 20 minutos em banho

maria. Ao término desse período os cortes foram circulados com caneta hidrofóbica e incubados com solução de peróxido de hidrogênio na concentração de 3% por 1 hora e posteriormente lavados 3 vezes com PBS 1x estéril por 10 minutos. Assim, as amostras foram então incubadas com solução de bloqueio na concentração de 10% de soro de cabra por 1 hora. As amostras foram incubadas *overnight* em câmara úmida a 4°C com o anticorpo primário para tirosina hidroxilase ou para β 3-AR (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, EUA). Ambos os anticorpos foram diluídos na solução de bloqueio na concentração de 1:200. No dia seguinte os cortes foram lavados 3 vezes com PBS 1x estéril por 10 minutos e então incubados com solução de avidina por 10 minutos e posteriormente solução de biotina por 10 minutos para o bloqueio de biotina endógena. Ao término desse período as amostras foram incubadas por 1 hora com o anticorpo secundário *anti-rabbit* diluído na solução de bloqueio na concentração de 1:200.

Os cortes histológicos foram lavados 3 vezes com PBS 1x estéril por 10 minutos e incubados por 1 hora com solução de estreptavidina fornecida pelo kit Tyramide super bust (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, EUA). Com o término da incubação das amostras com a estreptavidina elas foram lavadas 3 vezes com PBS 1x estéril por 10 minutos e incubadas por 10 minutos com o reagente *tyramide working solution* fornecida pelo kit Tyramide super bust (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, EUA) esse reagente contém o fluorófilo ALEXA 647 e a incubação dele com as amostras gera uma reação que foi terminada com a solução de parada também fornecida pelo kit Tyramide super bust (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, EUA). Mais uma vez, os cortes foram lavados 3 vezes com PBS 1x estéril por 10 minutos e então as lâminas foram montadas com o meio de montagem Fluoromount-G com DAPI (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, EUA) e seladas com esmalte.

4.7 Quantificação da intensidade de fluorescência

Cinco campos aleatórios de cada amostra foram fotografados no aumento de 200x no microscópio Apotome 2 (Zeiss, Alemanha) do Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI) da UFMG. Os canais utilizados foram Alexa 647, DAPI e FITC. O canal FITC foi escolhido para identificar a estrutura do tecido adiposo que possui autofluorescência no espectro de onda verde. As imagens foram analisadas com o auxílio do software ImageJ (Instituto Nacional de Saúde, Bethesda, Maryland, EUA) por avaliador mascarado para os grupos experimentais. Primeiramente, os canais das imagens foram separados e apenas as imagens com o canal do ALEXA 647 foi mensurado a intensidade de fluorescência. Os parâmetros utilizados foram densidade integrada e média de valor cinza. Assim, com o auxílio da ferramenta um quadrado foi selecionado apenas áreas

marcadas pelo ALEXA 647. O valor do background de cada imagem também foi mensurado. Ao término da quantificação os valores mensurados do ALEXA 647 eram subtraídos do valor do background e então foi calculado a média dos valores para cada campo.

4.8 Citometria de fluxo

Porções do eWAT e do iWAT foram coletadas e incubadas a 37°C sob agitação por 1h com solução de digestão contendo DMEM, albumina sérica bovina (1%), HEPES (10mM) e colagenase A (1mg/ml, Roche). Ao término do tempo de incubação as amostras foram totalmente dissociadas com o auxílio de uma seringa de 10ml e agulha de 40 x 12mm e posteriormente filtradas com filtro 100 µm com solução de PBS contendo albumina sérica bovina (1%) e EDTA (0,5%). O sobrenadante foi removido com bomba a vácuo para eliminar os adipócitos. Já a fração do estroma vascular foi marcada com os seguintes anticorpos acoplados com fluoróforo: CD45, Singlec F, CD64 e TIM4 (BD Biosciences). As amostras foram analisadas no citometro BD LSRFortessa™ (BD Biosciences) e analisadas no software FlowJo (Tree Star).

4.9 Expressão de genes por PCR em tempo real

O RNA total das amostras de tecido adiposo de camundongos e humanos foi extraído conforme o kit Aurum Total RNA Fatty and Fibrous Tissue KIT (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Esse RNA foi utilizado para confecção da fita de DNA complementar (cDNA) com o auxílio do kit iScript cDNA Synthesis (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). A medida do PCR em tempo real foi realizada por meio de um sistema de detecção de sequência ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems, Warrington, UK) com SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, UK). Os níveis relativos de expressão genética foram determinados pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ usando os respectivos grupos controle, para amostras de camundongos. Já para as amostras de humanos foi realizado uma média dos valores. Para a normalização avaliou-se a expressão dos genes 18s e RPLP0 e foi escolhido o gene que não variava entre os grupos experimentais. Os primers utilizados assim como suas sequências são apresentados na tabela 1:

Tabela 1. Sequência dos primers utilizados para avaliação de expressão gênica por RT-PCR.

GENE	FOWARD	REVERSE
<i>18S</i>	CGATGCTCTTAGCTGAGTGT	GGTCCAAGAATTTACCTCT
<i>RPLP0</i>	ACAGGGCGACCTGGAAGT	GGATCTGCTGCATCTGCTT
<i>LIPE</i>	AGCGCTGGAGGAGTGT TTT	CCGCTCTCCAGTTGAACC
<i>PNPLA2</i>	GAGCTTCGCGTCACCAAC	CACATCTCTCGGAGGACCA
<i>TNF</i>	GTAGCCACGTCGTAGCAAAC	AGTTGGTTGTCTTTGAGATCCATG
<i>IL-6</i>	GCTACCAAACCTGGATATAATCAGG	CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGAA

<i>IL-10</i>	CCCTGCTTGCACATCTCTC	CCCTGCTTGCACATCTCTC
<i>IL-18</i>	AACCTCCAGCATCAGGACAAAG	TTTCCTTGAAGTTGACGCAAGA
<i>I8s humano</i>	CGATGCTCTTAGCTGAGTGT	GGTCCAAGAATTTACCTCT
<i>RPLP0 humano</i>	ACAGGGCGACCTGGAAGT	GGATCTGCTGCATCTGCTT
<i>TNFR1 humano</i>	TCCTTCACCGCTTCAGAAA	GGGATAAAAGGCAAAGACCAA
<i>LIPE humano</i>	CGCTGGAGGAGTGCTTCTT	TTCGTTCCCCTGTTGAGC
<i>PNPLA2 humano</i>	CTCCACCAACATCCACGAG	CCCTGCTTGCACATCTCTC
<i>Leptina humano</i>	TTGTCACCAGGATCAATGACA	GTCCAAACCGGTGACTTTCT
<i>Adiponectina humano</i>	AGAGATGGCACCCCTGGT	CACCGATGTCTCCCTTAGGA

4.10 Análise estatística

As comparações estatísticas para amostras paramétricas entre os vários grupos foram feitas por ANOVA “two way” com pós teste de Tukey, já para as comparações entre dois grupos foi realizado o teste T de Student. Para amostras não paramétricas foi-se realizado o teste de Krukall Will para comparações entre vários grupos. Já para comparações entre dois grupos foi-se realizado o teste de Mann Whitney. Os dados de humanos passaram pelo teste correlação de Spearman. Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão médio. Para a realização de todas as análises e montagem dos gráficos dos dados de camundongos foi utilizado o software GraphPad PRISM, GraphPad software Inc. (San Diego, CA, USA). Já para a análise dados e confecção de matrizes de correlação com dados de humanos foi utilizado os pacotes Hmisc(JR, 2024) e corrplot(“GitHub - taiyun/corrplot: A visual exploratory tool on correlation matrix”, [s.d.]) do software R. Studio. As ilustrações foram feitas com o auxílio do site smartsevier.com, licenciado pelo CC BY 4.0.

5 RESULTADOS

5.1 A sinalização via TNFR1 é importante para redução do tecido adiposo induzida pelo jejum em camundongos.

Camundongos WT submetidos ao jejum de 24h apresentam redução de aproximadamente 22% no peso dos tecidos adiposos epididimal e inguinal (Figuras 1A e 1B), acompanhado do aumento da expressão de TNF em ambos os depósitos de gordura (Figuras 1C e 1D).

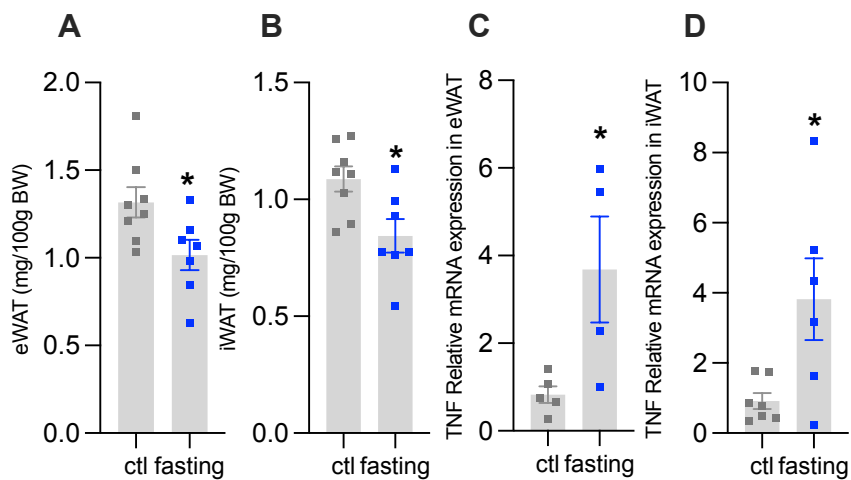


Figura 1. O desafio do jejum de 24h reduz a adiposidade ao mesmo tempo que aumenta a expressão de TNF no WAT. Camundongos WT foram submetidos (fasting) ou não (ctl) ao jejum de 24h. Peso dos tecidos eWAT (A) e iWAT (B). Expressão de TNF no eWAT (C) iWAT (D). Os gráficos representam os valores médios \pm erro padrão da média (SEM), $n=4-8$. $p < 0,05$ representado por * se refere diferença estatística entre o protocolo de jejum e controle.

Dado a evidência de que o jejum aumenta a expressão de TNF tanto no eWAT como no iWAT, decidimos investigar o papel dessa citocina na perda de gordura corporal utilizando um modelo de camundongo deficiente na sinalização de TNF, o knockout para o receptor 1 do TNF, i.e., TNFR1^{-/-}. Como esperado, camundongos WT submetidos ao jejum de 24 horas apresentaram redução no peso corporal (Figura 2A) e no índice de adiposidade (Figura 2B). Curiosamente, camundongos TNFR1^{-/-} não apresentaram redução no peso corporal e índice de adiposidade após 24 horas de jejum. Ambas as linhagens submetidas a jejum apresentaram baixas concentrações circulantes de leptina (Figura 2C).

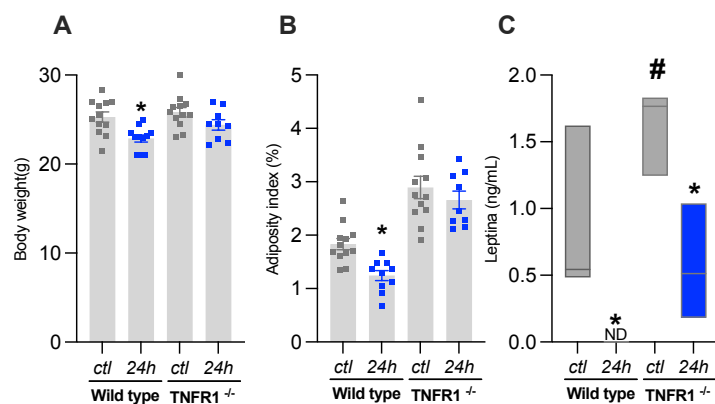


Figura 2. Camundongos TNFR1 são resistentes a perda de peso e adiposidade visceral induzida pelo jejum. Camundongos WT e TNFR1^{-/-} foram submetidos (24h) ou não (ctl) ao jejum de 24h. Peso corporal (A), índice de adiposidade visceral (B) e concentrações plasmáticas de leptina (C). Os gráficos representam os valores médios ± erro padrão da média (SEM), n= 4-8. p < 0,05 representado por * se refere diferença estatística entre o protocolo de jejum vs controle e p < 0,05 representado por # se refere a diferença entre linhagens.

Camundongos WT submetidos ao desafio do jejum de 24h apresentaram redução do peso dos tecidos e da média das áreas dos adipócitos dos tecidos eWAT e iWAT (Figuras 3A, 3B, 3E e 3F). O eWAT apresentou tendência ($p=0,06$) de aumento no percentual de adipócitos com $2000\mu\text{m}^2$, adipócitos de tamanho intermediário (Figura 3C). Já o iWAT dos camundongos WT submetidos ao jejum apresentou maior percentual de adipócitos menores (Figura 3G). Em contraste, camundongos $\text{TNFR1}^{-/-}$ submetidos as mesmas 24 horas de jejum foram resistentes à redução do peso, da média da área dos adipócitos e da frequência de adipócitos menores no eWAT e iWAT (Figuras 3A, 3B, 3C, 3E, 3F e 3G). As imagens representativas das lâminas histológicas são apresentadas nas Figuras 3D e 3H.

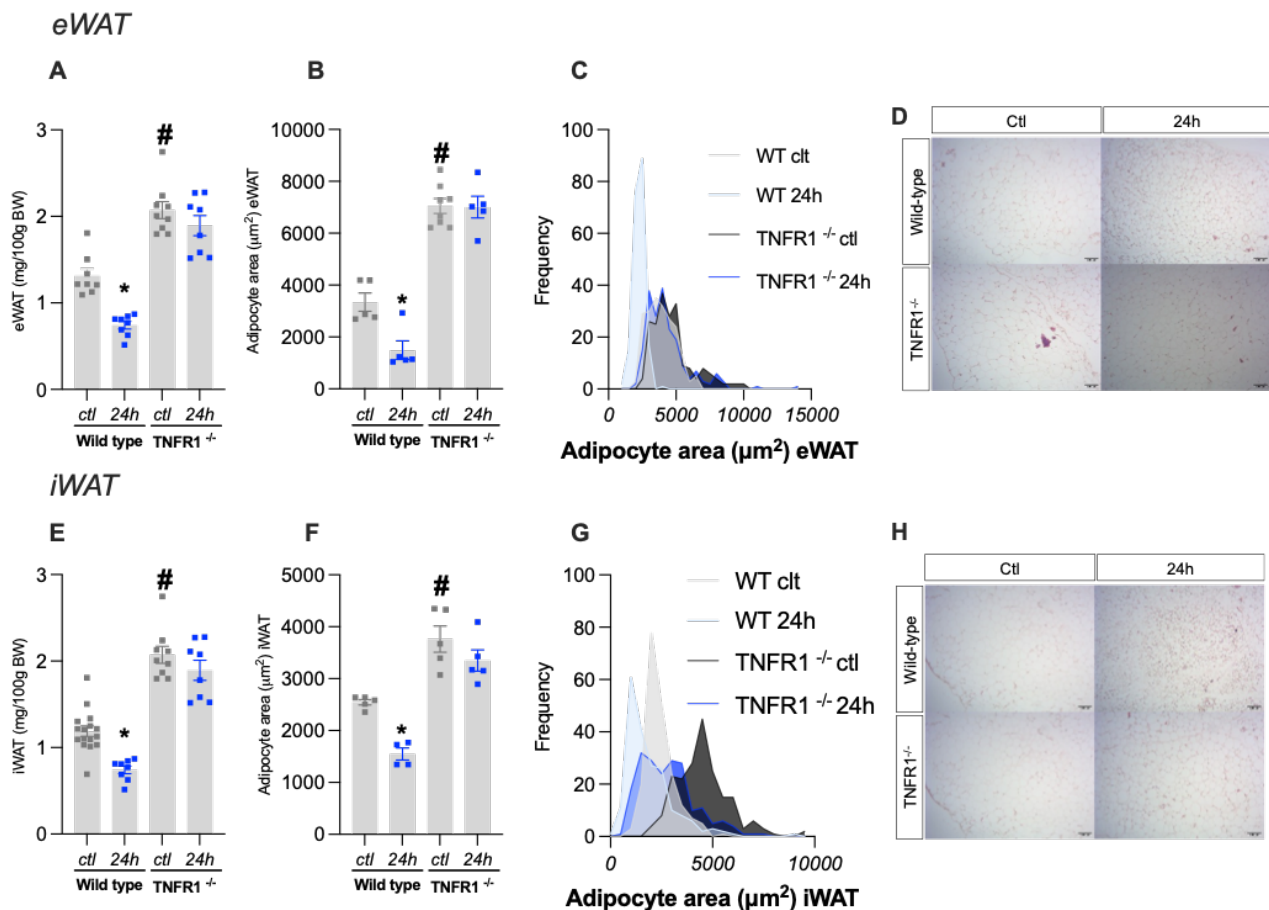


Figura 3. Participação do TNFR1 na redução de adiposidade e na biometria de adipócitos induzida pelo jejum. Camundongos WT e $\text{TNFR1}^{-/-}$ foram submetidos (24h) ou não (ctl) ao jejum de 24h. As figuras A-D referem-se às análises do eWAT, incluindo: peso do tecido (A), área de adipócitos (B), distribuição da área de adipócitos (C), imagens de cortes histológicos representativos (D). As figuras E-H referem-se às análises do iWAT, incluindo peso do tecido (E), área de adipócitos (F), distribuição da área de adipócitos (G) e imagens de cortes histológicos representativas (H). Os gráficos representam os valores médios \pm erro padrão a média (SEM), $n = 4-8$. $p < 0,05$ representado por * se refere diferença estatística entre o protocolo de jejum vs controle e $p < 0,05$ representado por # se refere a diferença entre linhagens.

Diante da resistência para a perda de adiposidade evidenciada nos camundongos $TNFR1^{-/-}$ quando submetidos ao jejum, avaliamos marcadores chaves do processo lipolítico. Observamos que ambas as linhagens submetidas ao jejum aumentam os níveis séricos de FFA (Figura 4A). No eWAT, a expressão das principais lipases dos adipócitos, ATGL e HSL, não alteraram (Figuras 4B e 4C) tanto nos animais selvagens como nos deficientes para o $TNFR1$. No entanto, o iWAT dos camundongos WT submetidos ao jejum apresentou aumento a expressão das lipases, algo que não aconteceu nos camundongos $TNFR1^{-/-}$ submetidos ao mesmo protocolo de jejum (Figuras 4D e 4E). Esses dados fortalecem a evidência de que o $TNFR1$ parece ser importante para o gatilho lipolítico induzido pelo jejum, principalmente do sítio subcutâneo.

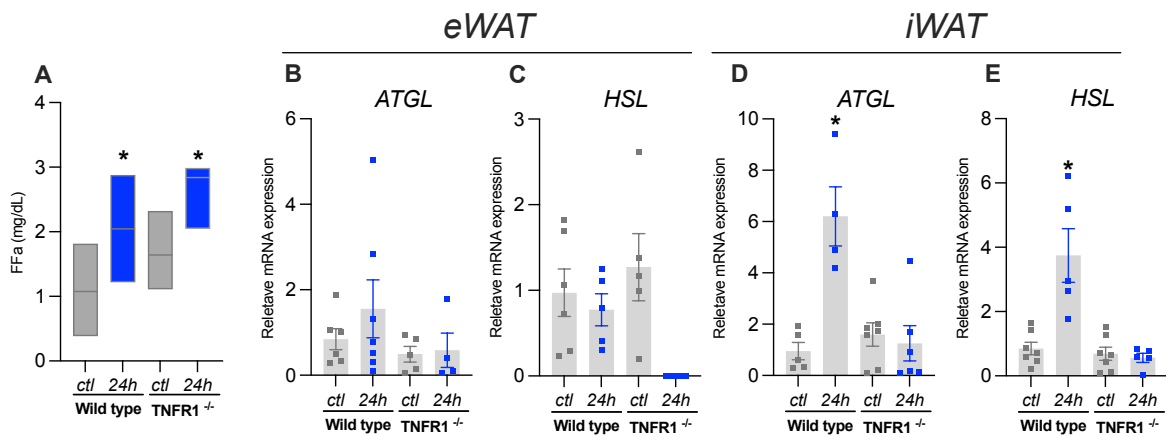


Figura 4. Participação da sinalização do TNF no processo lipolítico. Camundongos WT e $TNFR1^{-/-}$ foram submetidos (24h) ou não (ctl) ao jejum de 24h. Concentrações plasmáticas de FFA(A), expressão da ATGL (B) e (D); HSL (C) e (E) no eWAT e no iWAT, respectivamente. Os gráficos representam os valores médios \pm erro padrão a média (SEM), $n=4-8$. $p < 0,05$ representado por * se refere diferença estatística entre o protocolo de jejum vs controle e $p < 0,05$ representado por # se refere a diferença entre linhagens.

A análise da expressão de citocinas demonstrou que camundongos WT submetidos ao jejum de 24 horas apresentam maior expressão de IL-6 (Figuras 5A e 5D) e IL-18 (Figuras 5B e 5E) nos tecidos eWAT e iWAT. Além disso, a IL-10 (Figuras 5F) apresentou-se também aumentada no iWAT de camundongos WT submetidos ao jejum. Curiosamente, a expressão dessas citocinas no tecido adiposo de camundongos TNFR1^{-/-} não alteraram após o jejum, exceto a expressão de IL-10 que se apresentou ainda menor nos animais TNFR1^{-/-} (Figuras 5C e 5F).

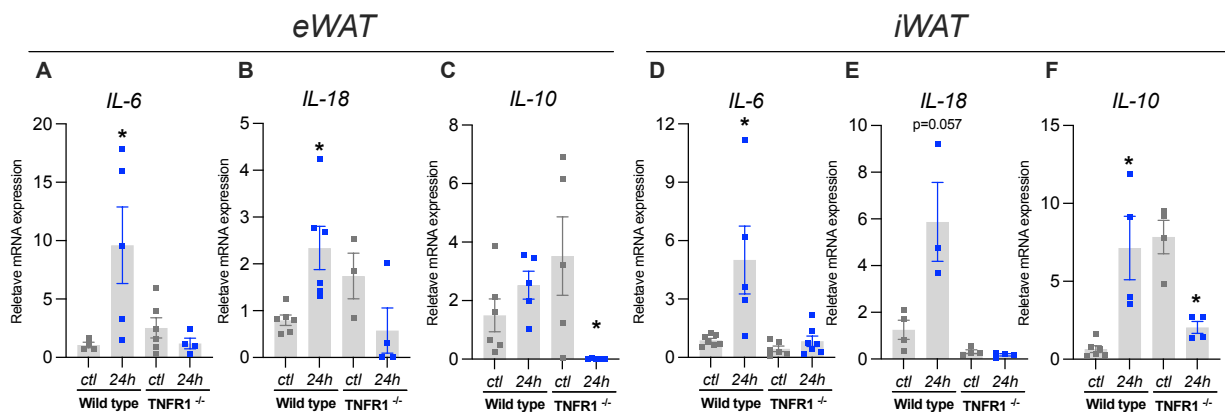


Figura 5. Participação da sinalização do TNF na expressão de citocinas induzidas pelo jejum. Camundongos WT e TNFR1^{-/-} foram submetidos (24h) ou não (ctl) ao jejum de 24h. As figuras A-C se referem a expressão de citocinas no eWAT, incluindo: IL-6(A) IL-18, (B) e IL-10 (C). As figuras D-F se referem a expressão de citocinas no iWAT, incluindo: IL-6(D) IL-18, (E) e IL-10 (F). Os gráficos representam os valores médios \pm erro padrão a média (SEM), n= 3-8. $p < 0,05$ representado por * se refere diferença estatística entre o protocolo de jejum vs controle e $p < 0,05$ representado por # se refere a diferença entre linhagens.

Devido à falta de responsividade dos camundongos $TNFR1^{-/-}$ ao desafio do jejum de 24h decidimos ampliar o tempo de jejum para 48h a fim de verificar se, mesmo com a extensão do período de jejum, os animais *knockout* ainda manteriam a resistência à perda de adiposidade. O peso corporal de camundongos WT e $TNFR1^{-/-}$ diminuiu após 48 horas de jejum (Figura 6A). Entretanto, apenas os animais WT, após 48h de jejum, apresentaram menor índice de adiposidade (Figura 6B). Apesar disso, ambas as linhagens apresentaram níveis elevados de FFA após o jejum de 48h (Figura 6C).

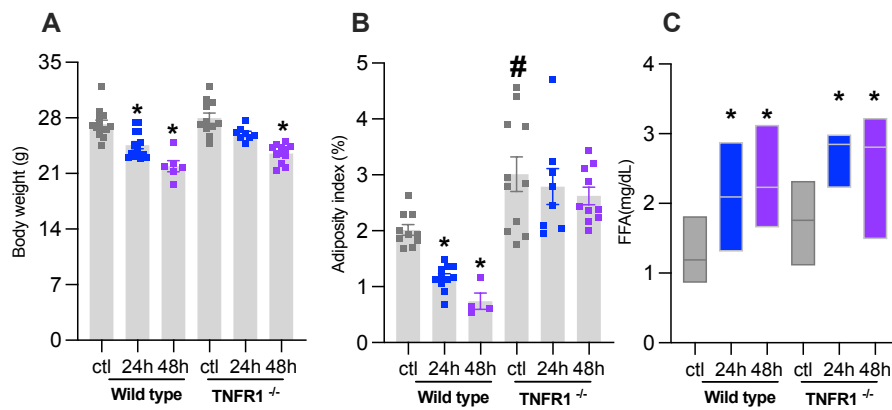


Figura 6. Camundongos com ausência de sinalização do TNF são resistentes a perda de peso corporal e adiposidade induzida pelo jejum de 48h. Camundongos WT e $TNFR1^{-/-}$ foram submetidos ou não (ctl) ao jejum de 24h ou 48h. Peso corporal (A), índice de adiposidade (B) e concentrações séricas de FFA (C). Os gráficos representam os valores médios \pm erro padrão a média (SEM), $n=4-8$. $p < 0,05$ representado por * se refere diferença estatística entre o protocolo de jejum vs controle e $p < 0,05$ representado por # se refere a diferença entre linhagens.

O aumento do tempo de jejum nos animais WT intensificou a redução do peso e da área média de adipócitos dos tecidos eWAT e iWAT (Figuras 7A, 7B, 7D, 7E). Claramente, o jejum de 48h nos camundongos WT aumentou a porcentagem de adipócitos menores (Figuras 7C e 7F). Por outro lado, o jejum de 48h nos camundongos TNFR1^{-/-} não induziu a perda de adiposidade no sítio visceral e subcutâneo (Figuras 7A, 7B, 7D, 7E), apesar de aumentar o percentual de adipócitos menores no eWAT (Figura 7C).

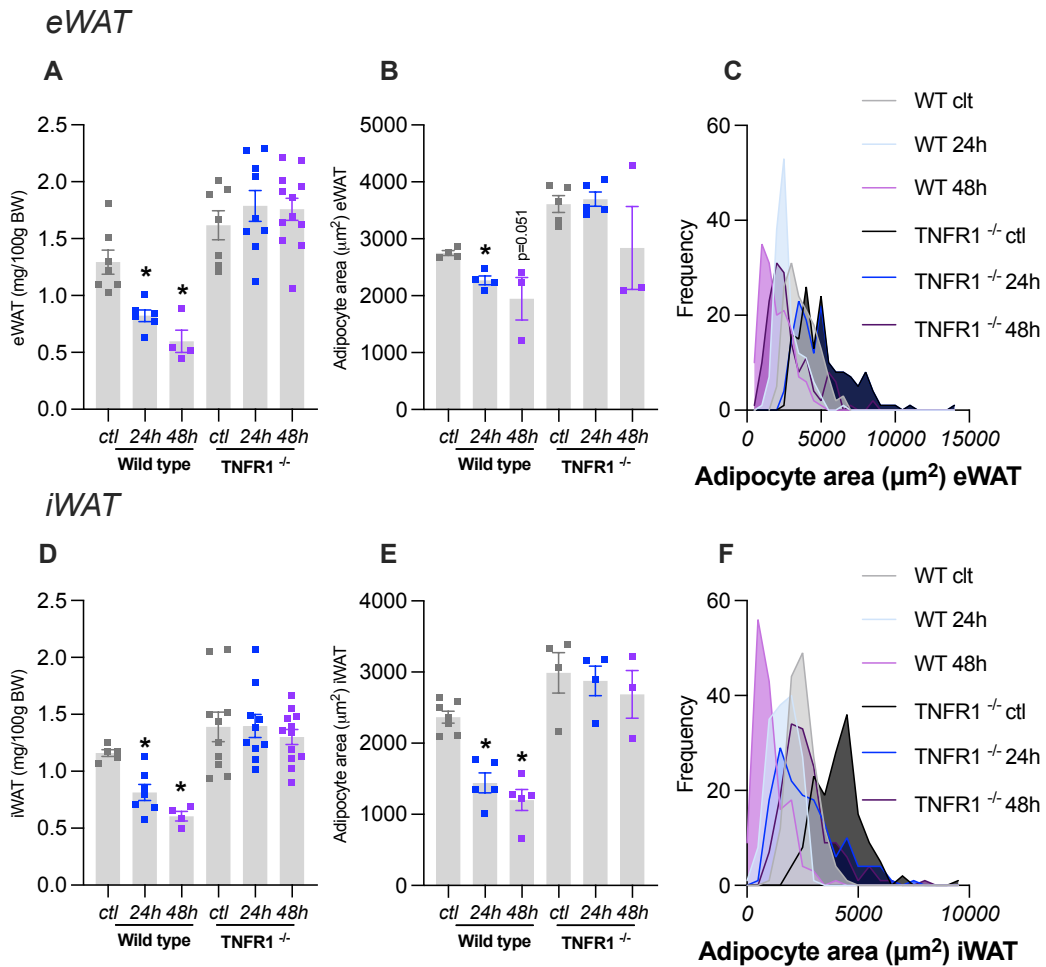


Figura 7. Camundongos com ausência de sinalização do TNF são resistentes a redução do peso dos tecidos eWAT e iWAT induzida pelo jejum de 48h. Camundongos WT e TNFR1^{-/-} foram submetidos ou não (ctl) ao jejum de 24h ou 48h. As figuras A-C referem-se às análises do eWAT, incluindo: Peso do tecido (A), área de adipócitos(B), distribuição da área de adipócitos (C) e imagens de cortes histológicos representativos (D). As figuras D-F referem-se às análises do iWAT, incluindo: peso do tecido(E), área de adipócitos(F), distribuição da área de adipócitos (G) e imagens de cortes histológicos representativas(H). Os gráficos representam os valores médios ± erro padrão a média (SEM), n= 4-8. p < 0,05 representado por * se refere diferença estatística entre o protocolo de jejum vs controle e p < 0,05 representado por # se refere a diferença entre linhagens.

Não observamos diferença na intensidade de fluorescência da tirosina hidroxilase no eWAT dos camundongos WT quando submetidos ao jejum. Curiosamente, camundongos TNFR1^{-/-} apresentaram maior intensidade de fluorescência de tirosina hidroxilase no eWAT em comparação aos animais selvagens (Figura 8A e 8B), sem efeito aparente determinado pelo jejum. No sítio subcutâneo de ambas as linhagens submetidas ao jejum foi identificado o aumento da intensidade de fluorescência da tirosina hidroxilase (Figura 8C). As imagens representativas são apresentadas nas figuras 8 B e 8D.

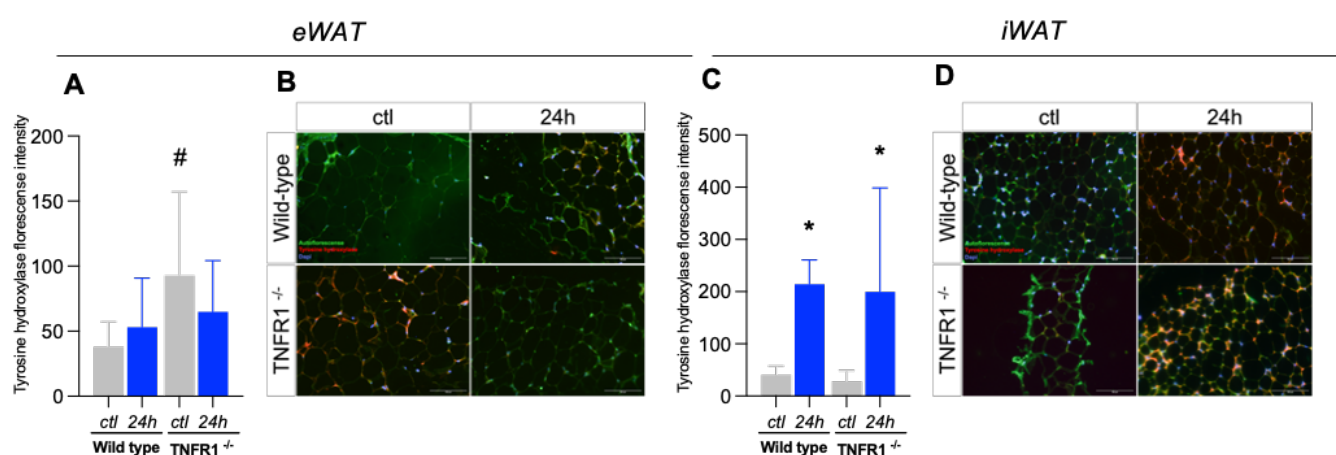


Figura 8. Jejum e ausência de sinalização do TNF modulam o conteúdo de tirosina hidroxilase no tecido adiposo. Os camundongos WT e TNFR1^{-/-} foram submetidos ao não (ctl) ao jejum de 24h. As figuras A e B referem-se às análises do eWAT, incluindo: Intensidade de fluorescência de tirosina hidroxilase (A) e imagem representativa de lâminas de imunofluorescência (B). As figuras C e D referem-se às análises do iWAT, incluindo: Intensidade de fluorescência de tirosina hidroxilase (C) e imagem representativa de lâminas de imunofluorescência (D). Os gráficos representam os valores médios ± erro padrão a média (SEM), n= 2-4. p < 0,05 representado por * se refere a diferença estatística entre CL316,243 vs PBS e p < 0,05 representado por # se refere a diferença entre linhagens.

Camundongos selvagens submetidos ao jejum de 24h apresentaram maior intensidade de fluorescência do $\beta 3$ -AR no tecido adiposo epididimal (Figura 9A e 9B) e subcutâneo (Figura 9C e 9D) em relação aos animais WT controle. Houve aumento da intensidade de fluorescência do $\beta 3$ -AR no sítio visceral de camundongos $TNFR1^{-/-}$ em comparação aos animais WT do grupo controle. Sob o estímulo do jejum, o grupo $TNFR1^{-/-}$ 24h apresentou menor intensidade de fluorescência de $\beta 3$ -AR em relação aos camundongos $TNFR1^{-/-}$ controle (Figura 9A). No tecido adiposo subcutâneo a intensidade de fluorescência de $\beta 3$ -AR manteve-se inalterada em camundongos $TNFR1^{-/-}$ submetidos ao jejum (Figura 9C). As imagens representativas das lâminas de imunofluorescência são apresentadas nas figuras 9B e 9D.

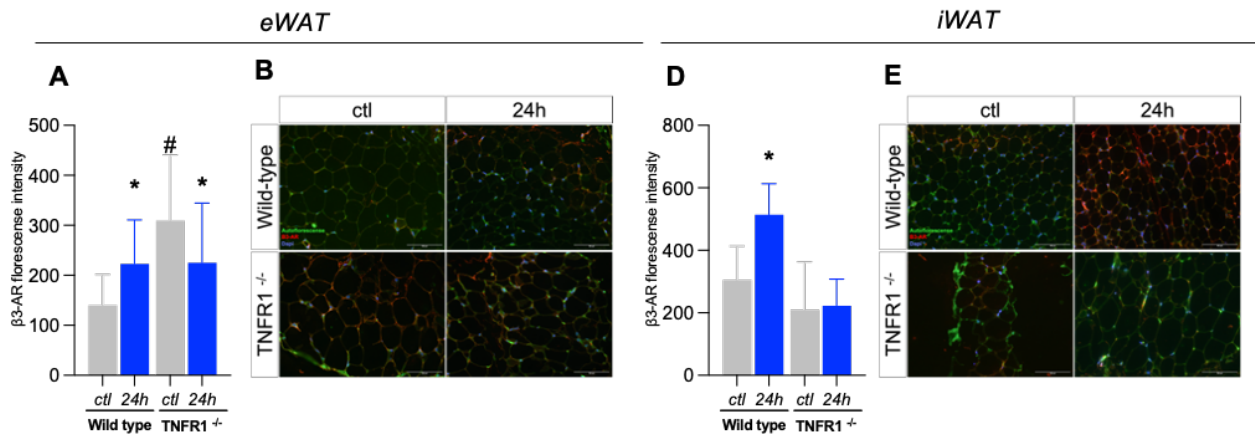


Figura 9. Ausência de sinalização do TNF o altera o conteúdo de $\beta 3$ -AR no tecido adiposo. Os camundongos WT e $TNFR1^{-/-}$ foram submetidos ao não (ctl) ao jejum de 24h. As figuras A e B referem-se às análises do eWAT, incluindo: Intensidade de fluorescência de $\beta 3$ -AR (A) e imagem representativa de lâminas de imunofluorescência (B). As figuras C e D referem-se às análises do iWAT, incluindo: Intensidade de fluorescência de $\beta 3$ -AR (C) e imagem representativa de lâminas de imunofluorescência (D). Os gráficos representam os valores médios \pm erro padrão a média (SEM), $n = 2-4$. $p < 0,05$ representado por * se refere a diferença estatística entre CL316,243 vs PBS e $p < 0,05$ representado por # se refere a diferença entre linhagens.

5.2 A via do TNF participa da redução do tecido adiposo induzida por CL316,243.

Os resultados obtidos a partir dos experimentos que utilizaram da estratégia do jejum como indutor do remodelamento do tecido adiposo, evidenciam a participação da via do TNF no remodelamento do tecido adiposo *in vivo*. Para melhor compreender, utilizamos também uma estratégia farmacológica que mimetiza a sinalização simpática por meio do tratamento com CL316,243, um agonista do β 3-AR. Realizamos um experimento *ex vivo* onde fragmentos dos tecidos eWAT e iWAT foram incubados com CL316,243 e com o inibidor do TNF, o infliximab. Tanto os fragmentos do eWAT quanto de iWAT estimulados com o CL316,243 apresentaram maiores concentrações de glicerol no meio de cultura em comparação aos fragmentos de tecidos adiposos não estimulados (Figuras 10A e 10F). O tratamento com infliximab inibiu a lipólise estimulada pelo CL316,243 apenas no sítio subcutâneo (Figura 10A e 10F). Os fragmentos de eWAT e iWAT estimulados com o CL316,243 apresentaram aumento na expressão de TNF e IL-6. Por outro lado, os fragmentos de eWAT tratados com infliximab e estimulados com o CL316,243 não apresentaram esse aumento (Figuras 10B e 10C). O iWAT tratado com infliximab e estimulados com CL316,243 apresentou aumento na expressão de IL-6, mas não na expressão de TNF (Figuras 10G e 10H). O estímulo com o CL316,243 em ambos os sítios de tecidos adiposos não alterou a expressão de IL-18 (Figuras 10D e 10I) e de IL-10 (Figuras 10E e 10H). Da mesma forma, o tratamento com infliximab não repercutiu em alteração na expressão dessas citocinas.

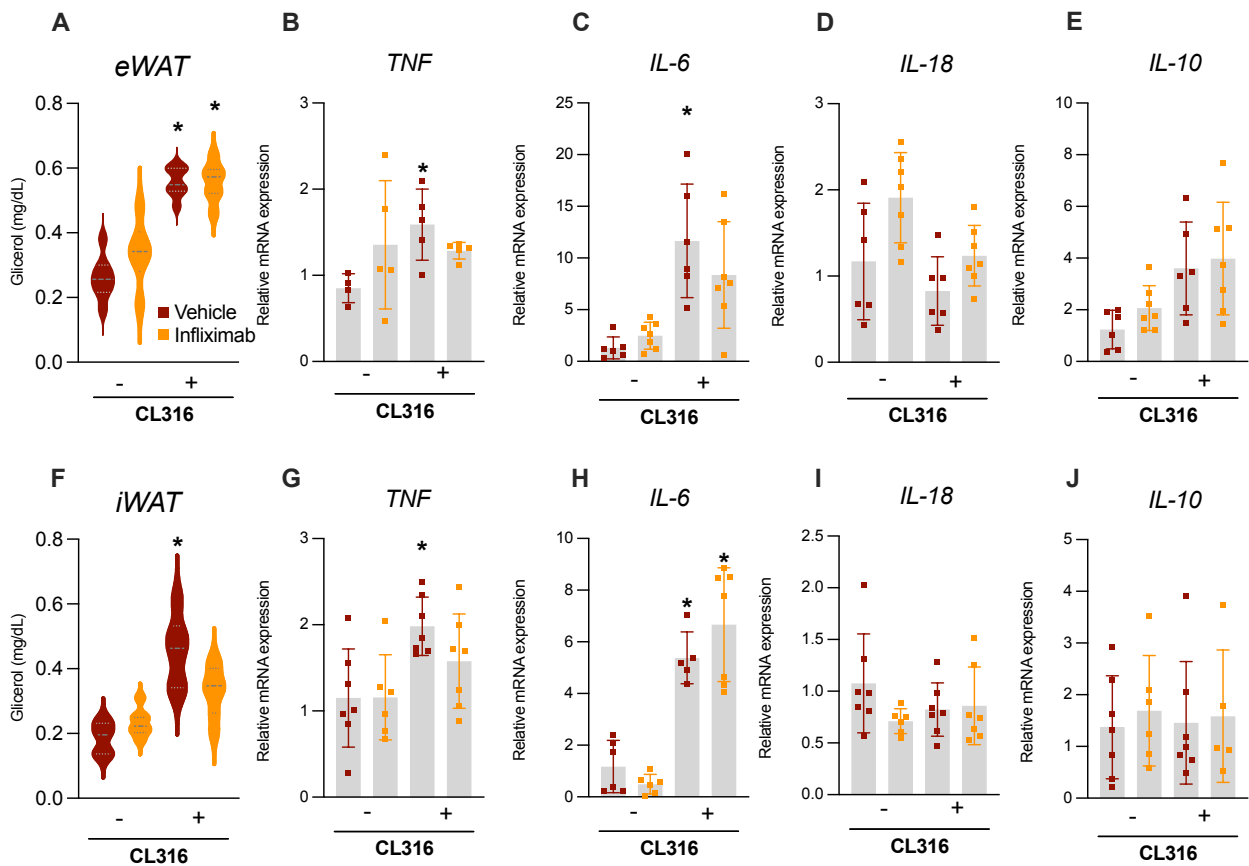


Figura 10. Experimento *ex vivo* para avaliar o efeito do CL316,243 e o inibidor do TNF na mobilização de gordura e expressão de citocinas. Os fragmentos de eWAT e iWAT foram tratados com infliximab ou veículo e estimulados (+) ou não (-) com CL316,243. As figuras A-E referem-se às análises do eWAT, incluindo: concentrações de glicerol em meio de cultura(A), expressão de TNF (B), IL-6 (C), IL-18 (D) e IL-10 (E). As figuras F-J referem-se às análises do iWAT, incluindo: concentrações de glicerol em meio de cultura(F), expressão de TNF (G), IL-6 (H), IL-18 (I) e IL-10(J). Os gráficos representam os valores médios \pm erro padrão a média (SEM), n= 4-8. $p < 0,05$ representado por * se refere a diferença estatística entre basal (-) vs estimulado pelo CL316,243 (+) e $p < 0,05$ representado por # se refere a diferença entre veículo e infliximab.

Baseado nas evidências do experimento *ex vivo* decidimos avaliar *in vivo* o papel do TNF na redução de adiposidade induzida pelo CL316,243. Para isso tratamos camundongos WT e TNFR1^{-/-} com CL316,243 ou PBS. Os animais WT tratados com o agonista β 3-AR apresentaram redução peso (Figura 11A) e na área dos adipócitos (Figura 10B) do eWAT. Houve aumento na frequência de adipócitos menores no eWAT de camundongos (Figura 11C). Já no sítio subcutâneo dos camundongos WT tratados com o agonista de β 3-AR, o peso do tecido apresentou tendência de redução (p= 0,0510) e a área dos adipócitos diminuiu (Figuras 11D e 11E) sem alterar a frequência no tamanho das células adiposas (Figura 11F). Em contraste, os camundongos TNFR1^{-/-} tratados com CL316,243 foram resistentes à redução, tanto relativo ao peso como da área de adipócitos dos tecidos eWAT e iWAT (Figuras 11A, 11B, 11C, 11E, 11F e 11G).

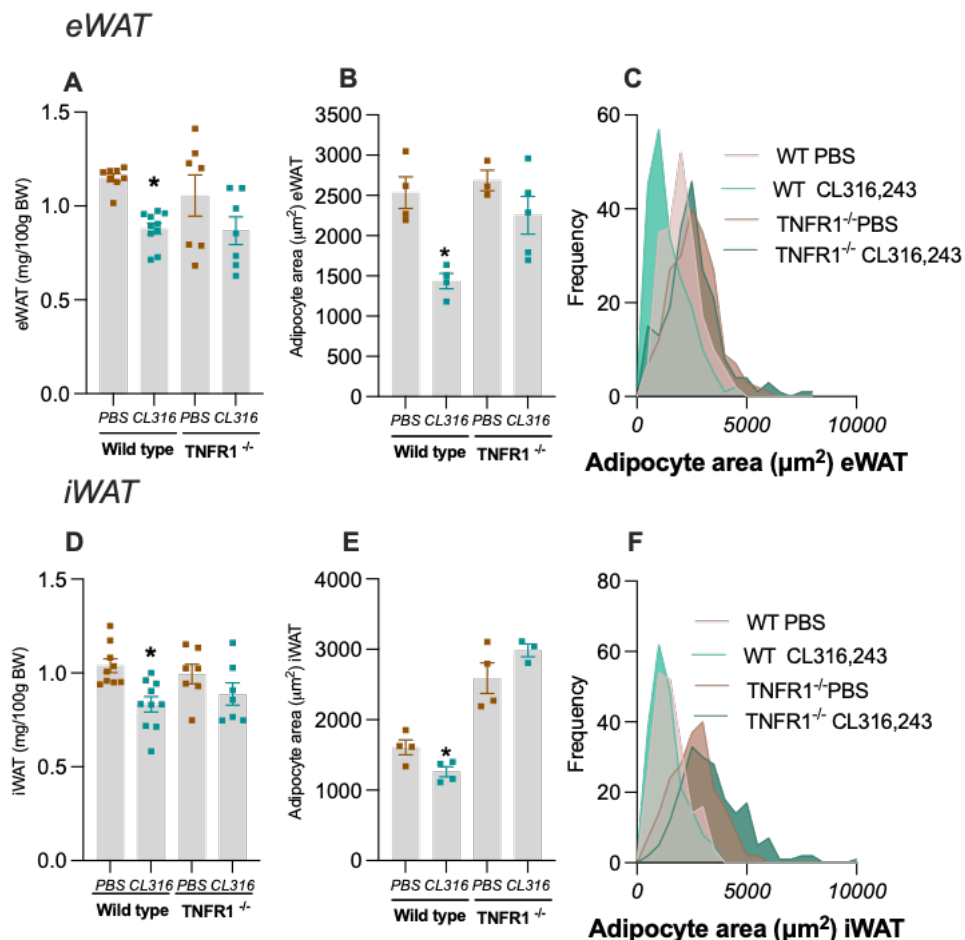


Figura 11. Ausência de sinalização do TNF inibe a redução do eWAT e iWAT induzida pelo tratamento com o CL316,243. Os camundongos WT e TNFR1^{-/-} foram tratados com PBS ou CL316,243. As figuras A-C referem-se às análises do eWAT, incluindo: peso do tecido (A), área de adipócitos (B), distribuição da área de adipócitos (C). As figuras D-F referem-se às análises do iWAT, incluindo peso do tecido (D), área de adipócitos (E), distribuição da área de adipócitos (F). Os gráficos representam os valores médios \pm erro padrão a média (SEM), n= 4-8. P < 0,05 representado por * se refere a diferença estatística entre CL316,243 vs PBS e p < 0,05 representado por # se refere a diferença entre linhagens.

Os camundongos WT tratados com CL316,243 não apresentaram aumento na expressão de TNF no eWAT (Figura 12A), mas apresentaram aumento dessa citocina no sítio iWAT (Figura 13E). A maior expressão de IL-6 foi observada tanto no sítio visceral (Figura 12B) como no subcutâneo (Figura 12F). Camundongos TNFR1^{-/-} não responderam ao estímulo com CL316,243 na expressão de IL-6 em ambos os tecidos adiposos (Figuras 12B e 12F). Não observamos diferença estatística entre os grupos experimentais na expressão de IL-18 (Figuras 12C e 12G) e IL-10 (Figuras 12D e 12H).

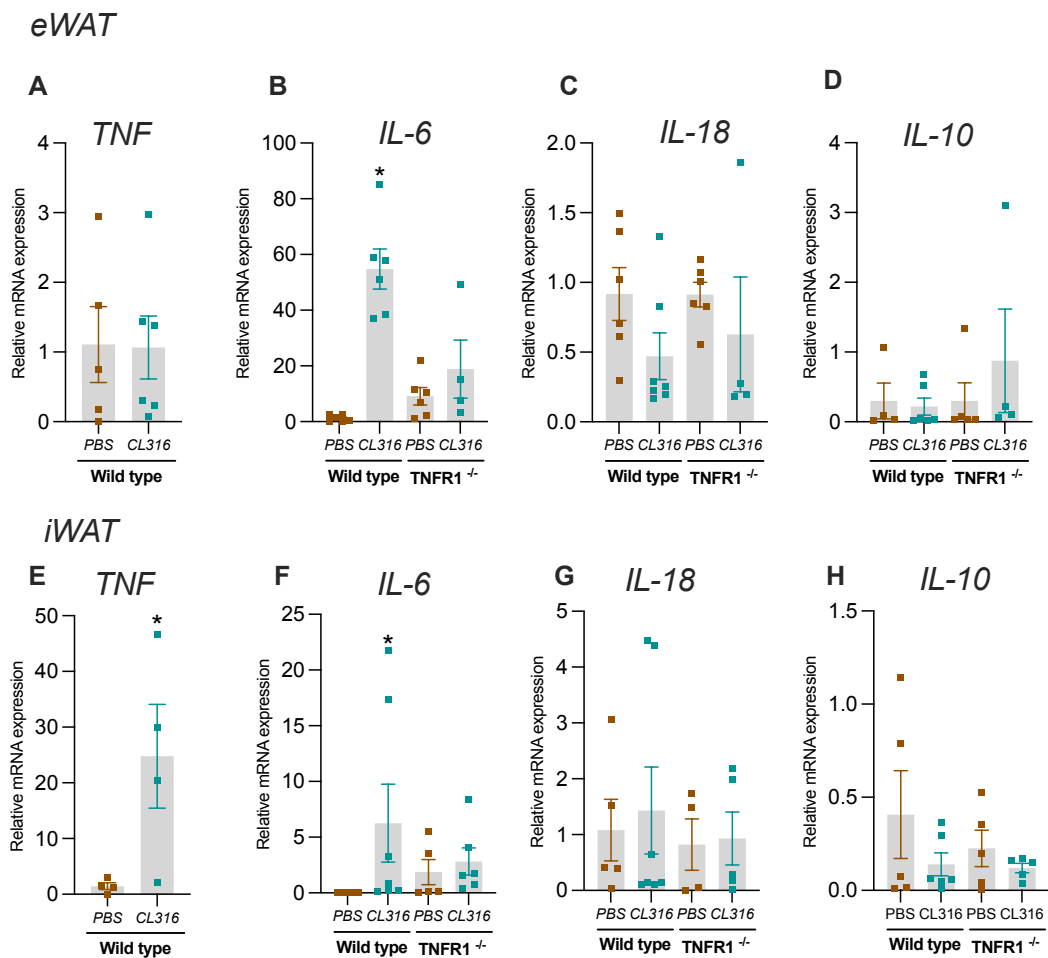


Figura 12. Ausência de sinalização do TNF inibe a expressão de IL-6 induzidas pelo tratamento com o CL316,243. Os camundongos WT e TNFR1^{-/-} foram tratados com PBS ou CL316,243. Expressão no eWAT de TNF(A), IL-6(B), IL-18 (C) e IL-10 (D) e expressão no iWAT de TNF(E), IL-6(F), IL-18 (G) e IL-10(H). Os gráficos representam os valores médios \pm erro padrão a média (SEM), n= 4-8. p < 0,05 representado por * se refere a diferença estatística entre CL316,243 vs PBS e p < 0,05 representado por # se refere a diferença entre linhagens.

5.3 O tratamento com anti-TNF, infliximab, inibe a redução de adiposidade induzida pelo jejum e diminui o número de macrófagos residentes no tecido.

Com o objetivo de confirmar os achados evidenciados nos animais com deleção para o TNFR1 e verificar algumas populações celulares no WAT de animais submetidos ao jejum, utilizamos de outra estratégia experimental, dessa vez, farmacológica. Assim, tratamos camundongos C57Bl/6 com o anti-TNF, infliximab e o submetemos ao jejum de 48h. Como esperado, os camundongos tratados com PBS e submetidos ao jejum de 48h reduziram o peso dos tecidos eWAT e iWAT (Figuras 13A e 13F). Por outro lado, os animais tratados com infliximab permaneceram resistentes a redução de adiposidade induzida pelo jejum (Figuras 13A e 13F). Não observamos alterações nas populações de eosinófilos (Figura 13B), macrófagos totais (Figura 13C), macrófagos residentes (Figura 13D) ou macrófagos recrutados no eWAT (Figura 13E), tanto no contexto do jejum de 48h como decorrente do tratamento com anti-TNF. Por outro lado, no sítio inguinal observamos que camundongos desafiados com jejum apresentam redução no número de eosinófilos (Figura 13G), o que não foi revertido pelo tratamento com anti-TNF. Além disso, nesse sítio observamos aumento no número de macrófagos residentes (Figura 13I) e tendência de aumento no número de macrófagos recrutados (Figura 13J) induzido pelo jejum. Os camundongos tratados com infliximab não alteraram o número de macrófagos totais ou residentes (Figura 13I e 13J).

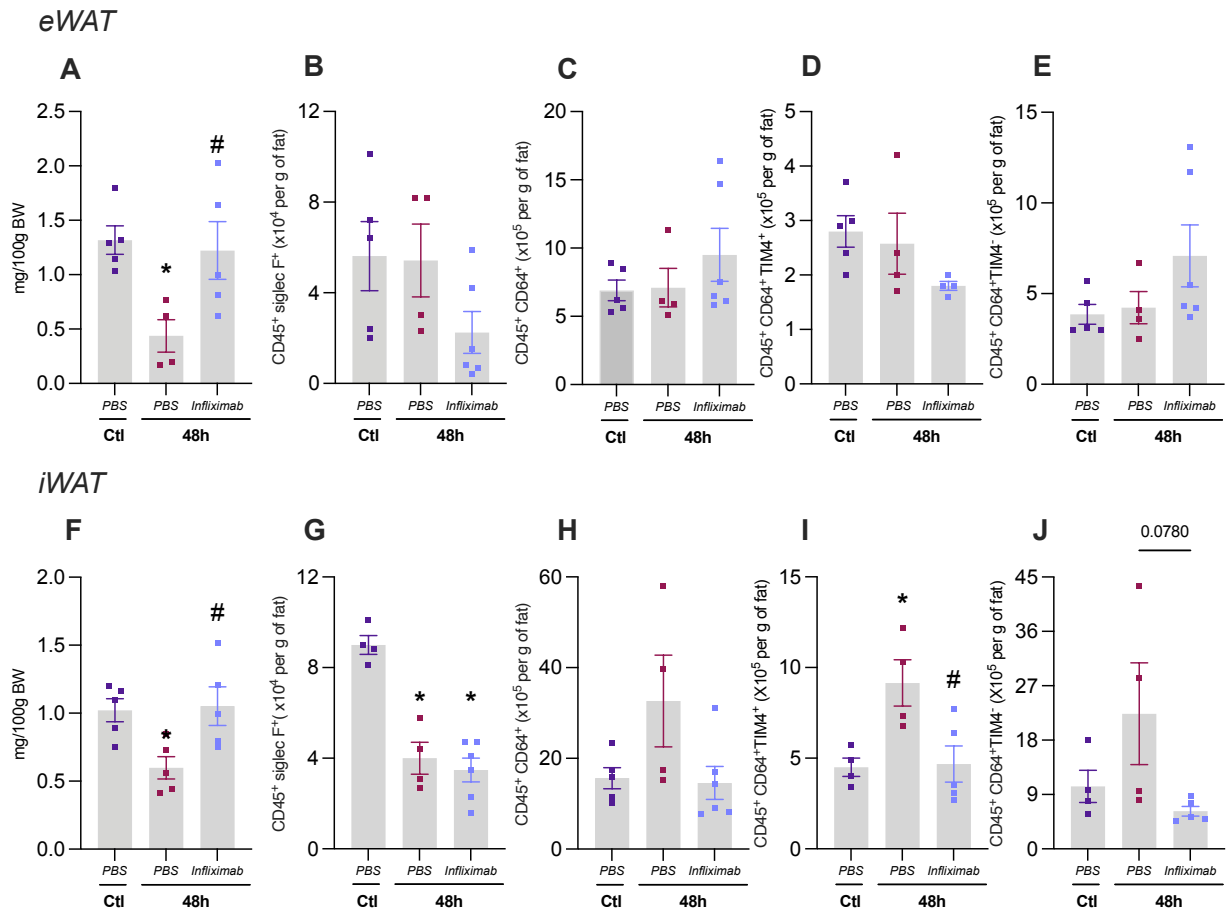


Figura 13. Tratamento com anti-TNF inibe a redução de adiposidade e o número de macrófagos residentes induzido pelo jejum. Os camundongos C57BL/6 foram tratados com PBS ou infliximab e submetidos (48h) ou não (ctl) ao jejum de 48h. As figuras A-E referem-se às análises do eWAT, incluindo: Peso do tecido(A), eosinófilos(B), macrófagos totais (C) e macrófagos residentes (D) e macrófagos recrutados(E). As figuras F-J referem-se às análises do iWAT, incluindo: peso do tecido (F), eosinófilos (G), macrófagos totais (H), macrófagos residentes(I) e macrófagos recrutados (J). Os gráficos representam os valores médios \pm erro padrão a média (SEM), n= 4-8. P < 0,05 representado por * se refere a diferença estatística entre jejum vs controle e p < 0,05 representado por # se refere a diferença entre PBS e infliximab.

5.4 Maior expressão do TNFR1 correlaciona com maior expressão de lipases no tecido adiposo de humanos.

Avaliamos em 53 pacientes com obesidade grave, que foram submetidos à cirurgia bariátrica para perda de peso, as correlações entre a expressão do TNFR1 no oWAT e sWAT (prévio à cirurgia) com marcadores antropométricos antes e um ano após a cirurgia. A média de idade dos pacientes avaliados foi de $49,6 \pm 1,5$ anos e a maioria do sexo feminino (81%). A tabela 2 apresenta os dados clínicos e metabólicos dos pacientes pré e um ano após a cirurgia bariátrica. A intervenção cirúrgica reduziu o peso corporal, o IMC, a gordura corporal, a massa muscular, a glicemia e insulinemia de jejum e a HbA1c.

Tabela 2. Dados clínicos e metabólicos de pacientes com obesidade grave submetidos à cirurgia bariátrica.

Variáveis	Pré-cirurgia bariátrica	Pós 1 ano da cirurgia bariátrica	Valor de p
<i>Peso Corporal (Kg)</i>	$126,6 \pm 3,2$	$90,5 \pm 3,1$	< 0,0001
<i>IMC (kg/m²)</i>	$46,4 \pm 1,2$	$33,1 \pm 1,0$	< 0,0001
<i>Gordura Corporal (Kg)</i>	$60,3 \pm 2,0$	$37,2 \pm 2,3$	< 0,0001
<i>Massa Muscular (Kg)</i>	$62,4 \pm 2,1$	$54,1 \pm 2,0$	< 0,0001
<i>Glicose de jejum (mmol/l)</i>	$6,3 \pm 0,2$	$4,9 \pm 0,1$	< 0,0001
<i>Insulina de jejum (μUI/l)</i>	$21,2 \pm 2,2$	$8,3 \pm 0,7$	< 0,0001
<i>HbA1c (%)</i>	$6,05 \pm 0,1$	$5,4 \pm 0,1$	< 0,0001

P<0,0001 difere estatisticamente pelo teste de Mann-Whitney

Identificamos em tecidos adiposos de indivíduos com obesidade (amostras provenientes de um banco biológico do grupo de pesquisa da Dra. Karine Clement, da Universidade Pierre et Marie Curie, França, colaboradora desse trabalho) a correlação entre o TNFR1 e a expressão de lipases e citocinas. De forma consistente, verificamos que a expressão do TNFR1 no sWAT se correlaciona fortemente com a expressão da ATGL ($r=0,9143$), da HSL ($r=0,9991$), da adiponectina ($r=1$) e da leptina ($r=0,9999$), correlações essas não observadas no tecido adiposo visceral, o omental (Figura 14).

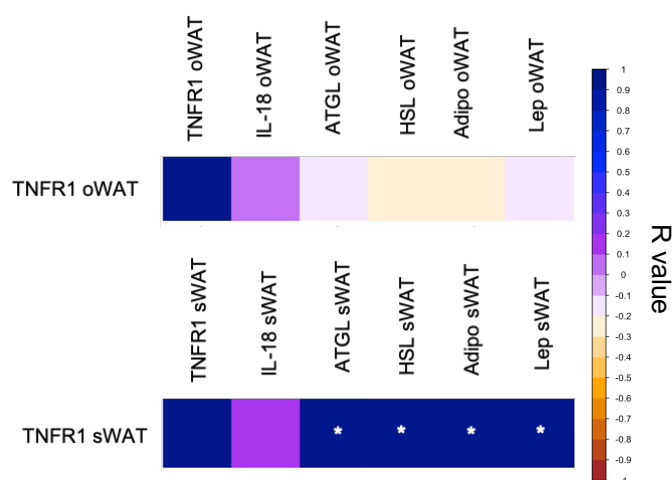


Figura 14. TNF se correlaciona com a expressão de lipases e adipocinas no WAT de indivíduos com obesidade. Matriz de correlação entre a expressão do TNF e a expressão das lipases ATGL e HSL, além das adiponectina e leptina nos tecidos adiposos omental (oWAT) e subcutâneo (sWAT) de humanos com obesidade grave, $n=53$. * refere-se a $P < 0,05$.

Não houve diferença estatística nas correlações da expressão do TNFR1 no oWAT e sWAT com IMC, peso corpora, gordura corporal, massa muscular e compartimentos de gordura visceral ou subcutânea antes e após a intervenção cirúrgica (Figura 15A). Como a via do TNF está relacionada com resistência à insulina na obesidade, também analisamos a correlação entre a expressão do TNFR1 no WAT com marcadores relacionados à resistência insulina. Não observamos nenhuma correlação estatística entre o TNFR1 e os marcadores de resistência à insulina avaliados um ano após cirurgia, que incluíram a glicemia, insulinemia e HbA1C (Figura 15B).

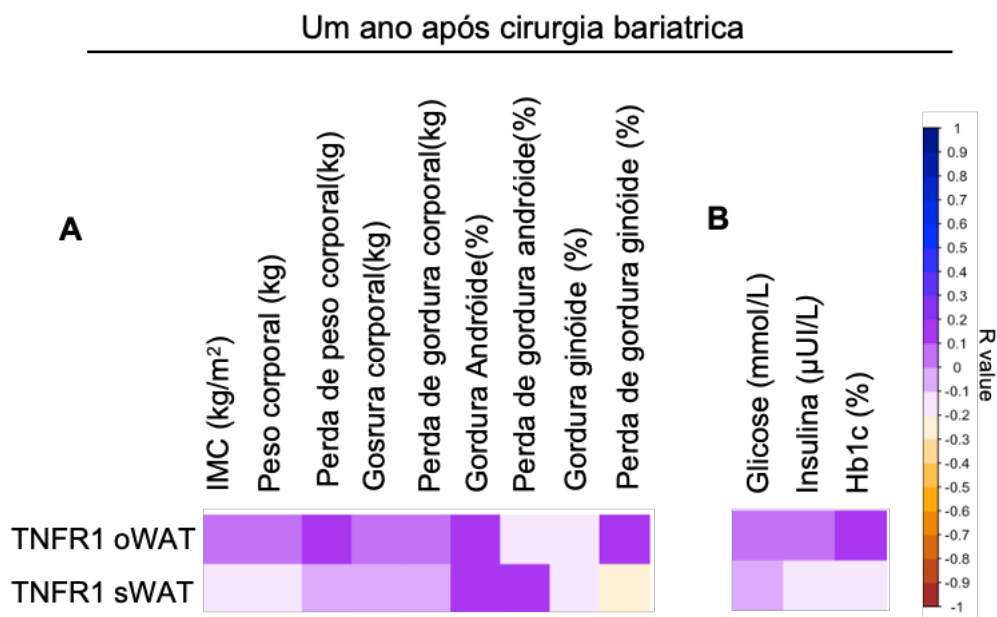


Figura 15. Expressão do TNFR1 em tecido adiposo de indivíduos com obesidade se correlaciona com perda de peso e gordura corporal após cirurgia bariátrica. Matriz de correlação de Spearman entre a expressão do TNFR1 no oWAT e no sWAT com IMC, peso corporal, perda de peso, gordura corporal, perda de peso, perda de massa muscular, e perda de massa muscular, percentual de gordura andróide, percentual de perda de gordura andróide, percentual de gordura ginoide e percentual de perda de gordura ginoide de pacientes com obesidade um ano após a cirurgia bariátrica (A). Matriz de correlação de Spearman entre a expressão do TNFR1 no oWAT no sWAT com glicemia, insulidemia e hemoglobina glicada de pacientes com obesidade um ano após a cirurgia bariátrica (B), n=53. * refere-se a $P < 0,05$.

5.5 A IL-18 não participa na redução do tecido adiposo induzida pelo déficit calórico

Nossos achados demonstraram que a IL-18 é uma citocina com expressão aumentada nos tecidos eWAT e iWAT de camundongos WT após o jejum (Figuras 5B e 5E). Assim, para determinar se a IL-18 é relevante para a perda do tecido adiposo induzida pelo jejum, submetemos camundongos knockout para a IL18, IL-18^{-/-}, a 24 horas de jejum. Esses animais apresentaram redução no peso corporal (Figura 16A), no índice de adiposidade (Figura 16B), no peso do eWAT (Figura 16C) e no peso do iWAT (Figura 16D) similar aos camundongos WT.

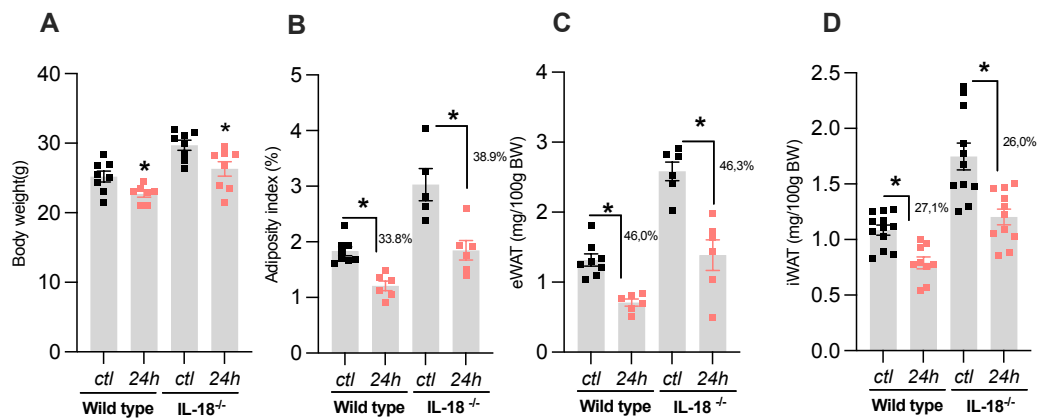


Figura 16. A IL-18 não participa na redução de adiposidade induzida pelo jejum. Os camundongos WT e IL-18^{-/-} foram submetidos ou não (ctl) ao jejum de 24h. Peso corporal(B), índice de adiposidade(C), peso do eWAT (E) e peso do iWAT. Os gráficos representam os valores médios \pm erro padrão a média (SEM), n=8. P < 0,05 representado por * se refere diferença estatística entre jejum vs controle e p < 0,05 representado por # se refere a diferença entre linhagens.

Assim como os camundongos WT, os animais knockouts para IL-18^{-/-} submetidos ao jejum também apresentaram redução na área de adipócitos do eWAT e iWAT (Figuras 17A e 17D). Camundongos knockouts para IL-18^{-/-} submetidos ao jejum apresentaram aumento na frequência de adipócitos menores no eWAT (Figura 17B), o que não foi observado no iWAT (Figura 17E). As imagens representativas das lâminas histológicas são apresentadas nas Figuras 17C e 17F.

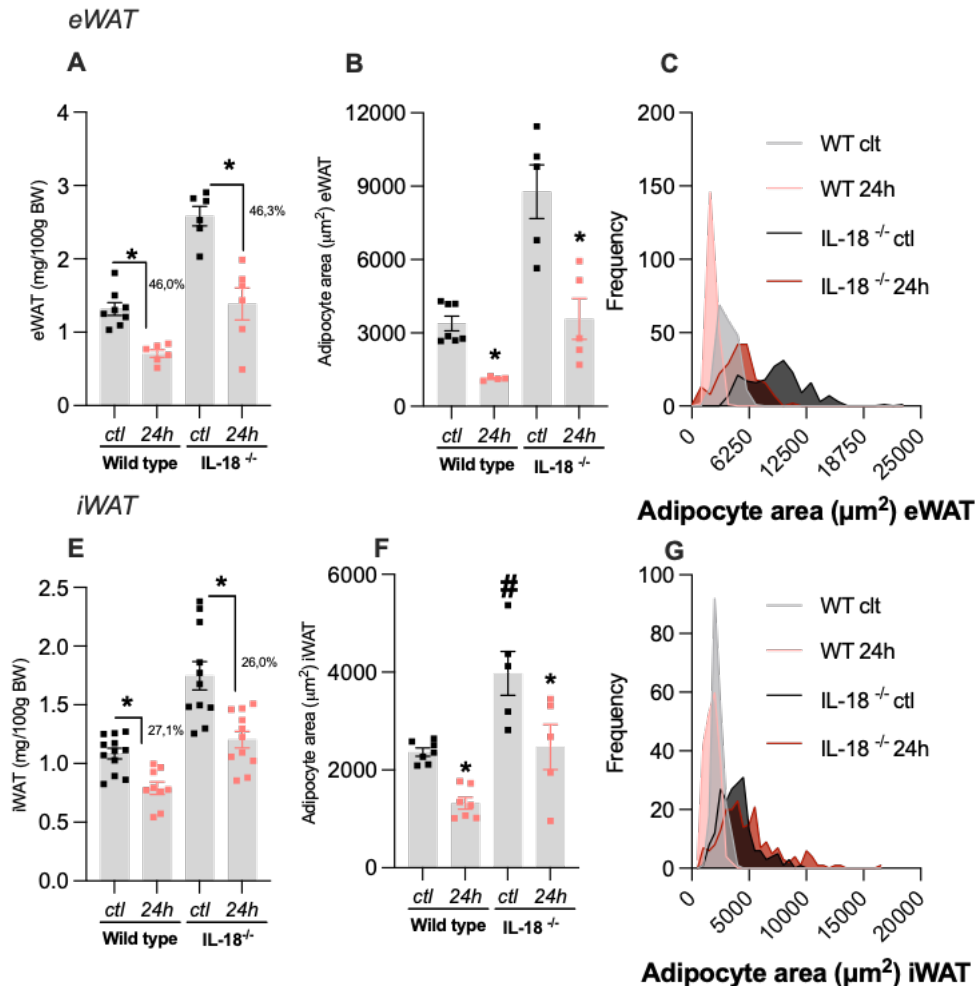


Figura 17. A IL-18 não participa da redução da área de adipócitos induzida pelo jejum. Os camundongos WT e IL-18^{-/-} foram submetidos (24h) ou não (ctl) ao jejum de 24h. As figuras A-C referem-se às análises do eWAT, incluindo: área de adipócitos (A), distribuição da área de adipócitos (B) e imagens de cortes histológicos representativos (C). As figuras D-F referem-se às análises do iWAT, incluindo: área de adipócitos (D), distribuição da área de adipócitos (E) e imagens de cortes histológicos representativos (F). Os gráficos representam os valores médios \pm erro padrão a média (SEM), n= 4-8. p < 0,05 representado por * se refere diferença estatística entre jejum vs controle e p < 0,05 representado por # se refere a diferença entre linhagens.

Camundongo IL-18^{-/-} submetidos ao jejum não aumentaram as concentrações séricas de FFA (Figura 18A), mas apresentaram redução nas concentrações séricas de leptina (Figura 18B), similar ao observado nos animais WT. Além disso, identificamos que os camundongos IL-18^{-/-} controle apresentam maior expressão de TNF no tecido visceral (Figura 18C) e subcutâneo (Figura 18D) entretanto, sem alteração desencadeada pelo jejum de 24h.

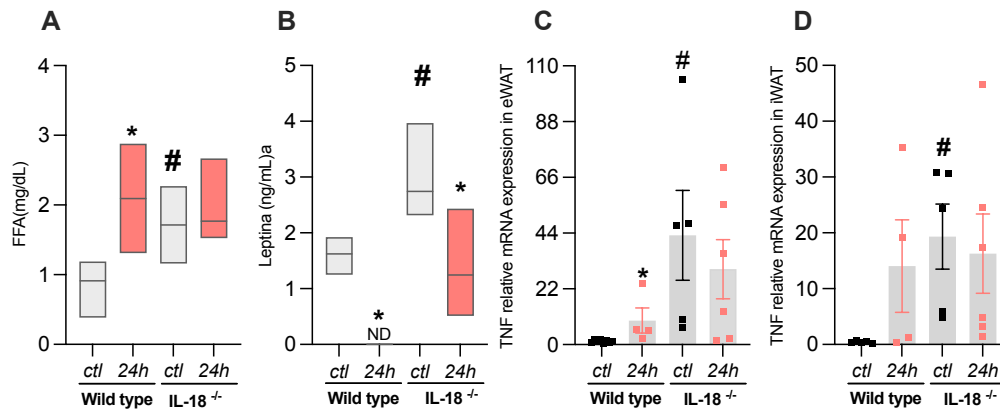


Figura 18. Concentrações séricas de FFA e leptina e expressão de TNF de camundongos IL-18^{-/-} submetidos ou não ao jejum. Os camundongos WT e IL-18^{-/-} foram submetidos ou não (ctl) ao jejum de 24h. Concentrações séricas de FFA(A) e leptina(B), expressão de TNF no eWAT(C) e iWAT (D). Os gráficos representam os valores médios ± erro padrão a média (SEM), n= 4-8. p < 0,05 representado por * se refere diferença estatística entre jejum vs controle e p < 0,05 representado por # se refere a diferença entre linhagens.

Adicionalmente, na mesma coorte de pacientes em que avaliamos a expressão de TNFR1 no oWAT e sWAT, analisamos as correlações entre a expressão da IL-18 com a expressão da ATGL, da HSL, da leptina e da adiponectina. A expressão da IL-18 no oWAT se correlaciona fortemente com a expressão da ATGL ($r=0,8884$), da HSL ($r=0,8887$), da adiponectina ($r=0,8857$) e da leptina ($r=0,8897$). No sítio subcutâneo a expressão da IL-18 se correlaciona com a expressão de ATGL, ($r=0,5523$), adiponectina ($r=0,9999$) e leptina ($r=0,9999$) (Figura 19).

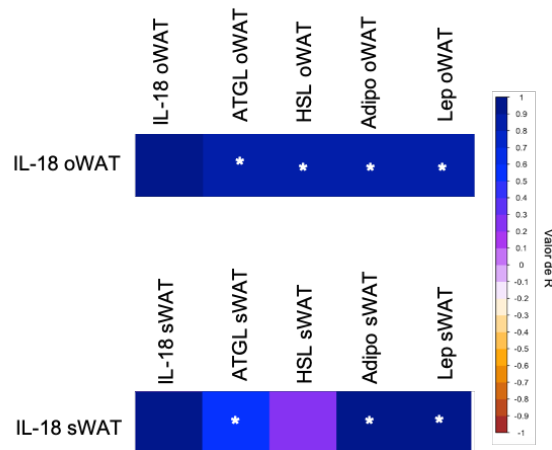


Figura 19. IL-18 se correlaciona com a expressão de lipases e adipocinas no WAT de indivíduos com obesidade. Matriz de correlação entre a expressão da IL-18 e a expressão das lipases ATGL e HSL, além das adiponectina e leptina nos tecidos adiposos omental (oWAT) e subcutâneo (sWAT) de humanos com obesidade grave, $n=53$. * refere-se a $P < 0,05$.

Dado a forte correlação entre a expressão IL-18 e a expressão das lipases no WAT de indivíduos com obesidade decidimos correlacionar a expressão da IL-18 no WAT pré cirurgia bariátrica com dados antropométricos após um ano da intervenção cirúrgica. Não identificamos diferenças estatística quanto as correlações da expressão da IL-18 tanto no sítio visceral e como no subcutâneo com os marcadores antropométricos IMC, peso corporal, perda de peso corporal, gordura corporal, perda de gordura corporal, gordura androide, perda de gordura androide, gordura ginoide e perda de gordura ginoide (Figura 20A) ou marcadores metabólicos como a glicose, insulina e HB1c (Figura 20B).

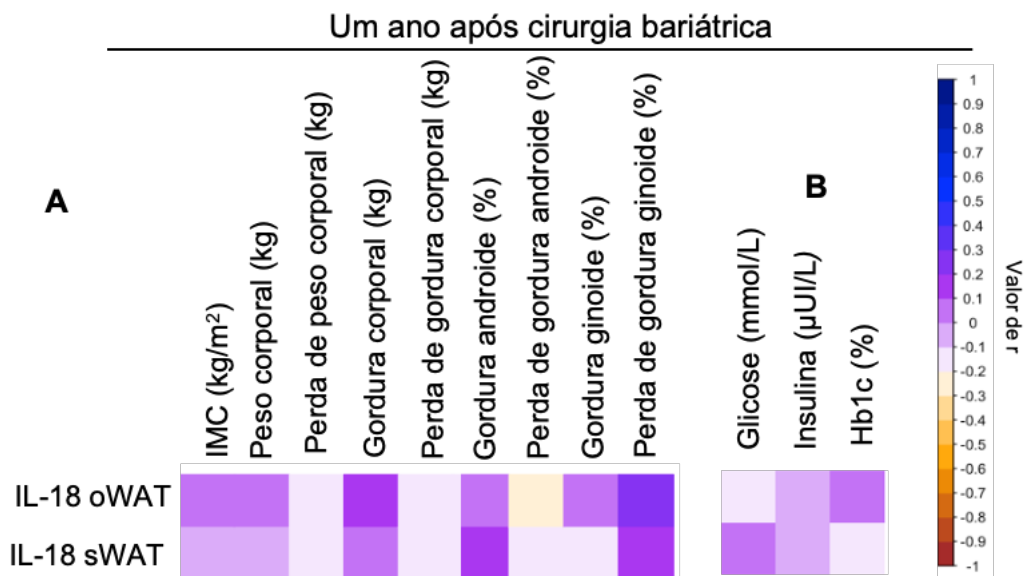


Figura 20. Expressão da IL-18 em tecido adiposo de indivíduos obesos não se correlaciona com perda de peso, gordura corporal ou marcadores metabólicos após cirurgia bariátrica. Matriz de correlação de Spearman entre a expressão da IL-18 no oWAT e no sWAT com IMC, peso corporal, perda de peso, gordura corporal, perda de peso, perda de massa muscular, e perda de massa muscular, percentual de gordura androide, percentual de perda de gordura androide, percentual de gordura ginecoide e percentual de perda de gordura ginecoide de pacientes com obesidade um ano após a cirurgia bariátrica (A). Matriz de correlação de Spearman entre a expressão da IL-18 no oWAT no sWAT com glicemia, insulidemia e hemoglobina glicada de pacientes com obesidade um ano após a cirurgia bariátrica (B), n=53. * refere-se a $P < 0,05$.

6 DISCUSSÃO

O tecido adiposo é um órgão dinâmico capaz se remodelar em tamanho de acordo com a demanda energética ou necessidade de armazenamento de energia. Situações como o jejum e a restrição alimentar, seja oriunda da inibição da ingestão alimentar voluntária ou ainda decorrente da cirurgia bariátrica, estimulam o fornecimento de energia por meio da clivagem dos TG armazenados nos adipócitos levando à redução do WAT (SECOR; CAREY, 2016). É muito bem estabelecido que a mobilização de TG dos adipócitos ocorre por meio do estímulo simpático (MIGLIORINI et al., 1997) mas evidências recentes também apontam que mediadores inflamatórios atuam de maneira acessória para que a redução de adiposidade aconteça (ASTERHOLM et al., 2012; FLACH et al., 2013; KOSTELI et al., 2010; LACERDA et al., 2019;2020). No presente trabalho, investigamos o papel do TNF e da IL-18 na perda de adiposidade induzida por restrição alimentar. Nosso estudo demonstrou que a sinalização de TNF desempenha papel relevante na redução dos tecidos viscerais e subcutâneos, com proeminência no último, induzida pelo jejum em camundongos. A via do TNF parece influenciar “*in vivo*” a via lipolítica e outras citocinas no WAT, modulando assim o remodelamento do tecido adiposo. De forma interessante, demonstramos que a maior expressão do TNFR1 no tecido adiposo de indivíduos com obesidade grave relaciona com a maior perda de peso e gordura corporal um ano após a cirurgia bariátrica. Por outro lado, apesar da IL-18 estar aumentada no WAT após o desafio do jejum, essa citocina não participa da redução de adiposidade induzida pelo jejum (em modelo animal) ou cirurgia bariátrica. Além disso, os camundongos knockout para IL-18 respondem ao jejum de forma similar a animais selvagens. Esses dados reforçam a nossa hipótese do efeito citocina-específico desempenhado pelo TNF na redução de adiposidade induzida pela restrição alimentar em modelos animais e em humanos.

No presente trabalho demonstramos por diferentes vias, incluindo a análise de camundongos knockout para TNFR1 ou ainda em animais tratados com um anti-TNF que eles apresentam resistência para a redução de adiposidade induzida pelo jejum. A resposta observada, mesmo em animais em jejum por período prolongado, 48h, em animais knockout para TNFR1 instiga o questionamento se essa resistência à redução de adiposidade seria decorrente da ausência do TNFR1 *per si* ou pelo fato dos animais knockout possuírem alterações adjacentes à deleção do TNFR1. Por nascerem com o gene silenciado, os camundongos knockout podem possuir algumas alterações que não sejam relacionadas a deleção do gene estudado (EISENER-DORMAN; LAWRENCE; BOLIVAR, 2009). Nesse sentido, os resultados utilizando o anticorpo inibidor da citocina, o infliximab confirma o efeito direto do TNF no controle do remodelamento do tecido adiposo induzido

pelo jejum. A ligação entre o TNF e o infliximab impede que essa citocina interaja com seus receptores TNFR1 e TNFR2 (HORIUCHI et al., 2010). Os dados apresentados enfatizam a via mediada pelo TNFR1 uma vez que esse receptor é o que possui maior expressão no tecido adiposo e a sua interação com o TNF é a responsável pelas principais funções dessa citocina nesse tecido (SETHI; HOTAMISLIGIL, 2021). Dessa forma, confirmamos por meio de análises em camundongos knockout para o TNFR1 assim como por tratamento farmacológico, que a ausência da sinalização de TNF leva à resistência à perda de adiposidade induzida pelo jejum.

A mobilização de gordura do tecido adiposo é mediada pela via lipolítica (FRÜHBECK et al., 2014). A interação entre a noradrenalina secretada pelas terminações simpáticas no tecido adiposo e o β 3-AR é a via canônica da lipólise e consequente redução de adiposidade induzida pelo jejum (BARTNESS et al., 2010, 2014). Nesse sentido, o agonista seletivo do β 3-AR, CL316,243 é amplamente utilizado nos estudos como uma forma de mimetizar a sinalização simpática e a lipólise no WAT (GRANNEMAN et al., 2005; MOTTILLO; XIANG; GRANNEMAN, 2007). No presente trabalho demonstramos que, assim como no jejum, os camundongos knockout para TNFR1 são resistentes ao remodelamento do WAT induzido pelo CL316,243. Esse dado, mais uma vez, corrobora com a ideia de que a ausência da sinalização da via do TNF, compromete a redução de adiposidade.

O aumento de citocinas no WAT é descrito em situações como o exercício e a exposição ao frio (ARGILÉS et al., 1997; ASTERHOLM et al., 2012; LACERDA et al., 2019, 2020; TSOLI; SWARBRICK; ROBERTSON, 2016). Além disso, existe uma resposta inflamatória no tecido adiposo decorrente do jejum ou estímulo com CL316,243 (LACERDA et al., 2019, 2020; KOSTELI et al., 2010; ASTERHOLM et al., 2012) evidenciada pelo aumento na expressão de proteínas de fase aguda, das concentrações de citocinas, em especial o TNF, e do número de neutrófilos e de macrófagos no WAT (ASTERHOLM et al., 2012; KOSTELI et al., 2010; LACERDA et al., 2020). A baixa disponibilidade de nutrientes parece induzir uma resposta inflamatória acessória no tecido adiposo para que ocorra a redução de adiposidade afim de fornecer substrato energético para o organismo, sendo aqui destacado que a via do TNF parece ser parte reguladora importante desse remodelamento do WAT.

A perda de adiposidade induzida pelo jejum envolve a ativação das lipases HSL e ATGL (FRÜHBECK et al., 2014). Com isso, ocorre a clivagem dos triglicérides em FFA e glicerol que serão transportados para fora do tecido adiposo reduzindo o seu tamanho (BAMSHAD et al., 1998; BARTNESS et al., 2010). Apesar dos camundongos knockout para o TNFR1^{-/-} apresentarem aumento

nas concentrações plasmáticas de FFA sob o estímulo do jejum, esses animais mostraram-se com menor expressão da ATGL e da HSL no sítio subcutâneo. O aumento do tônus simpático e a sinalização via o β 3-AR são a via clássica de ativação da ATGL e da HSL no jejum (BARTNESS et al., 2014) adicionalmente, o TNF também gera um estímulo lipolítico, conforme já demonstrado *in vitro*. Consistentemente, o silenciamento da ATGL e HSL nessas células reduz esse estímulo lipolítico dessa citocina (YANG et al., 2011). Nosso trabalho respalda o efeito mediado pelo TNF na lipólise *in vivo por* meio da modulação da expressão das lipases no tecido adiposo, em especial no sítio subcutâneo.

Com o objetivo de compreender melhor a modulação do TNF sob a via lipolítica durante o jejum, quantificamos o conteúdo de tirosina hidroxilase no WAT. Curiosamente, evidenciamos que o eWAT de camundongos TNFR1^{-/-} apresentaram maior conteúdo de tirosina hidroxilase em relação aos animais selvagens. Sob estímulo de jejum, não observamos alteração da enzima, tanto em animais selvagens como com deficiência no receptor 1 do TNF. Por outro lado, no iWAT de ambas as linhagens desafiadas com o jejum a tirosina hidroxilase apresentou-se aumentada. Essa enzima é responsável por sintetizar catecolaminas e está presente nos nervos simpáticos do WAT (DUNKLEY et al., 2019). Por isso, ela é utilizada para identificar a inervação simpática nesse tecido (CHI et al., 2018). A inervação simpática dos camundongos TNFR1^{-/-} submetidos ao jejum aparenta estar funcionando. Assim é sugerido que o tecido adiposo, em especial o iWAT, dos camundongos com ausência de sinalização do TNF poderiam ter algum comprometimento à nível do receptor β 3-AR, que, por sua vez, estaria relacionado a resistência à redução de adiposidade induzida pelo jejum. Tanto o eWAT quanto o iWAT dos camundongos selvagens desafiados com o jejum apresentaram aumento do β 3-AR. Em contrapartida, identificamos que o iWAT dos camundongos TNFR1^{-/-} submetidos ao jejum não apresentou esse aumento do β 3-AR. De forma condizente, demonstramos em nosso experimento *ex-vivo* que apenas os fragmentos de iWAT tratados com infliximab não apresentaram aumento de glicerol sob o estímulo do CL316,243. Apesar de já ser demonstrado que durante a sobrecarga de nutrientes o TNF reduz a expressão do β 3-AR no WAT (VALENTINE et al., 2022), durante a escassez energética ou a sua mimetização, a sinalização do TNF parece controlar o conteúdo de β 3-AR para favorecer a mobilização de gordura e redução de adiposidade, em especial a subcutânea.

Curiosamente, em contraponto a maior intensidade de fluorescência do β 3-AR nos animais TNFR1^{-/-}, esses não apresentaram redução do tecido adiposo quando submetidos ao jejum. Um outro mecanismo de controle da lipólise no WAT é via a inibição da mobilização de gordura pelo α 2-AR

(MAURIEGE et al 1995). O tratamento com agonista seletivo do $\alpha 2$ -AR, dexmedetomidina reduz o TNF seja em camundongos estimulados com LPS ou em pacientes críticos (YANG et al., 2019; YEH et al., 2018). Assim, especulamos que o TNFR1 poderia modular o $\alpha 2$ -AR no eWAT de camundongos fazendo com que o tecido não se remodele mediante a baixa disponibilidade de nutrientes, todavia, são necessários mais estudos para comprovar essa hipótese.

A sinalização do TNF via seu receptor TNFR1 promove a translocação do fator de transcrição NFkB para o núcleo estimulando a secreção de IL-6 e ativando o inflamassoma que culmina na liberação de IL1 β e IL-18. Além disso, essa sinalização reduz a expressão de IL-10 (FURUOKA et al., 2016). Em concordância com dados prévios (ASTERHOLM et al., 2012; LACERDA et al., 2019), verificamos que animais submetidos ao jejum aumentam as citocinas TNF, IL-6 e IL-18 tanto no eWAT quanto no iWAT, sendo que no iWAT também observamos aumento do IL-10. Adicionalmente, camundongos selvagens tratados com o CL316,243 também apresentam aumento de TNF e IL-6 tanto no sítio subcutâneo como no visceral. Por outro lado, na ausência da sinalização do TNF não ocorre aumento da expressão dessas citocinas seja quando estimulados com o jejum ou com o CL316,243. Assim, é possível que o TNF tenha um efeito pleiotópico modulando a expressão de outras citocinas para que, por sua vez, apresentem efeito acessório para a redução do tecido adiposo estimulada pelo jejum. O aumento de mediadores inflamatórios no WAT também ocorre na mimetização farmacológica do jejum, com estímulo do CL316,243, assim como ocorre o aumento de macrófagos no WAT (KOSTELI et al., 2010; MOTTILLO; XIANG; GRANNEMAN, 2007). Consistente com esses dados, o jejum aumenta a população de macrófagos CD45⁺ CD64⁺ TIM4⁺ e na ausência do TNF, reduz essa população no iWAT. Cox e colaboradores (2021) demonstraram que os macrófagos CD45⁺ CD64⁺ TIM4⁺ controlam o acúmulo de gordura no WAT mediante o estímulo de dieta rica em gordura saturada (COX et al., 2021). Em contrapartida, a baixa disponibilidade energética que o jejum ou a sua mimetização farmacológica induz aumenta os macrófagos no WAT que regulam a lipólise (KOSTELI et al., 2010; MOTTILLO; XIANG; GRANNEMAN, 2007). Essas células imunológicas foram identificadas com a marcação geral de macrófagos F4/80. Nosso trabalho complementa a ideia de que as células CD45⁺ CD64⁺ TIM4⁺ possam estar envolvidas no controle da redução de gordura no tecido adiposo subcutâneo sob o estímulo do jejum onde o TNF parece ser um dos moduladores das populações de macrófagos CD45⁺ CD64⁺ TIM4⁺, com consequente controle da adiposidade.

Baseado em nossos dados pré-clínicos decidimos investigar em uma abordagem translacional o papel do TNFR1 no remodelamento do WAT. A expressão do TNFR1 se correlacionou fortemente

com a expressão da ATGL, da HSL, da leptina e da adiponectina apenas no sWAT de pacientes com obesidade grave. Por outro lado, não identificamos correlações com a expressão do TNFR1 no oWAT ou sWAT dos pacientes com obesidade grave com a perda de peso e gordura corporal um ano após a cirurgia bariátrica. Pacientes submetidos a cirurgia bariátrica apresentam maior perda de adiposidade visceral em relação a gordura subcutânea (HUNT et al., 2021; PONTIROLI et al., 2002). Adicionalmente, é descrito na literatura que o TNF está aumentado no tecido adiposo de indivíduos um ano após a cirurgia bariátrica (JÜRETS et al., 2017). Dessa forma, sugerimos que são necessários mais estudos investigando as correlações da expressão do TNFR1 com parâmetros de perda de peso e gordura corporal após a cirurgia bariátrica.

Conforme mencionado acima, a IL-18 está elevada no WAT após o desafio do jejum. Diante desses achados e da falta de consenso na literatura sobre o envolvimento do IL-18 na biologia do WAT (LINDEGAARD et al., 2013a, 2013b; MURPHY et al., 2016; NETEA et al., 2006), decidimos investigar se essa citocina está envolvida na redução do tecido adiposo induzida pelo déficit energético. Camundongos IL18^{-/-} responderam ao desafio do jejum de maneira similar aos camundongos WT. Tal resposta pode ser atribuída ao aumento da expressão de TNF no eWAT e iWAT mesmo em camundongos IL18^{-/-}. Isso evidencia ainda mais a importância da sinalização do TNF em intermediar a redução da adiposidade.

A expressão da IL-18 no oWAT de indivíduos com obesidade se correlaciona fortemente com a expressão de ATGL, HSL, adiponectina e leptina nesse mesmo depósito de tecido adiposo. Além disso, nessa mesma coorte a expressão da IL-18 no sWAT se correlacionou fortemente com expressão de ATGL, leptina e adiponectina do sítio subcutâneo. Apesar desses resultados a expressão da IL-18 no tecido adiposo não se correlacionou com marcadores relacionados a perda de peso e gordura corporal um ano após a cirurgia bariátrica. Essa evidência clínica conjuntamente com dados pré-clínicos suportam a ideia de que a IL-18 não é uma citocina relevante para o remodelamento do tecido adiposo induzido pela baixa disponibilidade energética. Por outro lado, essa citocina está associada à maior lipólise em contextos patológicos no tecido adiposo (LINDEGAARD et al., 2013b; MURPHY et al., 2016). Contudo, esse mecanismo não acontece em contextos de baixa disponibilidade de nutrientes, como jejum ou cirurgia bariátrica.

A resposta inflamatória tem um papel importante na modulação da redução de adiposidade durante a escassez de nutrientes (LACERDA et al., 2020). Por outro lado, quando é investigado a participação de apenas uma citocina ou receptor na redução de adiposidade induzida pelo jejum é observado que nem todas as moléculas são importantes para a perda de gordura corporal (JOESTING

et al., 2014; PANG et al., 2010). Nesse sentido, o presente trabalho demonstra que apesar do TNF e da IL-18 estarem aumentados no WAT sob o estímulo do jejum, apenas o TNF é importante para que a redução de adiposidade ocorra. Ou seja, existem alguns mediadores inflamatórios que são realmente relevantes para a redução de adiposidade. Dessa forma, sugerimos que existe um efeito citocina específico na redução de adiposidade induzida pela baixa disponibilidade de nutrientes.

Nosso estudo apresenta algumas limitações a serem consideradas. Em primeiro lugar, a maioria dos participantes nos dados clínicos eram do sexo feminino. Esses valores são consistentes com o percentual de mulheres que realizam cirurgia bariátrica relatados na literatura (YOUNG; PHELAN; NGUYEN, 2016). Em segundo lugar, não analisamos indivíduos magros e amostras de tecido adiposo obtidas um ano após a cirurgia bariátrica. Embora seja mais fácil obter biópsias do oWAT e sWAT durante a cirurgia bariátrica, a aquisição de amostras de WAT de indivíduos magros ou daqueles que emagreceram um ano após a cirurgia bariátrica requer um procedimento cirúrgico menor, o que pode resultar em menor adesão a pesquisas científicas. Apesar disso, nossos dados clínicos são consistentes, pois possuímos n amostral de 53 indivíduos e as correlações entre a expressão do TNFR1 no sWAT e a expressão de enzimas lipolíticas no sWAT são consideradas fortes. Isso indica uma possível participação do TNFR1 no remodelamento no WAT induzido pela cirurgia bariátrica. Assim, sugerimos que seria interessante analisar a expressão do TNFR1 no WAT de indivíduos um ano após a cirurgia bariátrica para confirmar os nossos achados.

7 CONCLUSÃO

Por meio de ensaios pré-clínicos e estudo clínico identificamos que o TNF é uma citocina importante que medeia a redução de adiposidade, induzida pelo jejum ou cirurgia bariátrica, ao passo que a IL-18 parece não possuir participação significativa (Ilustração 2). O papel mediador do TNF no remodelamento do tecido adiposo durante sua redução acontece via a modulação da expressão das lipases ATGL e HSL e do controle do conteúdo do β 3-AR. Adicionalmente, o TNF possui função importante na resposta inflamatória induzida pela baixa disponibilidade de nutrientes dado seu efeito pleitrópico na expressão das citocinas IL-6, IL-18 e IL-10 e na modulação dos macrófagos TIM4+. Apesar da IL-18 estar aumentada no WAT sob o estímulo do jejum ela não possui um papel relevante no remodelamento do WAT induzido pela escassez de nutrientes. Dessa forma, sugerimos que existe um efeito citocina-específico na regulação da perda de adiposidade induzida pelo jejum ou cirurgia bariátrica onde o TNF exerce papel chave no remodelamento do tecido adiposo.

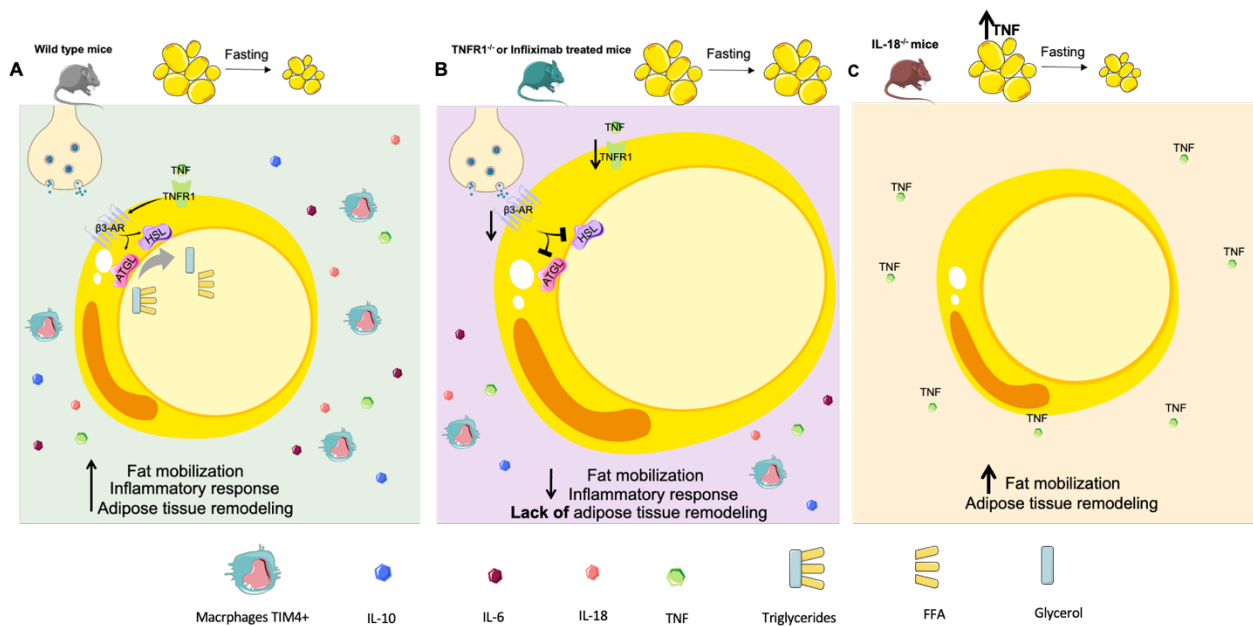


Ilustração 2. O TNF exerce um papel chave no remodelamento do tecido adiposo induzido pelo jejum em camundongos. Em animais selvagens observamos que o desafio do jejum aumenta tanto o tônus simpático como o β 3-AR no WAT. Isso aumenta a expressão das lipases ATGL e HSL que irão clivar os TG armazenados nos adipócitos em FFA e glicerol para fornecer substrato energético para organismo. Além disso, identificamos também que o déficit energético induz uma resposta inflamatória no WAT que compreende o aumento da expressão de TNF, IL-6, IL-18 e IL-10 e de macrófagos TIM4+. Essa resposta inflamatória juntamente com a lipólise faz com que o WAT remodele diminuindo o seu tamanho (A). Já em camundongos com ausência de sinalização do TNF seja knockout para o TNFR1 ou tratados com infliximab observamos que o remodelamento do tecido adiposo é comprometido mediante o desafio do jejum. Essa ausência de remodelamento do WAT é devido ao efeito modulador do TNF sob o β 3-AR que interfere na expressão das lipases assim como o efeito pleiotrófico dessa citocina na expressão das citocinas IL-10, IL-6 e IL-18 que poderiam modular os macrófagos residentes (B). Animais com deleção da IL-18 apresentam expressão aumentada do TNF, por isso quando esse camundongos são submetidos ao desafio do jejum eles conseguem remodelar o tecido adiposo (C).

8 AGRADECIMENTO ÀS AGÊNCIAS DE FOMENTO

Agradecemos o financiamento a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Comité français d’Evaluation de la Coopération Universitaire et Scientifique avec le Brésil (COFECUB) processo 88887.130206/2017-01. Além disso, agradecemos também a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), a Pro-Reitoria de Pesquisa (PRPq) da Universidade Federal de Minas Gerais, o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação Francesa de Pesquisa Médica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHLMA, R. S. et al. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. **Nature**, v. 382, n. 6588, p. 250–252, 1996.
- AHMAD, R. et al. Increased adipose tissue expression of IL-18R and its ligand IL-18 associates with inflammation and insulin resistance in obesity. **Immunity, inflammation and disease**, v. 5, n. 3, p. 318–335, 1 set. 2017.
- ARGILÉS, J. M. et al. Journey from cachexia to obesity by TNF. **The FASEB Journal**, v. 11, n. 10, 1997.
- ARNER, P. et al. Beta-adrenoceptor expression in human fat cells from different regions. **Journal of Clinical Investigation**, v. 86, n. 5, p. 1595, 1990.
- ASTERHOLM, I. W. et al. Lack of “immunological fitness” during fasting in metabolically challenged animals. **Journal of Lipid Research**, v. 53, n. 7, p. 1254–1267, jul. 2012.
- BAMSHAD, M. et al. Central nervous system origins of the sympathetic nervous system outflow to white adipose tissue. **Am. J. Physiol.**, v. 275, p. R291–R299, 1998.
- BARAK, Y. et al. PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. **Molecular cell**, v. 4, n. 4, p. 585–95, out. 1999.
- BARTNESS, T. J. et al. Neural innervation of white adipose tissue and the control of lipolysis. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 35, n. 4, p. 473–493, out. 2014.
- BAUERNFEIND, F. et al. Aging-Associated TNF Production Primes Inflammasome Activation and NLRP3-Related Metabolic Disturbances. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 197, n. 7, p. 2900–8, 1 out. 2016.
- BERGIN, BY; EZRA LOZINSKI, B.; FROHLICH, L. I. Resistance to Insulin. **Canadian Medical Association Journal**, v. 46, n. 1, p. 62, jan. 1942.
- BERTHOLDT, L. et al. Impact of skeletal muscle IL-6 on regulation of liver and adipose tissue metabolism during fasting. **Pflugers Archiv : European journal of physiology**, v. 470, n. 11, p. 1597–1613, 1 nov. 2018.
- BEUTLER, B. et al. Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. **Nature**, v. 316, n. 6028, p. 552–554, 1985b.
- BEUTLER, B. et al. Purification of cachectin, a lipoprotein lipase-suppressing hormone secreted by endotoxin-induced raw 264.7 cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 161, n. 5, 1985a.
- BORG, W. P. et al. Ventromedial hypothalamic lesions in rats suppress counterregulatory responses to hypoglycemia. **The Journal of clinical investigation**, v. 93, n. 4, p. 1677–1682, 1994.

- BOTION, L. M. et al. Inhibition of proteasome activity blocks the ability of TNF alpha to down-regulate G(i) proteins and stimulate lipolysis. **Endocrinology**, v. 142, n. 12, p. 5069–75, dez. 2001.
- BRASIL, M. DA S. **Vigitel — Ministério da Saúde**. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/v/vigitel>>. Acesso em: 15 fev. 2024.
- CHI, J. et al. Three-Dimensional Adipose Tissue Imaging Reveals Regional Variation in Beige Fat Biogenesis and PRDM16-Dependent Sympathetic Neurite Density. **Cell Metabolism**, v. 27, n. 1, p. 226- 236.e3, 9 jan. 2018.
- CHOE, S. S. et al. Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. **Frontiers in Endocrinology**, v. 7, p. 30, 13 abr. 2016.
- CHOUCHANI, E. T.; KAJIMURA, S. Metabolic adaptation and maladaptation in adipose tissue. **Nature Metabolism**, Nature Research, 1 fev. 2019.
- COSTA, K. A. et al. PAF signaling plays a role in obesity-induced adipose tissue remodeling. **International Journal of Obesity**, 2021.
- COX, N. et al. Diet-regulated production of PDGF α by macrophages controls energy storage. **Science (New York, N.Y.)**, v. 373, n. 6550, 2 jul. 2021.
- CZECH, M. P. Insulin action and resistance in obesity and type 2 diabetes. **Nature Medicine**, v. 23, n. 7, p. 804–814, 1 jul. 2017.
- DAAS, S. I.; RIZEQ, B. R.; NASRALLAH, G. K. Adipose tissue dysfunction in cancer cachexia. **Journal of cellular physiology**, v. 234, n. 1, p. 13–22, 1 jan. 2018.
- DE LA CÁMARA, C. M. F. et al. Infliximab reduces Zaprinas-induced retinal degeneration in cultures of porcine retina. **Journal of Neuroinflammation**, v. 11, n. 1, p. 1–14, 10 out. 2014.
- DI PAOLA, R. et al. The renal injury and inflammation caused by ischemia-reperfusion are reduced by genetic inhibition of TNF- α 1: a comparison with infliximab treatment. **European journal of pharmacology**, v. 700, n. 1–3, p. 134–146, 30 jan. 2013.
- DIETZ, J.; SCHWARTZ, J. Growth hormone alters lipolysis and hormone-sensitive lipase activity in 3T3-F442A adipocytes. **Metabolism**, v. 40, n. 8, 1991.
- DOUGLASS, A. M. et al. Neural basis for fasting activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Nature**, v. 620, n. 7972, p. 154–162, 3 ago. 2023.
- DUNKLEY, P. R.; DICKSON, P. W. Tyrosine hydroxylase phosphorylation in vivo. **Journal of neurochemistry**, v. 149, n. 6, p. 706–728, 1 jun. 2019.

- EISENER-DORMAN, A. F.; LAWRENCE, D. A.; BOLIVAR, V. J. Cautionary insights on knockout mouse studies: The gene or not the gene? **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 23, n. 3, p. 318–324, 1 mar. 2009.
- ELGAZAR-CARMON, V. et al. Neutrophils transiently infiltrate intra-abdominal fat early in the course of high-fat feeding. **Journal of lipid research**, v. 49, n. 9, p. 1894–903, set. 2008.
- FAZELI, P. K. et al. Prolonged fasting drives a program of metabolic inflammation in human adipose tissue. **Molecular Metabolism**, v. 42, p. 101082, 1 dez. 2020.
- FLACH, R. J. R. et al. β 3-Adrenergic receptor stimulation induces E-selectin-mediated adipose tissue inflammation. **The Journal of biological chemistry**, v. 288, n. 4, p. 2882–2892, 25 jan. 2013.
- FRÜHBECK, G. et al. Regulation of adipocyte lipolysis. **Nutrition Research Reviews**, v. 27, n. 1, p. 63–93, 28 jun. 2014.
- FURNES, M. W. et al. Feeding behavior and body weight development: lessons from rats subjected to gastric bypass surgery or high-fat diet. **J Physiol Pharmacol**, v. 60, n. Suppl 7, p. 25-31, 2009.
- FURUOKA, M. et al. TNF- α Induces Caspase-1 Activation Independently of Simultaneously Induced NLRP3 in 3T3-L1 Cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 231, n. 12, p. 2761–2767, dez. 2016.
- GARCÍA, M. C. et al. Mature-onset obesity in interleukin-1 receptor I knockout mice. **Diabetes**, v. 55, n. 5, p. 1205–13, 1 maio 2006.
- GASIC, S.; TIAN, B.; GREEN, A. Tumor necrosis factor alpha stimulates lipolysis in adipocytes by decreasing Gi protein concentrations. **The Journal of biological chemistry**, v. 274, n. 10, p. 6770–5, 5 mar. 1999.
- GERDES, N. et al. Expression of interleukin (IL)-18 and functional IL-18 receptor on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for atherogenesis. **The Journal of experimental medicine**, v. 195, n. 2, p. 245–257, 21 jan. 2002.
- GHABEN, A. L.; SCHERER, P. E. Adipogenesis and metabolic health. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 20, n. 4, p. 242–258, 4 abr. 2019.
- GRANNEMAN, J. G. et al. Metabolic and cellular plasticity in white adipose tissue I: effects of beta3-adrenergic receptor activation. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 289, n. 4, out. 2005.
- GRÜN, D.; VAN OUDENAARDEN, A. Design and Analysis of Single-Cell Sequencing Experiments. **Cell**, v. 163, n. 4, p. 799–810, 5 nov. 2015.

- GUPTA, O. T.; GUPTA, R. K. Visceral Adipose Tissue Mesothelial Cells: Living on the Edge or Just Taking Up Space? **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, v. 26, n. 10, p. 515–523, 1 out. 2015.
- GUZIK, T. J. et al. The role of infiltrating immune cells in dysfunctional adipose tissue. **Cardiovascular Research**, v. 113, p. 1009–1023, 2017.
- HAGHIGHAT, N. et al. How Does Fat Mass Change in the First Year After Bariatric Surgery? A Systemic Review and Meta-Analysis. **Obesity Surgery**, v. 31, p. 3799–3821, 5 maio 2021.
- HELLMÉR, J. et al. Mechanisms for differences in lipolysis between human subcutaneous and omental fat cells. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 75, n. 1, p. 15–20, 1992.
- HORIUCHI, T. et al. Transmembrane TNF-alpha: structure, function and interaction with anti-TNF agents. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 49, n. 7, p. 1215–1228, 1 mar. 2010.
- HOTAMISLIGIL, G. S. et al. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. **Science (New York, N.Y.)**, v. 271, n. 5249, p. 665–8, 2 fev. 1996.
- HOTAMISLIGIL, G. S. **Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders**. **Nature Publishing Group**, 8 fev. 2017. Acesso em: 31 out. 2019
- HOTAMISLIGIL, G.; SHARGILL, N.; SPIEGELMAN, B. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**, v. 259, n. 5091, p. 87–91, 1 jan. 1993.
- HUNT, S. C. et al. Associations of Visceral, Subcutaneous, Epicardial, and Liver Fat with Metabolic Disorders up to 14 Years After Weight Loss Surgery. **Metabolic syndrome and related disorders**, v. 19, n. 2, p. 83–92, 1 mar. 2021.
- IHIM, S. A. et al. Interleukin-18 cytokine in immunity, inflammation, and autoimmunity: Biological role in induction, regulation, and treatment. **Frontiers in immunology**, v. 13, 11 ago. 2022.
- JACOBSSON, B.; SMITH, U. Effect of cell size on lipolysis and antilipolytic action of insulin in human fat cells. **Journal of Lipid Research**, v. 13, n. 5, p. 651–656, 1972.
- JEFFERY, E. et al. Rapid depot-specific activation of adipocyte precursor cells at the onset of obesity. **Nature cell biology**, v. 17, n. 4, p. 376–385, 30 abr. 2015.
- JOESTING, J. J. et al. Fasting Induces IL-1 Resistance and Free-Fatty Acid-Mediated Up-Regulation of IL-1R2 and IL-1RA. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. JUL, p. 315, 9 jul. 2014.

- JÜRETS, A. et al. Upregulated TNF Expression 1 Year After Bariatric Surgery Reflects a Cachexia-Like State in Subcutaneous Adipose Tissue. **Obesity surgery**, v. 27, n. 6, p. 1514–1523, 1 jun. 2017.
- KALLIOLIAS, G. D.; IVASHKIV, L. B. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. **Nature reviews. Rheumatology**, v. 12, n. 1, p. 49–62, 1 jan. 2016.
- KAPLANSKI, G. Interleukin-18: Biological properties and role in disease pathogenesis. **Immunological reviews**, v. 281, n. 1, p. 138–153, 1 jan. 2018.
- KAWAKAMI, M. et al. Human recombinant TNF suppresses lipoprotein lipase activity and stimulates lipolysis in 3T3-L1 cells. **Journal of biochemistry**, v. 101, n. 2, p. 331–338, 1987.
- KAWAKAMI, M.; CERAMI, A. Studies of endotoxin-induced decrease in lipoprotein lipase activity. **Journal of Experimental Medicine**, v. 154, n. 3, 1981.
- KERSTEN, S. The impact of fasting on adipose tissue metabolism. **Biochimica et biophysica acta. Molecular and cell biology of lipids**, v. 1868, n. 3, 1 mar. 2023.
- KHAN, R. S. et al. Modulation of Insulin Resistance in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 70, n. 2, p. 711–724, 2019.
- KINTSCHER, U. et al. T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue: a primary event in adipose tissue inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 28, n. 7, p. 1304–10, jul. 2008.
- KOSTELI, A. et al. Weight loss and lipolysis promote a dynamic immune response in murine adipose tissue. **The Journal of clinical investigation**, v. 120, n. 10, p. 3466–79, 1 out. 2010.
- LACASA, D.; AGLI, B.; GIUDICELLI, Y. Permissive action of glucocorticoids on catecholamine-induced lipolysis: direct “in vitro” effects on the fat cell beta-adrenoreceptor-coupled-adenylate cyclase system. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 153, n. 2, p. 489–497, 16 jun. 1988.
- LACERDA, D. R. et al. Mechanisms underlying fat pad remodeling induced by fasting: role of PAF receptor. **Nutrition**, v. 71, 2020.
- LACERDA, D. R. et al. Role of adipose tissue inflammation in fat pad loss induced by fasting in lean and mildly obese mice. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 72, 1 out. 2019.
- LAFONTAN, M.; DANG-TRAN, L.; BERLAN, M. Alpha-adrenergic antilipolytic effect of adrenaline in human fat cells of the thigh: comparison with adrenaline responsiveness of different fat deposits. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 9, p. 26–27, 1979.
- LAFONTAN, M.; LANGIN, D. Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. **Progress in Lipid Research**, v. 48, n. 5, p. 275–297, set. 2009.

- LANA, J. P. et al. Role of IL-18 in adipose tissue remodeling and metabolic dysfunction. **International journal of obesity**, 8 mar. 2024.
- LARA-CASTRO, C. et al. Adiponectin multimeric complexes and the metabolic syndrome trait cluster. **Diabetes**, v. 55, n. 1, p. 249–59, jan. 2006.
- LASS, A. et al. Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome. **Cell metabolism**, v. 3, n. 5, p. 309–319, maio 2006.
- LAURENCIKIENE, J. et al. NF-kappaB is important for TNF-alpha-induced lipolysis in human adipocytes. **Journal of lipid research**, v. 48, n. 5, p. 1069–77, maio 2007.
- LI, W.; RICHARD, D. Effects of Bariatric Surgery on Energy Homeostasis. **Canadian journal of diabetes**, v. 41, n. 4, p. 426–431, 1 ago. 2017.
- LIM, S. et al. Cold-induced activation of brown adipose tissue and adipose angiogenesis in mice. **Nature protocols**, v. 7, n. 3, p. 606–615, mar. 2012.
- LINDEGAARD, B. et al. Acute reduction of lipolysis reduces adiponectin and IL-18: evidence from an intervention study with acipimox and insulin. **Diabetologia**, 2013.
- LUMENG, C. N.; BODZIN, J. L.; SALTIEL, A. R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 1, p. 175–184, 2 jan. 2007.
- LUO, X. et al. Cold-Induced Browning Dynamically Alters the Expression Profiles of Inflammatory Adipokines with Tissue Specificity in Mice. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 5, 1 maio 2016.
- M VAUGHAN, J. E. B. D. S. Hormone-sensitive lipase and monoglyceride lipase activities in adipose tissue. **J Biol Chem**, v. 239, p. 401–409, fev. 1964.
- MAKOVEICHUK, E. et al. TNF- α decreases lipoprotein lipase activity in 3T3-L1 adipocytes by up-regulation of angiopoietin-like protein 4. **Biochimica et biophysica acta. Molecular and cell biology of lipids**, v. 1862, n. 5, p. 533–540, 1 maio 2017.
- MARCELIN, G. et al. **Deciphering the cellular interplays underlying obesity induced adipose tissue fibrosis**. **Journal of Clinical Investigation** American Society for Clinical Investigation, , 1 out. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31498150/>>. Acesso em: 9 dez. 2020
- MARTINS, L. B. et al. Paradoxical role of tumor necrosis factor on metabolic dysfunction and adipose tissue expansion in mice. **Nutrition**, v. 50, p. 1–7, 1 jun. 2018.

- MASSIER, L. et al. An integrated single cell and spatial transcriptomic map of human white adipose tissue. **Nature communications**, v. 14, n. 1, 1 dez. 2023.
- MAURIEGE, P.; GALITZKY, J.; BERLAN, M. Heterogeneous distribution of beta and alpha-2 adrenoceptor binding sites in human fat cells from various fat deposits: functional consequences **European Journal of Clinical Investigation**, 1985.
- MEIZLISH, M. L. et al. Tissue Homeostasis and Inflammation. **Annual review of immunology**, v. 39, p. 557–581, 26 abr. 2021.
- MENEZES-GARCIA, Z. et al. Lack of platelet-activating factor receptor protects mice against diet-induced adipose inflammation and insulin-resistance despite fat pad expansion. **Obesity (Silver Spring, Md.)**, v. 22, n. 3, p. 663–72, mar. 2014.
- MERKEL, M.; ECKEL, R. H.; GOLDBERG, I. J. Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation. **Journal of lipid research**, v. 43, n. 12, p. 1997–2006, dez. 2002.
- MIGLIORINI, R. H.; GAROFALO, M. A.; KETTELHUT, I. C. Increased sympathetic activity in rat white adipose tissue during prolonged fasting. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 272, n. 2, p. R656–R661, fev. 1997.
- MOTTILLO, E. P.; XIANG, J. S.; GRANNEMAN, J. G. Role of hormone-sensitive lipase in beta-adrenergic remodeling of white adipose tissue. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 293, n. 5, nov. 2007.
- MURPHY, A. J. et al. IL-18 Production from the NLRP1 Inflammasome Prevents Obesity and Metabolic Syndrome. **Cell Metabolism**, v. 23, n. 1, p. 155–164, 12 jan. 2016.
- NETEA, M. G. et al. Deficiency of interleukin-18 in mice leads to hyperphagia, obesity and insulin resistance. **Nature Medicine**, v. 12, n. 6, p. 650–656, 28 jun. 2006.
- NISHIMURA, S. et al. CD8⁺ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. **Nature medicine**, v. 15, n. 8, p. 914–20, 26 ago. 2009.
- NISHIZAWA, Y.; BRAY, G. A. Ventromedial hypothalamic lesions and the mobilization of fatty acids. **The Journal of clinical investigation**, v. 61, n. 3, p. 714–721, 1978.
- ÖSTMAN, J. et al. Regional differences in the control of lipolysis in human adipose tissue. **Metabolism: clinical and experimental**, v. 28, n. 12, p. 1198–1205, 1979.
- OZCAN, L. et al. Calcium signaling through CaMKII regulates hepatic glucose production in fasting and obesity. **Cell Metabolism**, v. 15, n. 5, p. 739–751, 2 maio 2012.
- PALAZUELOS-GENIS, T. et al. Weight loss and body composition during the first postoperative year of a laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass. **Obesity surgery**, v. 18, n. 1, p. 1–4, jan. 2008.

- PANG, S. et al. Regulation of fasting fuel metabolism by toll-like receptor 4. **Diabetes**, v. 59, n. 12, p. 3041–3048, dez. 2010.
- PATEL, H. J.; PATEL, B. M. TNF- α and cancer cachexia: Molecular insights and clinical implications. **Life sciences**, v. 170, p. 56–63, 1 fev. 2017.
- PAZOS, P. et al. Divergent responses to thermogenic stimuli in BAT and subcutaneous adipose tissue from interleukin 18 and interleukin 18 receptor 1-deficient mice. **Scientific reports**, v. 5, 10 dez. 2015.
- PIRZGALSKA, R. M. et al. Sympathetic neuron-associated macrophages contribute to obesity by importing and metabolizing norepinephrine. **Nature Medicine**, v. 23, n. 11, p. 1309–1318, 9 nov. 2017.
- PLOMGAARD, P. et al. Tumor necrosis factor- α modulates human in vivo lipolysis. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 93, n. 2, p. 543–549, 2008.
- PONTIROLI, A. E. et al. Ultrasound measurement of visceral and subcutaneous fat in morbidly obese patients before and after laparoscopic adjustable gastric banding: comparison with computerized tomography and with anthropometric measurements. **Obesity surgery**, v. 12, n. 5, p. 648–651, 2002.
- RÉGNIER, M. et al. The role of ChREBP in carbohydrate sensing and NAFLD development. **Nature reviews. Endocrinology**, v. 19, n. 6, p. 336–349, 1 jun. 2023.
- REILLY, S. M.; SALTIEL, A. R. Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 13, n. 11, p. 633–643, 11 nov. 2017.
- REVELLI, J. P. et al. Expression of the beta 3-adrenergic receptor in human white adipose tissue. **Journal of molecular endocrinology**, v. 10, n. 2, p. 193–197, 1993.
- RICHELSEN, B. et al. Regulation of lipoprotein lipase and hormone-sensitive lipase activity and gene expression in adipose and muscle tissue by growth hormone treatment during weight loss in obese patients. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 49, n. 7, 2000.
- RODRIGUES, D. F. et al. Acute intake of a high-fructose diet alters the balance of adipokine concentrations and induces neutrophil influx in the liver. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 25, n. 4, p. 388–394, abr. 2014.
- ROSEN, E. D. et al. PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. **Molecular cell**, v. 4, n. 4, p. 611–7, out. 1999.
- ROUTH, V. H. Glucose sensing neurons in the ventromedial hypothalamus. **Sensors (Basel, Switzerland)**, v. 10, n. 10, p. 9002–9025, 2010.

- RUPPERT, P. M. M. et al. Fasting induces ANGPTL4 and reduces LPL activity in human adipose tissue. **Molecular metabolism**, v. 40, 1 out. 2020.
- RYDÉN, M. et al. Mapping of early signaling events in tumor necrosis factor- α -mediated lipolysis in human fat cells. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 2, p. 1085–1091, 11 jan. 2002.
- RYDÉN, M. et al. Targets for TNF- α -induced lipolysis in human adipocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 318, n. 1, p. 168–175, 21 maio 2004.
- SANDOVAL, D. A.; PATTI, M. E. Glucose metabolism after bariatric surgery: implications for T2DM remission and hypoglycaemia. **Nature reviews. Endocrinology**, v. 19, n. 3, p. 164–176, 1 mar. 2023.
- SANDOVAL, D. A.; PATTI, M. E. Glucose metabolism after bariatric surgery: implications for T2DM remission and hypoglycaemia. **Nature reviews. Endocrinology**, v. 19, n. 3, p. 164–176, 1 mar. 2023.
- SCHAEFFLER, A. et al. Fatty acid-induced induction of Toll-like receptor-4/nuclear factor-kappaB pathway in adipocytes links nutritional signalling with innate immunity. **Immunology**, v. 126, n. 2, p. 233–45, fev. 2009.
- SECOR, S. M.; CAREY, H. V. Integrative Physiology of Fasting. **Comprehensive Physiology**, v. 6, n. 2, p. 773–825, 15 mar. 2016.
- SETHI, J. K. et al. Characterisation of receptor-specific TNF α functions in adipocyte cell lines lacking type 1 and 2 TNF receptors. **FEBS letters**, v. 469, n. 1, p. 77–82, 3 mar. 2000.
- SETHI, J. K.; HOTAMISLIGIL, G. S. Metabolic Messengers: tumour necrosis factor. **Nature metabolism**, v. 3, n. 10, p. 1302–1312, 1 out. 2021.
- SHARMA, R. et al. Growth hormone controls lipolysis by regulation of FSP27 expression. **The Journal of endocrinology**, v. 239, n. 3, p. 289–301, 1 dez. 2018.
- SHARMA, V. M. et al. Growth hormone acts along the PPAR γ -FSP27 axis to stimulate lipolysis in human adipocytes. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 316, n. 1, p. E34–E42, 1 jan. 2019.
- SHI, H.; BARTNESS, T. J. Neurochemical phenotype of sympathetic nervous system outflow from brain to white fat. **Brain Research Bulletin**, v. 54, n. 4, p. 375–385, 1 mar. 2001.
- SHIMANO, H.; SATO, R. SREBP-regulated lipid metabolism: convergent physiology - divergent pathophysiology. **Nature reviews. Endocrinology**, v. 13, n. 12, p. 710–730, 1 dez. 2017.

- SKOGAR, M. et al. Preserved Fat-Free Mass after Gastric Bypass and Duodenal Switch. **Obesity surgery**, v. 27, n. 7, p. 1735–1740, 1 jul. 2017.
- SKOGAR, M. et al. Preserved Fat-Free Mass after Gastric Bypass and Duodenal Switch. **Obesity surgery**, v. 27, n. 7, p. 1735–1740, 1 jul. 2017.
- SONG, Z.; XIAOLI, A. M.; YANG, F. Regulation and Metabolic Significance of De Novo Lipogenesis in Adipose Tissues. **Nutrients**, v. 10, n. 10, 1 out. 2018.
- STEINBERG, D.; HUTTUNEN, J. K. The role of cyclic AMP in activation of hormone-sensitive lipase of adipose tissue. **Advances in cyclic nucleotide research**, v. 1, 1972.
- STIMSON, R. H. et al. Acute physiological effects of glucocorticoids on fuel metabolism in humans are permissive but not direct. **Diabetes, Obesity & Metabolism**, v. 19, n. 6, p. 883, 1 jun. 2017.
- SUN, K.; KUSMINSKI, C. M.; SCHERER, P. E. Adipose tissue remodeling and obesity. **The Journal of clinical investigation**, v. 121, n. 6, p. 2094–2101, 1 jun. 2011.
- SWANSON, K. V.; DENG, M.; TING, J. P. Y. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. **Nature Reviews Immunology 2019 19:8**, v. 19, n. 8, p. 477–489, 29 abr. 2019.
- TAKAHASHI, A.; SHIMAZU, T. Hypothalamic regulation of lipid metabolism in the rat: Effect of hypothalamic stimulation on lipolysis. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 4, n. 3, p. 195–206, 1 set. 1981.
- UYAMA, N.; GEERTS, A.; REYNAERT, H. Neural connections between the hypothalamus and the liver. **The anatomical record. Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology**, v. 280, n. 1, p. 808–820, set. 2004.
- VALENTINE, J. M. et al. β 3-Adrenergic receptor downregulation leads to adipocyte catecholamine resistance in obesity. **The Journal of clinical investigation**, v. 132, n. 2, 18 jan. 2022.
- VAN LOO, G.; BERTRAND, M. J. M. Death by TNF: a road to inflammation. **Nature reviews. Immunology**, v. 23, n. 5, p. 289–303, 1 maio 2023.
- VANDANMAGSAR, B. et al. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. **Nature medicine**, v. 17, n. 2, p. 179–189, fev. 2011.
- VASILEVA, A. et al. Glucagon receptor signaling at white adipose tissue does not regulate lipolysis. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 323, n. 4, p. E389–E401, 1 out. 2022.
- WALLENIUS, V. et al. Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. **Nature Medicine**, v. 8, n. 1, p. 75–79, jan. 2002.

- WANG, E. A. et al. Bone morphogenetic protein-2 causes commitment and differentiation in C3H10T1/2 and 3T3 cells. **Growth factors (Chur, Switzerland)**, v. 9, n. 1, p. 57–71, 1993.
- WANG, M.; WANG, Q.; WHIM, M. D. Fasting induces a form of autonomic synaptic plasticity that prevents hypoglycemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 21, p. E3029–E3038, 24 maio 2016.
- WANG, Q. A. et al. Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. **Nature medicine**, v. 19, n. 10, p. 1338–1344, out. 2013.
- WEDELL-NEERGAARD, A. S. et al. Exercise-Induced Changes in Visceral Adipose Tissue Mass Are Regulated by IL-6 Signaling: A Randomized Controlled Trial. **Cell Metabolism**, v. 29, n. 4, 2019.
- WEISBERG, S. P. et al. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. **The Journal of clinical investigation**, v. 116, n. 1, p. 115–124, 2006.
- WEISBERG, S. P. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **The Journal of clinical investigation**, v. 112, n. 12, p. 1796–808, 15 dez. 2003.
- WEN, H. et al. Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. **Nature Immunology** 2011 12:5, v. 12, n. 5, p. 408–415, 10 abr. 2011.
- WERNSTEDT ASTERHOLM, I. et al. Adipocyte inflammation is essential for healthy adipose tissue expansion and remodeling. **Cell metabolism**, v. 20, n. 1, p. 103–18, 1 jul. 2014.
- WOLFE, B. M.; KVACH, E.; ECKEL, R. H. Treatment of Obesity: Weight Loss and Bariatric Surgery. **Circulation research**, v. 118, n. 11, p. 1844–1855, 27 maio 2016.
- YANG, C. et al. Dexmedetomidine alleviated lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced acute liver injury in mice. **International immunopharmacology**, v. 72, p. 367–373, 1 jul. 2019.
- YANG, Q.; VIJAYAKUMAR, A.; KAHN, B. B. Metabolites as regulators of insulin sensitivity and metabolism. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 19, n. 10, p. 654–672, 13 out. 2018.
- YANG, X. et al. Relative contribution of adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase to tumor necrosis factor- α (TNF- α)-induced lipolysis in adipocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 47, p. 40477–40485, 25 nov. 2011.
- YEH, C. H. et al. Dexmedetomidine reduces lipopolysaccharide induced neuroinflammation, sickness behavior, and anhedonia. **PloS one**, v. 13, n. 1, 1 jan. 2018.
- YOUNG, M. T.; PHELAN, M. J.; NGUYEN, N. T. A Decade Analysis of Trends and Outcomes of Male vs Female Patients Who Underwent Bariatric Surgery. **Journal of the American College of Surgeons**, v. 222, n. 3, p. 226–231, 1 mar. 2016.

ZHANG, H. H. et al. Tumor necrosis factor-alpha stimulates lipolysis in differentiated human adipocytes through activation of extracellular signal-related kinase and elevation of intracellular cAMP. **Diabetes**, v. 51, n. 10, p. 2929–2935, 1 out. 2002.

ZHANG, X. et al. Differential IL18 signaling via IL18 receptor and Na-Cl co-transporter discriminating thermogenesis and glucose metabolism regulation. **Nature communications**, v. 13, n. 1, 1 dez. 2022.

ZHU, Q. et al. Suppressing adipocyte inflammation promotes insulin resistance in mice. **Molecular Metabolism**, v. 39, p. 101010, 1 set. 2020.

ZIMMERMANN, R. et al. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. **Science**, v. 306, n. 5700, 2004.

ZORRILLA, E. P. et al. Interleukin-18 controls energy homeostasis by suppressing appetite and feed efficiency. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 26, p. 11097–102, 26 jun. 2007.

ANEXO A



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado "Participação do receptor 1 do TNF alfa e da IL-18 na redução de adiposidade induzida pelo jejum", protocolo do CEUA: 16/2020 sob a responsabilidade de Adaliene Versiani Matos Ferreira que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 03/03/2020.

Vigência da Autorização	a
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	9
Peso/Idade	28g / 20(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central/UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	9
Peso/Idade	28g / 20(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central/UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo Knockout / C57BL/6
Nº de animais	9
Peso/Idade	28g / 20(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Laboratório de Gnotobiologia e Imunologia
*Espécie/linhagem	Camundongo Knockout / C57BL/6
Nº de animais	9
Peso/Idade	28g / 20(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Laboratório de Gnotobiologia e Imunologia
*Espécie/linhagem	Camundongo Knockout / C57BL/6
Nº de animais	9
Peso/Idade	30g / 20(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Laboratório de Gnotobiologia e Imunologia
*Espécie/linhagem	Camundongo Knockout / C57BL/6
Nº de animais	9
Peso/Idade	30g / 20(semanas)

Sexo	masculino
Origem	Laboratório de Gnotobiologia e Imunologia
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	9
Peso/Idade	25g / 20(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central
*Espécie/linhagem	Camundongo Knockout / TNFR1-/-
Nº de animais	9
Peso/Idade	25g / 20(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Laboratório de Gnotobiologia e Imunologia
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	9
Peso/Idade	25g / 20(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central/UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo Knockout / TNFR1-/-
Nº de animais	9
Peso/Idade	25g / 20(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia/ICB/UFMG / COORDENADOR: Fabíola Mara Ribeiro
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	9
Peso/Idade	25g / 20(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central/UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo Knockout / TNFR1-/-
Nº de animais	9
Peso/Idade	25g / 20(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia/ICB/UFMG / COORDENADOR: Fabíola Mara Ribeiro
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	9
Peso/Idade	25g / 20(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central/UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo Knockout / TNFR1-/-
Nº de animais	9
Peso/Idade	25g / 20(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia/ICB/UFMG / COORDENADOR: Fabíola Mara Ribeiro

*Espécie/linhagem	Camundongo Knockout / IL-18-/-
Nº de animais	9
Peso/Idade	25g / 20(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia/ICB/UFMG / COORDENADOR: Fabíola Mara Ribeiro
*Espécie/linhagem	Camundongo Knockout / IL-18-/-
Nº de animais	9
Peso/Idade	25g / 20(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia/ICB/UFMG / COORDENADOR: Fabíola Mara Ribeiro

Dados dos animais agrupados (uso do biotério)	
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	9
Idade	20(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	18
Idade	20(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central/UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	27
Idade	20(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central/UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo Knockout / C57BL/6
Nº de animais	36
Idade	20(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Laboratório de Gnotobiologia e Imunologia
*Espécie/linhagem	Camundongo Knockout / IL-18-/-
Nº de animais	18
Idade	20(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia/ICB/UFMG / COORDENADOR: Fabíola Mara Ribeiro
*Espécie/linhagem	Camundongo Knockout / TNFR1-/-
Nº de animais	9
Idade	20(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Laboratório de Gnotobiologia e Imunologia

*Espécie/linhagem	Camundongo Knockout / TNFR1-/-
Nº de animais	27
Idade	20(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia/ICB/UFMG / COORDENADOR: Fabíola Mara Ribeiro

Considerações posteriores:

08/05/2023	Pedido de Adendo Aprovado na reunião ordinária online do dia 08/05/2023. Pedido de adendo aprovado para inclusão de oito novos grupos experimentais, totalizando 72 animais.
23/08/2021	Pedido de Adendo Aprovado na reunião ordinária online do dia 23/08/2021. Adendo aprovado para a inclusão de 2 novos grupos experimentais
23/08/2021	Pedido de Adendo Aprovado na reunião ordinária online do dia 23/08/2021. Validade: 23/08/2021 à 22/08/2026. Adendo aprovado para a inclusão de 2 novos grupos experimentais
03/03/2020	Aprovado na reunião do dia 02/03/2020. Validade: 02/03/2020 à 01/03/2025.

Belo Horizonte, 12/03/2024.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
 Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
 Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
 Telefone: (31) 3409-4516

www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br

ANEXO B



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Participação do receptor 1 do TNF e da IL-18 no remodelamento do tecido adiposo induzido pelo tratamento de CL316,243", protocolo do CEUA: 22/2023 sob a responsabilidade de Adaliene Versiani Matos Ferreira que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 17/04/2023.

Vigência da Autorização	17/04/2023 a 16/04/2028
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	9
Peso/Idade	28g / 20(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central/UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	9
Peso/Idade	28g / 20(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central/UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo Knockout / C57BL/6
Nº de animais	9
Peso/Idade	28g / 20(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia/ICB/UFMG / COORDENADOR: Fabíola Mara Ribeiro
*Espécie/linhagem	Camundongo Knockout / C57BL/6
Nº de animais	9
Peso/Idade	28g / 20(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia/ICB/UFMG / COORDENADOR: Fabíola Mara Ribeiro
*Espécie/linhagem	Camundongo Knockout / C57BL/6
Nº de animais	9
Peso/Idade	28g / 20(semanas)
Sexo	masculino

Origem	Biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia/ICB/UFMG / COORDENADOR: Fabíola Mara Ribeiro
*Espécie/linhagem	Camundongo Knockout / C57BL/6
Nº de animais	9
Peso/Idade	28g / 20(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia/ICB/UFMG / COORDENADOR: Fabíola Mara Ribeiro
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	9
Peso/Idade	28g / 20(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Central/UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	9
Peso/Idade	28g / 20(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Central/UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	9
Peso/Idade	28g / 20(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Central/UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	9
Peso/Idade	28g / 20(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Central/UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	9
Peso/Idade	28g / 20(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Central/UFMG

Dados dos animais agrupados (uso do biotério)	
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	18
Idade	20(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central/UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6

Nº de animais	54
Idade	20(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Central/UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo Knockout / C57BL/6
Nº de animais	36
Idade	20(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia/ICB/UFMG / COORDENADOR: Fabiola Mara Ribeiro

Considerações posteriores:

17/04/2023	Aprovado na reunião ordinária on-line do dia 17/04/2023. Validade: 17/04/2023 à 16/04/2028.
------------	---

Belo Horizonte, 12/03/2024.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br