

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Fisiologia e Biofísica

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia

Adma Maciel Babêto

**AVALIAÇÃO DA PLASTICIDADE DO TECIDO ADIPOSEO EM
CAMUNDONGOS MAGROS OU MODERADAMENTE OBESOS SUBMETIDOS AO
JEJUM E REALIMENTAÇÃO**

Belo Horizonte

2023

Adma Maciel Babêto

**AVALIAÇÃO DA PLASTICIDADE DO TECIDO ADIPOSEO EM
CAMUNDONGOS MAGROS OU MODERADAMENTE OBESOS SUBMETIDOS AO
JEJUM E REALIMENTAÇÃO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Fisiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Adaliene Versiani M. Ferreira

Belo Horizonte

2023

043

Babêto, Adma Maciel.

Avaliação da plasticidade do tecido adiposo em camundongos magros ou moderadamente obesos submetidos ao jejum e realimentação [manuscrito] / Adma Maciel Babêto. – 2023.

73 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Adaliene Versiani M. Ferreira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Fisiologia. 2. Obesidade. 3. Jejum. 4. Tecido Adiposo. 5. Metabolismo. I. Ferreira, Adaliene Versiani Matos. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO N° 567 DE ADMA MACIEL BABETTO

Às 14:00 horas do dia 16 do mês de março de 2023, transmitida pela plataforma Microsoft Teams, realizou-se a sessão pública para a defesa da Dissertação de **Adma Maciel Babetto**. A presidência da sessão coube à **Profa. Dra. Adaliene Versiani Matos Ferreira**, orientadora. Inicialmente, a presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **Profa. Dra. Daniella Bonaventura**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, **Profa. Dra. Jacqueline Isaura Alvarez Leite**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, e **Profa. Dra. Adaliene Versiani Matos Ferreira**, Escola de Enfermagem/Universidade Federal de Minas Gerais, orientadora. Em seguida, a candidata fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Dissertação de Mestrado**, intitulada: "**Avaliação da Plasticidade do Tecido Adiposo em Camundongos Magros Ou Moderadamente Obesos Submetidos Ao Jejum e Realimentação**". Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença da candidata e do público e decidiu considerar **APROVADA** a Dissertação de Mestrado. O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pela presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a presidente encerrou a sessão e lavrou o presente ata que, depois de lida, se aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 16 de março de 2023.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Daniella Bonaventura, Professora do Magistério Superior**, em 22/03/2023, às 11:51, 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 **Jacqueline Isaura Alvarez Leite, Professora do Magistério Superior**, em 22/03/2023, às 13:27, 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 27/03/2023, às 10:09, 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 **2134974** e o código CRC **406C18A4**.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha gratidão e carinho à minha orientadora, Adaliene (Dadá), que mudou o curso da minha trajetória acadêmica desde a graduação e contribuiu significativamente para o meu crescimento pessoal e paixão pela pesquisa. Agradeço de coração por toda a paciência, compreensão e investimento em mim. Você é um modelo a ser seguido não apenas por mim, mas por todos nós do grupo Imunometabolismo.

Aos professores do grupo de Imunofarmacologia por abrirem as portas de seus laboratórios para a realização desses experimentos. Em especial, gostaria de agradecer aos professores Mauro Martins Teixeira, Flávio Almeida Amaral e Frederico Soriani, bem como seus alunos, pela valiosa colaboração e contribuição para o sucesso desse trabalho.

Aos técnicos que foram essenciais para a realização deste trabalho. Sem eles, nenhum experimento seria possível. Em particular, gostaria de agradecer a Ilma, Rose, Hermes e Domenico, cuja dedicação e habilidades técnicas foram fundamentais para o sucesso deste projeto.

Às minhas parceiras de bancada e grandes amigas, Amanda e Mariele, por todo o apoio, paciência e disponibilidade para superarmos juntas todos os obstáculos possíveis. O andamento deste projeto só foi possível graças ao trabalho em equipe e colaboração de vocês. Agradeço por todos os momentos de aprendizado e companheirismo, que tornaram essa jornada mais leve.

Ao meu grupo de pesquisa Imunometabolismo que proporcionou, ao longo da minha graduação, o crescimento do meu pensamento científico. Agradeço em especial à Aninha, que sempre esteve presente para auxiliar em qualquer dúvida; à Larisse, que esteve sempre pronta para ajudar - sempre aprendo muito com você; à Gabriela Barbosa, Bruna, Joyce e Francine, companheiras de grupo e também grandes amigas, que sempre auxiliaram quando necessário.

À minha aluna de iniciação científica, Gabriela, por todo o auxílio em todas as etapas do meu projeto, desde o cuidado com os animais até a montagem das minhas placas de PCR.

Às minhas queridas amigas Mara e Marisa, que estavam sempre dispostas a me escutar e me apoiar. Agradeço também aos meus amigos e amigas da graduação - Andressa, Cristiana, Dani, Joyce, Lucas, Mariana e Mary - por todo o apoio que me deram ao longo desses anos de estudo. Sem vocês, essa jornada teria sido muito mais difícil.

Aos meus pais e irmão por sempre terem acreditado em mim e por terem permitido que eu me dedicasse integralmente aos estudos.

Ao meu companheiro de vida, Dennis, que há mais de dez anos tem sido meu apoio constante, me encorajando a seguir em frente e nunca desistir. Agradeço imensamente por estar sempre ao meu lado e por ter contribuído de forma significativa para a realização deste trabalho. Sem você, ele não seria possível.

Às agências financiadoras e ao meu programa de Pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia por terem proporcionado a oportunidade de desenvolver este trabalho de pesquisa.

Aos membros da banca, agradeço pela disponibilidade. As sugestões e críticas apresentadas certamente irão agregar muito ao desenvolvimento da pesquisa e ao aprimoramento dos resultados obtidos.

A todos que me acompanharam nessa jornada, expresso a minha profunda gratidão.

RESUMO

INTRODUÇÃO: Evidências têm demonstrado que o jejum pode ser uma estratégia para redução de adiposidade. Entretanto, ainda existem poucos trabalhos que investiguem a biologia do tecido adiposo após período de jejum e realimentação. **OBJETIVO:** Avaliar o efeito da realimentação após período de jejum no remodelamento e inflamação do tecido adiposo de animais magros e moderadamente obesos. **METODOLOGIA:** Camundongos machos BALB/c com 12 semanas de idade foram divididos em dois grupos experimentais e ambos alimentados durante 8 semanas com dieta padrão (LABINA, magros) ou dieta rica em carboidratos refinados (HC, moderadamente obesos). Na vigésima semana de vida, foram submetidos aos protocolos de jejum por 3h, 24h ou 48h. Os animais submetidos ao jejum de 48h foram posteriormente realimentados por 24h com as dietas padrão ou HC. Em seguida, os camundongos foram anestesiados e posteriormente eutanasiados. O soro, fígado e os tecidos adiposos epididimal, retroperitoneal, mesentérico, inguinal e marrom foram coletados. Parâmetros bioquímicos séricos, peso dos tecidos adiposos, análises histomorfológicas de diferentes tecidos foram realizadas. O mRNA foi isolado dos tecidos epididimal e inguinal e a expressão de genes lipolíticos, lipogênicos e inflamatórios foram avaliados por qPCR. **RESULTADOS:** Animais alimentados com dieta HC apresentaram-se moderadamente obesos, i.e com aumento de adiposidade sem alteração de peso. Além disso, apresentaram alteração no metabolismo da glicose e de lipídios, aumento basal da lipólise, adipocinas e mediadores inflamatórios no tecido adiposo epididimal e inguinal. Tanto em animais magros como os moderadamente obesos, o jejum de 24h não foi suficiente para reduzir a adiposidade. Com o prolongamento do jejum para 48h, os animais magros apresentaram redução da adiposidade acompanhada pelo aumento de fibrose intersticial, da expressão de genes lipolíticos e citocinas inflamatórias no tecido adiposo epididimal e inguinal. Em contrapartida, os animais moderadamente obesos não foram responsivos a perda de adiposidade, sem alteração na expressão de genes lipolíticos e citocinas inflamatórias no tecido adiposo. Nas análises do fígado, após jejum de 48h, as concentrações hepáticas de triglicérides e colesterol, assim como a quantidade de gotículas macrovesiculares, estavam aumentados nos animais magros. Em contrapartida, apesar dos animais moderadamente obesos não apresentaram alterações nas concentrações de triglicérides e colesterol, ocorreu o aumento de gotículas microvesiculares ($< 65 \mu\text{m}^2$) após jejum prolongado, que se manteve no período da realimentação. Após o período da realimentação com dieta padrão por 24h, animais magros apresentaram retorno aos valores basais da adiposidade corporal. Animais moderadamente

obesos realimentados com dieta HC apresentaram aumento da inflamação sistêmica, caracterizada por aumento da concentração de leucócitos, linfócitos, granulócitos, e de pentraxina 3. Em contrapartida, quando os animais moderadamente obesos foram realimentados com dieta padrão, apresentaram atenuação dessa inflamação sistêmica.

CONCLUSÃO: Animais moderadamente obesos são resistentes à perda de adiposidade sob o estímulo do jejum, caracterizando um estado de inflexibilidade inflamatória, marcado pela falha na lipólise e no aumento de mediadores inflamatórios no tecido adiposo. Quando esses animais são realimentados com dieta padrão, não apresentam diferença na adiposidade visceral e subcutânea. Em contrapartida, quando realimentados com dieta HC, apresentam aumento da inflamação sistêmica. Dessa forma, o padrão alimentar “saudável” na realimentação após jejum, independente da perda de peso, foi importante para evitar a inflamação pós-prandial, que por sua vez é ocasionada pela realimentação com dieta não saudável, ou seja, rica em carboidratos refinados.

Palavras-Chave: Obesidade; jejum; realimentação; tecido adiposo; inflexibilidade metabólica

ABSTRACT

INTRODUCTION: Evidence has shown that fasting may be a strategy for reducing adiposity. However, few studies have investigated the biology of adipose tissue after fasting and refeeding. **AIM:** To evaluate the effect of refeeding after fasting on the remodeling and inflammation of adipose tissue in lean and mildly obese mice. **METHODS:** BALB/c male mice were divided into two experimental groups and fed for 8 weeks with a standard diet (LABINA, lean) or a diet high in refined carbohydrates (HC, mildly obese). During the twentieth week of life, they were subjected to fasting protocols for 3h, 24h or 48h. Mice subjected to 48h of fasting were subsequently refed for 24h on a standard or HC diet. The mice were anesthetized and euthanized. Serum and liver, epididymal, retroperitoneal, mesenteric, inguinal, and brown adipose tissues were collected. Serum biochemical parameters, adipose tissue weight, and histomorphological analyses of the different tissues were performed. mRNA was isolated from epididymal and inguinal tissues, and the expression of lipolytic, lipogenic, and inflammatory genes was evaluated using qPCR. **RESULTS:** Mice fed the HC diet were mildly obese, that is, they showed increased adiposity without weight change. Additionally, they presented alterations in glucose and lipid metabolism, basal increases in lipolysis, adipokines, and inflammatory mediators in epididymal and inguinal adipose tissue. In both lean and mildly obese mice, a 24-hour fast was insufficient to reduce adiposity. With the prolongation of fasting to 48 h, lean mice showed a reduction in adiposity accompanied by an increase in interstitial fibrosis, expression of lipolytic genes, and inflammatory cytokines in epididymal and inguinal adipose tissues. In contrast, mildly obese mice were not responsive to adiposity loss, with no change in the expression of lipolytic genes and inflammatory cytokines in the adipose tissue. In liver analyses, after 48-hour fasting, hepatic concentrations of triglycerides and cholesterol, as well as the amount of macrovesicular droplets, were increased in lean mice. In contrast, although mildly obese mice did not show alterations in triglyceride and cholesterol concentrations, there was an increase in microvesicular droplets ($<65 \mu\text{m}^2$) after prolonged fasting, which persisted during the refeeding period. After a 24-hour refeeding period with a standard diet, lean mice returned to baseline values of body adiposity. Mildly obese mice fed the HC diet showed an increase in systemic inflammation, characterized by an increase in leukocyte, lymphocyte, granulocyte, and pentraxin 3 concentrations. However, when mildly obese mice were fed a standard diet, there was an attenuation of this systemic inflammation. **CONCLUSION:** Mildly obese mice are resistant to adiposity loss under fasting stimulus, characterized by a state of inflammatory inflexibility, marked by failure in lipolysis

and increased inflammatory mediators in adipose tissue. When these animals were fed a standard diet, there was no difference in visceral or subcutaneous adiposity. In contrast, when re-fed with an HC diet, they presented with increased systemic inflammation. Therefore, a "healthy" dietary pattern in re-feeding after fasting, regardless of weight loss, was important to prevent postprandial inflammation, which is caused by re-feeding with an unhealthy diet, i.e., rich in refined carbohydrates.

Keywords: Obesity; fasting; refeeding; white adipose tissue; metabolic inflexibility.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Delineamento experimental.....	29
Figura 2. Ganho de peso corporal, ingestão alimentar pós-realimentação e peso dos tecidos após jejum e realimentação.....	35
Figura 3. Alterações histomorfológicas do tecido adiposo de camundongos magros e moderadamente obesos submetidos a jejum e realimentação.....	37
Figura 4. Quantificação e caracterização da fibrose intersticial no tecido adiposo de camundongos machos alimentados com dieta padrão ou rica em carboidratos refinados submetidos a jejum e realimentação.. ..	40
Figura 5. Concentração circulante de metabólitos e adipocinas de camundongos magros e moderadamente obesos submetidos a jejum e realimentação.. ..	42
Figura 6. Avaliação da plasmática de células brancas em camundongos magros e moderadamente obesos após jejum e realimentação.	43
Figura 7. Alterações na expressão de genes lipolíticos e lipogênicos no tecido adiposo de camundongos magros e moderadamente obesos submetidos a jejum e realimentação..	45
Figura 8. Alterações nos padrões inflamatórios de camundongos magros e moderadamente obesos submetidos a jejum e realimentação.....	47
Figura 9. Análise morfológica e perfil lipídico do tecido hepático de camundongos magros e moderadamente obesos submetidos a jejum e realimentação.	49
Figura 10. Inflexibilidade inflamatória em animais moderadamente obesos após jejum e inflamação pós-prandial após realimentação com dieta HC	61

LISTA DE ABREVIATURAS

AGL	Ácido graxo livre
AgRP	Proteína relacionada com agouti
ALT	Alanina aminotransferase
AMPc	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
AST	Aspartato aminotransferase
AT	Tecido adiposo
ATGL	Lipase de triacilglicerol do adipócito
ATM	Macrófagos do tecido adiposo
ATP	Trifosfato de adenosina
BAT	Tecido adiposo marrom
BeAT	Tecido adiposo bege
bWAT	Tecido adiposo marrom interescapular
CAP1	Proteína 1 associada à adenilil ciclase
CAT	Ciclo do ácido tricarboxílico
CCL2	De ligante de quimiciona 2
CD36	Translocase de ácido graxo
CGI58	Enzima de identificação comparativa de genes-58
CLS	Estruturas semelhantes a coroas
DAG	Diacilglicerol
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
EE	Gasto energético
epWAT	Tecido adiposo epididimal
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FABP4	Proteína ligante de ácido graxo 4
GLUT4	Transportador de glicose 4
HC	Dieta rica em carboidratos refinados
HF	Dieta rica em gordura
HIF	Fator induzível por hipóxia
HSL	Lipase sensível a hormônios
IAV	Índice de adiposidade visceral
IFN γ	Interferon-gama
IL	Interleucina
ingWAT	Tecido adiposo subcutâneo inguinal
iNOS	Óxido nítrico sintase
IRS-1	Substrato-1 do receptor de insulina
LABINA	Dieta padrão do laboratório
LepR	Receptor de leptina
LPL	Lipase lipoproteica
LPS	Lipopolissacarídeo
MAG	Monoacilglicerol
MC4-R	O receptor de melanocortina 4
MCP-1	Proteína quimioatraente de monócitos-1
MEC	Matriz extracelular
mesWAT	Tecido adiposo mesentérico
MGL	Da lipase de monoacilglicerol
NF- κ B	Factor nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico

NPY	Neuropeptídeo Y
periWAT	Tecido adiposo periovariano
PKA	Proteína quinase A
PLIN1	Perilipina 1
POMC	Neurônios da pró-opiomelanocortina
PPAR γ	Receptor γ ativado por proliferador de peroxissoma
PTX3	Pentraxina 3
retroWAT	Tecido adiposo visceral retroperitoneal
RI	Receptor de insulina
RQ	Quociente respiratório
SREBP	Fator de transcrição de ligação ao elemento regulador de esterol
TAG	Triacilglicerol
TNF	Fator de necrose tumoral
UCP-1	Proteína desacopladora 1
VLDL	Lipoproteínas de baixa densidade
WAT	Tecido adiposo branco
β -OHB	B-hidroxibutirato

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	14
Biologia do tecido adiposo	14
Disfunção do tecido adiposo branco na obesidade.....	17
Flexibilidade Metabólica e inflamatória: resposta a diferentes condições energéticas	19
OBJETIVOS	26
Objetivo geral	26
Objetivos Específicos	26
MATERIAIS E MÉTODOS	27
Animais e delineamento experimental	27
Modelo de jejum 24h e 48h	27
Coleta das amostras	28
Análise da adiposidade visceral	28
Avaliação hematológica	28
Determinação dos parâmetros séricos	29
Morfometria histológica	30
Quantificação de hidroxiprolina	30
Método de Folch e quantificação de lipídios hepáticos.....	31
Processamento do tecido adiposo para extração de citocinas e ensaio enzimático..	31
Determinação de citocinas e quimiocinas por ELISA.....	31
Reação em cadeia pela polimerase de transcrição reversa quantitativa (RT-qPCR)	31
Análise estatística	32
RESULTADOS.....	33
Resposta distinta à alteração na adiposidade induzida pelo jejum e realimentação em camundongos magros e moderadamente obesos.....	33
Realimentação com dieta padrão favorece a redução de adipócitos hipertróficos no epWAT de animais moderadamente obesos	36
Jejum prolongado promoveu aumento de fibrose apenas no tecido adiposo de animais magros.....	38
Alteração do perfil metabólico em animais moderadamente obesos submetidos ao jejum e realimentação.....	40
Realimentação com dieta HC promove aumento de leucócitos, linfócitos e granulócitos	42
Animais moderadamente obesos não apresentaram aumento da expressão de genes lipolíticos mesmo após jejum prolongado de 48h.....	43

Jejum e realimentação apresentaram respostas inflamatórias distintas entre animais magros e moderadamente obesos.....	45
Jejum induz aumento de gotículas lipídicas em animais magros e moderadamente obesos.....	48
DISCUSSÃO	50
CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

INTRODUÇÃO

Biologia do tecido adiposo

O tecido adiposo (AT) é um órgão altamente capacitado para armazenar o excedente calórico sendo importante reservatório de triacilgliceróis (SMITH; KAHN, 2016). Em situações de privação energética, os adipócitos liberam ácidos graxos que podem ser utilizados por diversos tecidos como substrato energético alternativo à glicose. Além disso, possui função endócrina por meio da secreção de adipocitocinas que apresentam ações sistêmicas (OSBORN; OLEFSKY, 2012). Nas últimas três décadas, o entendimento da fisiologia do AT foi ampliado com a descoberta das adipocinas leptina (ZHANG et al., 1994) e adiponectina (SCHERER et al., 1995; HU; LIANG; SPIEGELMAN, 1996; MAEDA et al., 1996), ambas secretadas pelo tecido adiposo, e que apresentam importante papel na regulação do metabolismo energético e homeostase da glicose. Atualmente, sabe-se que além do tecido adiposo ser um órgão endócrino e metabolicamente dinâmico, também desempenha papel na regulação da inflamação e do sistema imunológico (GHABEN; SCHERER, 2019; ALZAIM et al., 2020).

O tecido adiposo pode ser classificado em três tipos: tecido adiposo branco (WAT), tecido adiposo marrom (BAT) e o tecido adiposo bege (BeAT). O WAT é organizado anatomicamente em depósitos visceral (distribuído na cavidade abdominal) e subcutâneo (localizado sob a pele), e a expansão deles contribui para a obesidade e suas complicações (PELLEGRINELLI; CAROBBIO; VIDAL-PUIG, 2016). Essas duas classes de depósitos adiposos apresentam funções metabólicas diferentes, incluindo a secreção de adipocinas e citocinas inflamatórias, taxas de lipólise e potencial termogênico (GHABEN; SCHERER, 2019). Os depósitos mais estudados em modelos animais são o tecido adiposo subcutâneo inguinal (ingWAT), o tecido adiposo visceral retroperitoneal (retroWAT) posicionado atrás dos rins, tecido adiposo mesentérico (mesWAT) localizado na região intestinal ao redor do órgão, e o gonadal, sendo o epididimal (epWAT) para o modelo animal masculino ou periovariano (periWAT) para o feminino (ZHU et al., 2019). O BAT de camundongos adultos pode ser localizado na área cervical, interescapular, axilar e mediastinal (CHOE et al., 2016).

Os adipócitos marrons e brancos diferem em forma, tamanho e estrutura intracelular de suas organelas. O WAT tem como principal função a reserva energética na forma de triglicérides e seus adipócitos são constituídos por uma gota lipídica (unilocular) que ocupa aproximadamente 90% do volume da célula (FRÜHBECK et al., 2014). A fração do estroma vascular apresenta vários tipos celulares incluindo pré-adipócitos, fibroblastos, células

endoteliais, matriz extracelular (MEC), macrófagos e várias outras células imunes (linfócitos T e B, mastócitos, eosinófilos, neutrófilos e células dendríticas (CANCELLO; CLÉMENT, 2006). A MEC é uma estrutura complexa composta por diferentes proteínas, proteoglicanos e polissacarídeos, que fornece um andaime para as células que modulam processos biológicos como a adesão celular, migração, reparo, sobrevivência e desenvolvimento. O papel da MEC na adesão e sinalização celular nas células é realizado por integrinas, que transduzem sinais através da membrana plasmática para ativar a sinalização intracelular (RUIZ-OJEDA et al., 2019).

O BAT é um órgão termogênico capaz de aumentar o gasto energético para gerar calor e manter a temperatura corporal em ambientes frios. Para isso, possui adipócitos multiloculares, expressão aumentada da proteína desacopladora 1 (UCP1) e é rico em conteúdo mitocondrial (ALZAIM et al., 2020; PELLEGRINELLI; CAROBBIO; VIDAL-PUIG, 2016). Já os adipócitos “bege” multiloculares do BeAT podem se formar sob estimulação adequada, como exposição ao frio ou restrição energética (jejum), e esse processo é denominado "escurecimento" dos adipócitos. Esses adipócitos bege compartilham semelhanças com os adipócitos marrons “clássicos”, contendo gotículas multiloculares e mitocôndrias positivas para UCP1 (WANG; SEALE, 2016).

Vários podem ser os processos sofridos pelo WAT em sua remodelação celular e estrutural, a saber: (1) expansão do tecido através da coordenação do aumento do tamanho dos adipócitos (hipertrofia) e/ou formação de novos adipócitos através da diferenciação de precursores residentes conhecidos como pré-adipócitos (hiperplasia); (2) encolhimento dos adipócitos induzido por jejum/restrrição calórica; (3) recrutamento de células inflamatórias e (4) remodelação da vasculatura e da matriz extracelular (MEC) para permitir adequada expansão tecidual, oxigenação e mobilização de nutrientes (PELLEGRINELLI; CAROBBIO; VIDAL-PUIG, 2016; GHABEN; SCHERER, 2019; VAN BAAK; MARIMAN, 2019)

A formação e diferenciação de adipócitos *de novo* são processos complexos que estão sujeitos à regulação por múltiplas vias de sinalização. Na expansão hiperplásica do tecido adiposo, os pré-adipócitos que estão presentes na fração vascular estromal do WAT podem se desenvolver em adipócitos maduros (VAN BAAK; MARIMAN, 2019). O receptor γ ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR γ), um regulador chave da adipogênese e seu coativador PGC1 α , bem como as vias de sinalização WNT e NOTCH, regulam a indução e a manutenção da adipogênese (MORIGNY et al., 2021). Embora as implicações da hiperplasia dos adipócitos

na função do tecido adiposo não sejam totalmente compreendidas, esse processo reduz o número de adipócitos hipertróficos que secretam fatores pró-inflamatórios, melhorando assim a resistência à insulina (CHOE et al., 2016).

A outra forma de expansão do WAT se dá pela hipertrofia, que é o acúmulo de lipídios em adipócitos pré-existentes (VAN BAAK; MARIMAN, 2019; ALZAIM et al, 2020). Apesar do aumento dos adipócitos serem limitados/controlados pela matriz MEC, à medida que se expandem em tamanho, há aumento do estresse mecânico devido ao contato com as células vizinhas e os componentes da MEC, criando um ambiente com baixa difusão de oxigênio. A disfunção do tecido adiposo induzida por hipóxia é caracterizada por extensa atividade lipolítica e liberação de ácidos graxos livres (AGLs), levando à lipotoxicidade (GHABEN; SCHERER, 2019). Portanto, a hipertrofia demasiada pode ser um fator de estresse caracterizado por micro-hipóxia, estresse do retículo endoplasmático, estímulo à deposição de colágeno/fibrose, com conseqüente aumento da expressão e secreção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo fator de necrose tumoral (TNF), interleucina (IL)-6, IL-8 e proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1) (CHOE et al., 2016; WENSVEEN et al., 2015).

Como dito inicialmente, as adipocinas liberadas pelo WAT funcionam como hormônios que regulam a sensibilidade à insulina, balanço energético, funções do sistema imunológico e homeostase de todo o corpo (ALZAIM et al., 2020). Alguns exemplos de adipocinas incluem leptina, adiponectina e resistina. A leptina, uma das adipocinas mais estudadas, é secretada em resposta à ingestão de alimentos e inibe o apetite por meio da regulação de circuitos neurais localizados no cérebro. A leptina atua em receptores de superfície (LepR) expressos em neurônios da proteína relacionada agouti (AgRP) e do neuropeptídeo Y (NPY) no hipotálamo lateral e neurônios da pró-opiomelanocortina (POMC) no hipotálamo medial. A ativação de LepR aumenta o POMC e diminui a expressão de AgRP nos respectivos neurônios. Ambos os tipos de células se projetam para o núcleo paraventricular (PVN) onde o receptor de melanocortina 4 (MC4-R) é inibido por AgRP e estimulado pelo hormônio estimulante de α -melanócitos, um produto derivado do POMC. A sinalização da melanocortina diminui a ingestão de alimentos e impulsiona a atividade do sistema nervoso simpático. A leptina circulante é elevada na obesidade, mas a resistência hipotalâmica à leptina agrava a obesidade através da inibição do controle do apetite e oxidação lipídica (CHOE et al., 2016; LARABEE; NEELY; DOMINGOS, 2020).

A adiponectina exerce efeitos antiobesidade e antidiabéticos, e alivia a resistência à insulina estimulando a oxidação lipídica e as respostas anti-inflamatórias. Existem dois receptores principais para adiponectina: AdipoR1 e AdipoR2. Ambos os receptores ativam a proteína quinase ativada por AMP (AMPK), promovendo a captação de glicose nas células musculares via translocação do transportador de glicose 4 (GLUT4) para a membrana celular (ALZAIM et al., 2020; CHOE et al., 2016). Os efeitos anti-inflamatórios da adiponectina devem-se à sua ação inibitória do NF- κ B e a supressão de macrófagos do tipo M1, enquanto promove a polarização de macrófagos do tipo M2 com consequente aumento da produção de interleucina IL-10 e IL-1Ra (WENSVEEN et al., 2015).

A adipocina resistina apresenta ações pró-inflamatórias que são mediadas pela proteína 1 associada à adenilil ciclase (CAP1), que é o receptor responsável por mediar a ação inflamatória dos monócitos (LEE et al., 2014a). A ligação da resistina ao CAP1 regula positivamente a concentração de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC), a atividade da proteína quinase e a transcrição relacionada ao NF- κ B (ALZAIM et al., 2020; BOOTH et al., 2016). A resistina também estimula as células endoteliais a secretar MCP-1 (COELHO; OLIVEIRA; FERNANDES, 2013).

Além das adipocinas citadas anteriormente, a importância de outras já foram identificadas, podendo citar como exemplos: lipocalina 2, envolvida na regulação da inflamação, transporte de AGs e remodelamento vascular; a proteína 5 secretada relacionada ao frizzled (SFRP5), regula a expressão de citocinas pró-inflamatórias inibindo a sinalização do membro da família Wingless-type 5a (Wnt5a); a asprosinina aumenta o consumo alimentar e o peso corporal por meio da ativação da AgRP; a quemerina está aumentada em indivíduos obesos e esse aumento está relacionado com a redução da sinalização de insulina no WAT (OUCHI et al., 2011; UNAMUNO et al., 2018; DOS SANTOS et al., 2021).

Disfunção do tecido adiposo branco na obesidade

A obesidade é resultado do desequilíbrio entre a ingestão calórica e o gasto energético, sendo caracterizada como uma doença inflamatória de baixa intensidade que contribui para a ativação de vias de sinalização inflamatórias (HOTAMISLIGIL, 2006; CASTRO; MACEDO-DE LA CONCHA; PANTOJA-MELÉNDEZ, 2017). O acúmulo excessivo de gordura está ligado ao aumento de várias doenças crônicas, como DM2, doenças cardiovasculares e câncer (ALZAIM et al., 2020). No primeiro estudo que buscou evidenciar a relação do aumento de adiposidade e inflamação, verificou-se que o WAT de roedores e indivíduos obesos apresentam

alterações inflamatórias e concentrações aumentadas da citocina pró-inflamatória TNF (HOTAMISLIGIL; SHARGILL; SPIEGELMAN, 1993).

Trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa demonstrou que o consumo de dietas ricas em carboidratos refinados (HC), especialmente os de alto índice glicêmico, tem como consequência o desenvolvimento da obesidade, caracterizada pela hipertrofia dos adipócitos e ativação de inflamação de baixa intensidade (OLIVEIRA et al., 2013). O consumo dessa dieta pode levar à hiperglicemia, que por sua vez ativa vias que promovem a inflamação, e ao acúmulo de gordura em órgãos, como fígado e músculos, desencadeando distúrbios metabólicos (OLIVEIRA et al., 2015). Outros modelos de dieta, como a dieta rica em gorduras (HF), também podem levar a disfunção metabólica caracterizada pelo aumento de adiposidade, alteração no metabolismo da glicose, polarização de macrófagos do tipo 1 e aumento de mediadores inflamatórios (LUMENG; BODZIN; SALTIEL, 2007; SCHOFIELD et al., 2017; RASINENI et al., 2021). Assim, a expansão exacerbada da massa adiposa ocasiona múltiplas consequências metabólicas, incluindo a desregulação das citocinas secretadas pelo tecido adiposo (LONGO et al., 2019), redução da função mitocondrial, comprometimento da sinalização da insulina e taxas mais altas de lipólise basal, que podem eventualmente levar a lipotoxicidade (HACZEYNI; BELL-ANDERSON; FARRELL, 2018; KOSTELI et al., 2010).

A inflamação crônica de baixa intensidade que ocorre na obesidade é caracterizada pela produção do ligante de quimiona 2 (CCL2), conhecido também por MCP-1, que atua em células imunes, como os macrófagos, atraindo-os para o tecido adiposo (CASTRO; MACEDO-DE LA CONCHA; PANTOJA-MELÉNDEZ, 2017). Esse processo, conhecido como quimiotaxia, leva ao acúmulo de células imunes no tecido adiposo, com especial acúmulo do infiltrado de macrófagos. Os macrófagos do tecido adiposo (ATMs) reagem a uma grande variedade de estímulos externos e são didaticamente divididos em M1 (classicamente ativado) e tipo M2 (alternativamente ativado) (DWAIB et al., 2021). Os ATMs do tipo M1 expressam óxido nítrico sintase (iNOS), TNF, IL-1 β , e CD11c na superfície de sua célula, sendo um dos maiores contribuidores para a inflamação do tecido adiposo na obesidade (UNAMUNO et al., 2018). Dessa forma, eles se associam a estruturas semelhantes a coroas (CLS), que representam macrófagos fagocitando ativamente adipócitos apoptóticos com o aumento concomitante da produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, bem como espécies reativas de oxigênio (ERO) (DWAIB et al., 2021). A polarização dessa classe de ATMs é induzida por IFN γ ou lipopolissacarídeo (LPS). No tecido adiposo, IFN γ é predominantemente expresso em

células do tipo T, particularmente células Th1 e CD8 (WENSVEEN et al., 2015; UNAMUNO et al., 2018).

Em contrapartida, macrófagos do tipo M2 expressam arginase, que sequestra arginina da enzima iNOS, inibindo, por sua vez, a geração de óxido nítrico e suprimindo a função do macrófago do tipo M1. Além disso, macrófagos do tipo M2 secretam a citocina anti-inflamatória IL-10 e IL1-Ra (RATH et al., 2014; CHOE et al., 2016). Vários estudos mostraram que a inflamação induzida pela obesidade está associada ao aumento nos ATMs do tipo M1 e a diminuição do tipo M2 no tecido adiposo (LUMENG; BODZIN; SALTIEL, 2007; PELLEGRINELLI; CAROBIO; VIDAL-PUIG, 2016; SCHEITHAUER et al., 2020). Ademais, ambos os tipos de macrófago, M1 e M2, parecem possuir papel no processo de fibrose. A hiperativação de macrófagos do tipo M1 no tecido adiposo obeso, pode estimular a fibrose, que é caracterizada pelo excesso de deposição de MEC e destruição estrutural, resultando em disfunção do tecido (WANG et al., 2020). Da mesma forma, ativação excessiva de ATM do tipo M2, pode levar a produção de TGF β e fatores de crescimento que promovem a proliferação de miofibroblastos, que são células efectoras de fibrogênese, e consequente deposição de MEC (BRAGA; AGUDELO; CAMARA, 2015).

A hipertrofia dos adipócitos também promove a redução da densidade capilar do tecido adiposo. A alteração da densidade capilar em conjunto com o aumento da distância de difusão reduz a pressão parcial de oxigênio ao redor dos adipócitos hipertróficos, ocasionando a hipóxia celular (HACZEYNI; BELL-ANDERSON; FARRELL, 2018). A resposta à hipóxia é amplamente mediada por fatores induzíveis por hipóxia (HIFs). Existem duas subunidades de HIF 1 α e 2 α , sendo que ambos apresentam diferentes respostas. Na homeostase da arginina, o HIF-1 α induz a expressão de iNOS, aumentando a produção de óxido nítrico (NO). Em contrapartida, o HIF-2 α estimula a expressão de arginase e suprime a produção de NO (LEE et al., 2014b). Dessa forma, em conjunto, tanto a hipóxia quanto a inflamação induzem uma expansão patológica da MEC, com recrutamento de macrófagos e aumento da expressão de proteínas, como colágenos (RUIZ-OJEDA et al., 2019).

Flexibilidade Metabólica e inflamatória: resposta a diferentes condições energéticas

Andres e colaboradores, em 1956, estabeleceram a técnica de calorimetria indireta. A técnica permite medir a oxidação da glicose e ácidos graxos por meio do quociente respiratório (RQ) durante condições pós-absortivas (ANDRES; CADER; ZIERLER, 1956). Por meio dessa

técnica, foi possível demonstrar que a transição do estado de jejum para o estado alimentado é marcada por mudanças na seleção de substrato energético, ou seja, na oxidação de ácidos graxos para a oxidação de glicose. Posteriormente, Kelley e colaboradores demonstraram que o músculo esquelético de indivíduos magros mostrava capacidade notável de adaptar a preferência de substratos energético ao jejum e infusões de insulina, sendo essa adaptação denominada “flexibilidade metabólica” (KELLEY et al., 1999).

O jejum é uma prática milenar incorporada por muitos grupos religiosos (muçulmanos, cristãos, judeus, budistas, etc.). No meio do século passado, iniciou-se o estudo do jejum como prática terapêutica, objetivando a redução de peso. A prática do jejum consiste em abstinência voluntária de alimento por determinado período de tempo, alternando entre intervalos de ausência do consumo alimentar e de realimentação (LONGO; MATTSON, 2014; JOHNSTONE, 2015). Alguns trabalhos sugerem que o jejum pode ser uma estratégia para diminuição de gordura corporal e redução do tamanho dos adipócitos (KIM et al., 2017; PARK et al., 2020; PATIKORN et al., 2021). Além disso, essa estratégia estimula respostas celulares adaptativas, promovendo a atenuação do estresse celular, modificando a secreção de adipocinas e aumento da lipólise via sinalização beta adrenérgica. Em vista disso, o jejum pode desempenhar um papel importante no tratamento da obesidade e de distúrbios metabólicos (GEISLER et al., 2016; ANTON et al., 2018; VAN BAAK; MARIMAN, 2019).

Diversas são as formas descritas na literatura da prática de jejum, sendo os protocolos mais utilizados: (i) alimentação com tempo restrito (definida janela de ingestão alimentar, de 12 a 20 horas), (ii) jejum intermitente (incluindo jejum em dias alternados ou jejum de 2 dias por semana, por exemplo) e (iii) jejum periódico (com duração de três dias ou mais a cada 2 ou mais semanas) (LONGO; MATTSON, 2014; OKAWA; NAGAI; HASE, 2021). Ademais, a escolha do protocolo de jejum pode variar com base no protocolo da dieta alimentar seguida, na população clínica-alvo e na quantidade de perda de peso desejada (GOTTHARDT; BELLO, 2017; TANG et al., 2017). Em modelo animal, os protocolos mais utilizados são de 12h, 18h, 24h e 48h de jejum, com água *ad libitum* (JENSEN et al., 2013; MATTSON et al., 2018).

No período de jejum, o balanço energético negativo reduz as concentrações plasmáticas de glicose, ocorrendo estímulo das células α pancreáticas a secretarem glucagon. O glucagon inibe a síntese de glicogênio ativando a adenilato ciclase, que aumenta as concentrações de AMPc. O AMPc então ativa a proteína quinase A (PKA), que por sua vez fosforila e inativa a glicogênio sintase, a enzima responsável pela síntese de glicogênio. Como resultado, a síntese

hepática de glicogênio é inibida e a glicose é convertida em glicose-6-fosfato e liberada na corrente sanguínea, ajudando a aumentar as concentrações de glicose no sangue (JIANG; ZHANG, 2003). Ademais, o aumento da concentração de glucagon promove a glicogenólise que, no fígado, depleta os estoques hepáticos de glicogênio para obtenção de glicose para tecidos extra-hepáticos (PETTA et al., 2016).

Com o prolongamento do tempo de jejum, os estoques de glicogênio hepático são esgotados e a lipólise de triacilgliceróis nos adipócitos gera AGLs para serem utilizados como substrato energético (MATTSON et al., 2018). No tecido adiposo, a lipólise é induzida principalmente por catecolaminas advindas de nervos simpáticos locais ao invés das glândulas adrenais via circulação geral. Esse processo é mediado por neurônios simpáticos que inervam os adipócitos, formando junções neuroadiposas que induzem diretamente a quebra da gordura do adipócito (YOUNGSTROM; BARTNESS, 1995; ZENG et al., 2015). Deste modo, o aumento do tônus simpático promove a liberação da catecolamina norepinefrina que se liga na junção neuroadiposa aos receptores beta-adrenérgicos da membrana plasmática dos adipócitos. Esses receptores são acoplados a proteínas Gs que transmitem um sinal estimulador para a adenilil ciclase para gerar AMPc (LAFONTAN, 2005). O AMPc liga-se à PKA, fazendo com que as subunidades regulatórias se dissociem das subunidades cataliticamente ativas, resultando em aumento da atividade da enzima. A PKA ativa a ação lipolítica das lipases de triacilglicerol do adipócito (ATGL) e lipase sensível a hormônios (HSL) por diferentes mecanismos. Para ocorrer o processo de hidrólise sequencial, a PKA irá catalisar a fosforilação da perilipina 1 (PLIN1) na gotícula lipídica, resultando na liberação da enzima de identificação comparativa de genes-58 (CGI58), permitindo a interação da enzima com a ATGL. Concomitantemente, a PKA catalisa diretamente a polifosforilação de HSL do citosol, permitindo a translocação da lipase para a membrana da gotícula lipídica, onde estará associada com a proteína ligante de ácido graxo 4 (FABP4) e poderá interagir com a PLIN1 (DUNCAN et al., 2007; FRÜHBECK et al., 2014). A FABP4 também participa do tráfego de ácidos graxos do local de hidrólise (ou seja, a gotícula lipídica) para a membrana plasmática. A PLIN1 é a responsável por coordenar o acesso de enzimas à gotícula lipídica de uma forma que responda ao estado metabólico do adipócito, aumentando a área de superfície disponível para as lipases terem acesso aos triglicérides armazenado na gota lipídica (FRÜHBECK et al., 2014).

Os triacilgliceróis (TAGs) serão hidrolisados sequencialmente em diacilgliceróis (DAGs) e monoacilgliceróis (MAGs) pela ação das ATGL, HSL e da lipase de monoacilglicerol (MGL). Em cada etapa, um único AG é liberado e, na etapa final, o MAG é

hidrolisado para liberar o AG final e o glicerol (PAPACKOVA; CAHOVA, 2015). O glicerol é liberado dos adipócitos por meio de uma molécula de transporte do tipo aquaporina e deve ser transportado de volta ao fígado para uso na oxidação ou gliconeogênese (SMITH; KAHN, 2016). Já os ácidos graxos são imediatamente ligados à albumina e transportados na corrente sanguínea para o fígado, onde são metabolizados por β -oxidação para produzir as cetonas β -hidroxibutirato (β -OHB) e acetoacetato (COELHO; OLIVEIRA; FERNANDES, 2013; ANTON et al., 2018). Os corpos cetônicos são liberados e transportados em grandes quantidades para as células com alta atividade metabólica (células musculares e neurônios), onde são metabolizadas em acetil coenzima A, que então entra no ciclo do ácido tricarboxílico (CAT) na mitocôndria, para gerar trifosfato de adenosina (ATP). Por meio desses processos fisiológicos, as cetonas servem como fonte de energia para sustentar a função das células musculares e cerebrais durante o jejum e períodos prolongados de esforço/exercício físico (ANTON et al., 2018; MATTSON et al., 2018; KOLB et al., 2021).

A fase de realimentação é o processo de reintrodução de alimentos após um período de jejum. A realimentação apresenta diferentes efeitos no corpo, dependendo da duração e tipo de jejum, bem como da composição da dieta de realimentação (GOSMAIN et al., 2005). Quando a realimentação ocorre após um período de jejum prolongado, há o aumento das concentrações plasmáticas de glicose e triacilglicerol. Como consequência, ocorre a redução da produção de corpos cetônicos e da síntese de glucagon pelas células α do pâncreas. Já as células β do pâncreas secretam insulina, que irá se ligar ao receptor de insulina (RI) em diversas células (LONGO; MATTSON, 2014). Nos adipócitos e nas células musculares a sinalização da insulina estimula a translocação de GLUT4 para a membrana do adipócito, permitindo a captação de glicose da corrente sanguínea para o interior dessas células (O'NEILL; KISHTON; RATHMELL, 2016; RODEN; SHULMAN, 2019). Já no fígado, o GLUT2 regula o efluxo de glicose nos hepatócitos, estimulando a síntese de glicogênio pela glicogênio sintase (RUI, 2014).

Ademais, no estado alimentado, a insulina estimula a lipogênese *de novo* no fígado e tecido adiposo, além de aumentar a atividade da lipase lipoproteica (LPL). Dessa forma, os adipócitos captam ácidos graxos transportados em lipoproteínas de baixa densidade (VLDL) e quilomícras. Após a captação e internalização dos ácidos graxos e glicerol pela translocase de ácido graxo (CD36) e aquaporina no adipócito, eles serão reesterificados em glicerol-3-fosfato para formar triacilglicerol e armazenados em uma grande gota lipídica intracelular (HIBUSE et al., 2006; MORIGNY et al., 2021).

No momento da realimentação, existem fatores de transcrição que modulam a lipogênese no tecido adiposo. Um desses fatores é o fator de transcrição de ligação ao elemento regulador de esterol (SREBP), que quando em sua isoforma 1c, apresenta papel importante na regulação da lipogênese (biossíntese de gordura) no WAT (KOBAYASHI et al., 2018). No WAT, o SREBP-1c é ativado pela insulina e outros sinais que promovem o armazenamento de energia na forma de gordura (SHIMOMURA et al., 1998). Já foi demonstrado que a composição da dieta é capaz de modular a expressão de SREBP-1 no tecido adiposo. Em estudo de Ferreira e colaboradores (2014), camundongos alimentados com a dieta rica em carboidratos refinados (HC) apresentaram altos níveis da expressão de SREBP-1, enquanto o mesmo não ocorreu nos animais alimentados com dieta rica em gordura (HF). Ademais, o estado pós-prandial também parece modular a expressão de SREBP-1c, uma vez que animais realimentados após jejum de 72h apresentaram aumento da sua expressão no tecido adiposo (TANG et al., 2017).

Nos últimos anos, diversos estudos têm buscado entender as adaptações imunológicas induzidas pelo jejum (FAZELI et al., 2020; FLACH et al., 2013; LIU et al., 2019a; WERNSTEDT ASTERHOLM et al., 2014). Em estudo de Kosteli et al. (2010), animais submetidos ao jejum de 24h apresentaram acúmulo de ATMs e aumento de AGL sérico. Dessa forma, os autores hipotetizaram que a perda de peso induz um estado transitório de inflamação no tecido adiposo. Essa inflamação transitória ocorreria pois os ATMs absorveriam os AGLs liberados pelos adipócitos. Esse fenômeno parece contribuir para a prevenção da lipotoxicidade, fornecendo assim proteção ao tecido adiposo. Nesse contexto, aparentemente, a resposta inflamatória aguda seria essencial para a proteção e remodelação do tecido adiposo. Isso facilitaria o retorno a uma homeostase metabólica que, posteriormente, permitiria que a inflamação atingisse a resolução em vez de se tornar crônica (WERNSTEDT ASTERHOLM et al., 2014).

O aumento fisiológico transiente da inflamação em resposta ao novo ambiente metabólico proporcionado pelo jejum é chamado de “*immunological fitness*” (ASTERHOLM et al., 2012), ou como chamaremos neste trabalho, flexibilidade inflamatória. Em estudo anterior do nosso grupo de pesquisa, animais magros submetidos ao desafio de jejum apresentaram aumento de IL-6, TNF, IL-10, TGF- β e CXCL-1 no tecido adiposo. Em contrapartida, animais moderadamente obesos, alimentados com dieta HC, não apresentaram alteração nos mediadores inflamatórios durante o jejum e, por sua vez, apresentaram menor redução da adiposidade (LACERDA et al., 2019a). Sendo assim, em concordância com outros

trabalhos, nosso grupo de pesquisa tem trabalhado com a hipótese de que ocorra uma “inflexibilidade inflamatória” na obesidade que pode impactar em prejuízo na redução da adiposidade quando estimulada pelo jejum ou restrição alimentar.

Apesar da literatura apresentar resultados positivos no emprego do jejum para o tratamento da obesidade, existem poucos trabalhos que abordam as adaptações do tecido adiposo durante o período de realimentação, e ainda, se o tipo de dieta ofertada no período apresenta impacto na adiposidade. Tang et al. (2017) demonstraram o papel do jejum e da realimentação na distribuição do tecido adiposo de camundongos. Os autores propuseram que o jejum consome preferencialmente o tecido adiposo visceral, enquanto a realimentação de 72h recupera predominantemente o tecido adiposo subcutâneo. Esses resultados indicaram que os depósitos adiposos apresentam diferentes plasticidades frente ao estímulo do jejum e realimentação (TANG et al., 2017). Entretanto, ainda são escassos trabalhos que avaliaram o efeito da realimentação pós-jejum no remodelamento e inflamação do tecido adiposo.

Ademais, ainda não está esclarecido quais os sítios de tecido adiposo seriam preferencialmente restaurados após a realimentação, e se o tipo de dieta oferecida na realimentação interferiria nessa resposta. De fato, é sabido que a realimentação determina uma resposta inflamatória pós prandial a depender, inclusive, da composição da dieta (MAGNÉ et al., 2010; MENESES et al., 2011; DIMINA; MARIOTTI, 2019). Em trabalho anterior do nosso grupo, demonstramos que camundongos BALB/c realimentados com diferentes tipos de dieta (AIN 93 ou dieta rica em frutose), apresentaram uma resposta inflamatória de baixo grau caracterizada por aumento do número de leucócitos e altas concentrações séricas de pentraxina 3, leptina e resistina. Ainda, os animais alimentados com frutose apresentaram uma resposta inflamatória mais intensa (RODRIGUES et al., 2014). Dessa forma, é sugerido que o tipo de dieta ofertada no período pós-prandial pode ocasionar em uma maior ou menor resposta inflamatória pós-prandial.

Esse trabalho dá seguimento à linha de pesquisa do nosso grupo que vem estudando o papel da inflamação no remodelamento do tecido adiposo em diversos contextos, especialmente o efeito da obesidade induzida por dieta rica em carboidratos refinados (FERREIRA et al., 2014; MENEZES-GARCIA et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2015, 2013; GOMES et al., 2018) e o jejum (LACERDA et al., 2019a). Portanto, com o presente estudo buscamos inicialmente compreender a resposta do tecido adiposo após 24 ou 48 horas de jejum em animais magros ou

moderadamente obesos, e o posterior efeito da realimentação com dieta padrão (“*healthy*”) ou dieta HC (“*unhealthy*”).

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar o efeito da realimentação após período de jejum no remodelamento e inflamação do tecido adiposo de animais magros e moderadamente obesos.

Objetivos Específicos

1. Padronizar um protocolo adequado que permita avaliar o efeito da realimentação de animais em jejum no remodelamento do tecido adiposo;
2. Em animais magros e moderadamente obesos avaliar:
 - i. as alterações morfológicas e imunometabólicas da realimentação com dieta padrão ou rica em carboidratos refinados;
 - ii. os efeitos da realimentação com dieta padrão ou rica em carboidratos refinados nas expressões dos genes lipolíticos e lipogênicos do tecido adiposo;
 - iii. os efeitos da realimentação com dieta padrão ou rica em carboidratos refinados nos padrões de vias oxidativas;
 - iv. os efeitos da realimentação com dieta padrão ou rica em carboidratos refinados na inflamação do tecido adiposo epididimal e inguinal;
 - v. as alterações morfológicas e metabólicas no fígado após realimentação com dieta padrão ou rica em carboidratos refinados.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais e delineamento experimental

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais, sob o protocolo 93/2020, em anexo. Os animais utilizados no estudo foram camundongos machos da linhagem BALB/c, com 12 semanas de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e alojados em grupos de 6 animais em gaiolas convencionais forradas com maravalha. O peso corporal (individualmente) e o consumo alimentar (por gaiola) foram mensurados semanalmente. Os animais foram mantidos em uma sala com temperatura controlada ($25,4^{\circ}\text{C}\pm 3,4^{\circ}\text{C}$) com ciclo claro-escuro de 12h (luz acessa às 7h = ZT 0; luz apagada às 19h = ZT 12) e foram alimentados com a dieta estabelecida e água *ad libitum*.

Os animais foram divididos, e alimentados durante 8 semanas, em dois grupos, um magro alimentado com dieta padrão do laboratório (LABINA[®]) ou outro grupo alimentado com dieta rica em carboidratos refinados (HC; Figura 1A). A dieta HC tem composição de 45% leite condensado, 10% de açúcar refinado e 45% de farelo de ração LABINA[®]. A composição da dieta LABINA é de 65,8% carboidrato, 3,1% lipídeo e 31,1% proteína (4,0 kcal/g). Já a composição de macronutrientes da dieta HC é de 74,2% carboidrato, 5,8% lipídeo e 20,0% proteína (4,4 kcal/g). A análise da dieta HC revelou que ela continha pelo menos 30% de açúcares refinados (principalmente sacarose), mostrando que contém maior concentração de carboidrato refinado. Os animais alimentados com dieta HC apresentaram aumento de adiposidade sem aumento de peso corporal. Devido aos resultados obtidos, os animais alimentados com dieta padrão foram chamados de magros e os alimentos com dieta HC de moderadamente obesos.

Modelo de jejum 24h e 48h e realimentação de 24h

Com 20 semanas de idade, os animais magros ou moderadamente obesos foram aleatoriamente designados para grupos Controle (correspondente a 3h de jejum; *ad libitum*), jejum de 24 horas ou 48h de jejum (Fig. 1B). Os resultados preliminares indicaram que o jejum por 24 horas não determinou alterações importantes na redução do tecido adiposo de animais magros ou moderadamente obesos, tanto no visceral (Fig. 2C) como no inguinal (Fig 2J). Sendo assim, decidimos avaliar o efeito da realimentação no remodelamento do tecido adiposo apenas após jejum prolongado de 48h (Fig. 1C).

Para a avaliação da realimentação, com 20 semanas de idade, animais magros e moderadamente obesos foram submetidos a 48h de jejum com posterior realimentação de 24h. Animais magros foram realimentados com dieta padrão, enquanto animais moderadamente obesos foram realimentados com dieta padrão ou dieta HC.

Camundongos nos grupos de jejum de 24 e 48 horas tiveram privação total de comida e acesso *ad libitum* à água. Todas as gaiolas foram trocadas antes da indução do jejum. A composição corporal (individualmente) e o consumo alimentar (por gaiola) foram registrados antes e após o protocolo de jejum e realimentação. O período de eutanásia foi padronizado entre os ZT 1 e ZT 3. Os animais foram eutanasiados após 24 ou 48h de jejum ou ainda, no caso dos animais submetidos à 48h de jejum após realimentarem por 24h com as dietas padrão ou HC (Fig 1C).

Coleta das amostras

Após anestesia por injeção intraperitoneal (cetamina 80 mg/kg-xilazina 10 mg/kg), os animais foram eutanasiados pelo método de exsanguinação. Em seguida foram retirados o fígado, o músculo gastrocnêmio e os tecidos adiposos epididimais (epWAT), tecido adiposo retroperitoneal (retroWAT), tecido adiposo mesentérico (mesWAT), tecido adiposo subcutâneo inguinal (ingWAT) e tecido adiposo marrom interescapular (bWAT). Todos os tecidos foram imediatamente congelados utilizando nitrogênio líquido ou utilizados para análises histomorfométricas (acondicionadas em solução de formol a 4%). Amostras de sangue para extração do soro foram coletadas para análises posteriores. Todas as amostras foram armazenadas em freezer -80°C.

Análise da adiposidade visceral

Após a coleta e mensuração do peso dos depósitos viscerais (epWAT, retroWAT e mesWAT), o índice de adiposidade visceral (IAV) foi avaliado pela seguinte fórmula: $(epWAT+retroWAT+mesWAT \times 100 \div \text{peso corporal})$.

Avaliação hematológica

O número de leucócitos e plaquetas circulantes foi determinado em amostras de sangue coletadas em tubos contendo EDTA, posteriormente plaqueadas e analisadas no hemocítmetro Celltac MEK-6500K (Nihon Kohden). Posteriormente, o sangue foi centrifugado a 3.000 g, por 10 minutos, a 4°C.

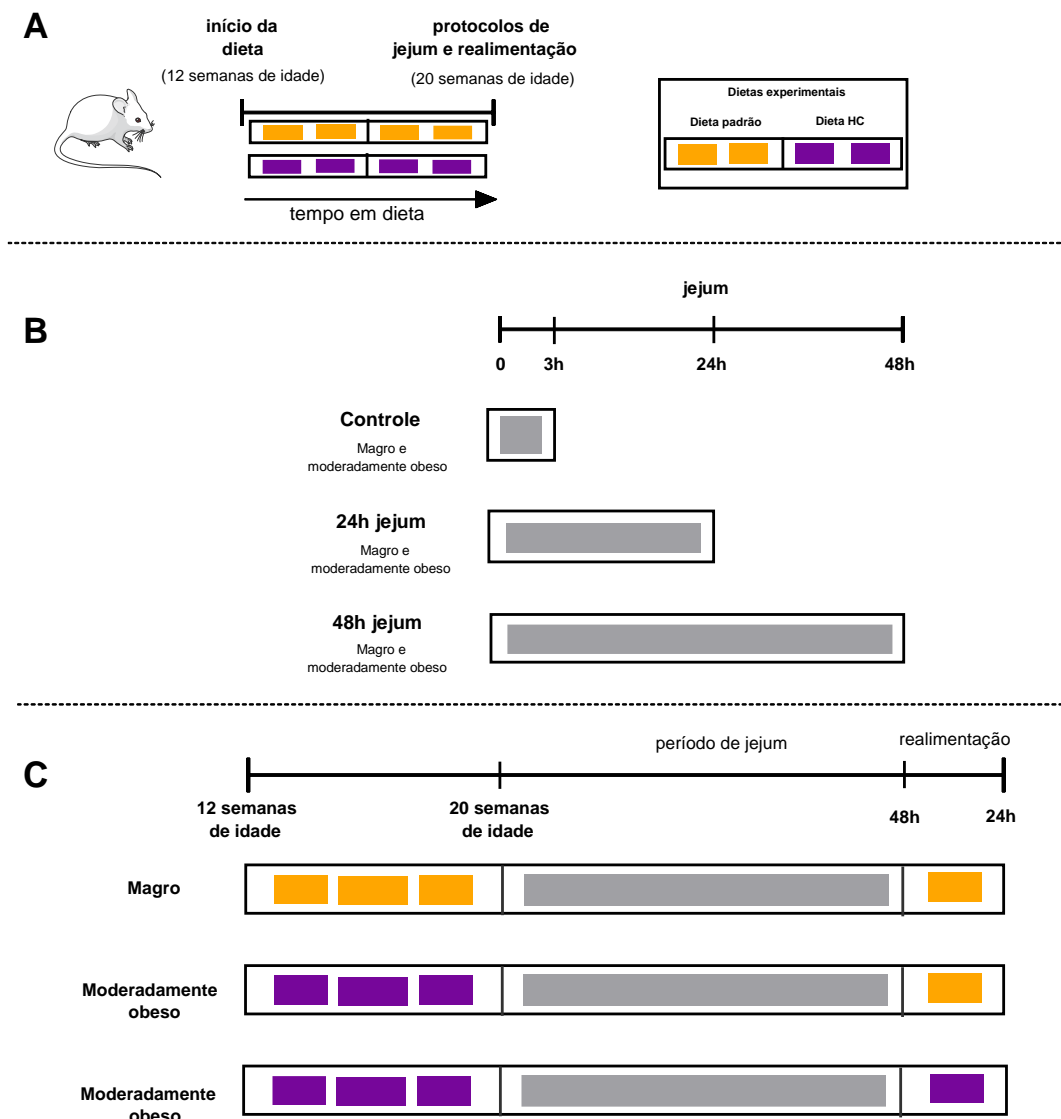


Figura 1. Delineamento experimental. (A) Camundongos BALB/c com 12 semanas de idade foram alimentados com dieta padrão (LABINA) ou rica em carboidratos refinados (HC) por 8 semanas. (B) Os animais foram divididos em grupos *ad libitum* (controle), jejum de 24 horas, jejum de 48 horas (C) ou jejum de 48 horas seguido por 24 horas de realimentação com a mesma dieta ou dieta diferente. Todos os animais foram sacrificados no mesmo tempo.

Determinação dos parâmetros séricos

As concentrações séricas de glicose, colesterol total, triglicérides, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) foram avaliadas usando kits enzimáticos (Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brasil). As concentrações séricas de pentraxina 3 (PTX3) e das adipocinas, adiponectina, resistina e leptina foram determinados por ELISA (R&D Systems Europe Ltd., Abington, UK), foi utilizado soro nas diluições 1:10, 1:15000, 1:100 e 1:2, respectivamente. Os ácidos graxos livres não-esterificados foram quantificados no soro usando método colorimétrico enzimático (Wako Life Sciences, Inc., Mountain View, CA,

EUA). A leitura absorvância das amostras foi realizada em um comprimento de onda de 550 nm em espectrofotômetro.

Morfometria histológica

Após as porções do epWAT, ingWAT e fígado serem fixadas por 72h com formol tamponado a 4%, elas foram adicionadas a uma solução de álcool 70% por 24h. Ao término do 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 em que 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.

A coloração com H&E (Hematoxilina-Eosina) foi utilizada para avaliação morfológica. Imagens de 6-8 campos/animal do epWAT e ingWAT de cada animal foram capturadas usando uma câmera digital acoplada a um microscópio (Obj 40x). Para a quantificação das fibras de colágeno foi utilizada a coloração Tricômico de Masson. Imagens de 2-3 campos/animal dos tecidos epWAT e ingWAT de cada animal foram capturadas (Obj 4x). A quantificação da área de superfície dos adipócitos (µm²) e das fibras de colágeno foram realizadas utilizando o *software* Image J (Instituto Nacional de Saúde, Bethesda, MD, EUA). O tamanho médio dos adipócitos foi obtido por meio da medida da área de >150 adipócitos de todos os campos. A quantificação das fibras de colágeno foi realizada assim como descrito em Chen et al., 2017, utilizando a ferramenta de *colour deconvolution* do *software*.

Para avaliar a deposição de gordura nas lâminas de fígado foram contadas todas as gotas lipídicas 6 campos/animal. Além disso, foi calculado a fração de área ocupada pelas gotas de gordura em cada campo como um dos critérios para avaliar esteatose hepática pelo *Pathological Findings of Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH)* (PENG et al., 2020). A quantidade da fração foi subcategorizada pelo tamanho das gotículas em esteatose macrovesicular (>65 µm²) e microvesicular (<65 µm²), como proposto por Schroen et al., 2019.

Quantificação de hidroxiprolina

Fragmentos do ingWAT foram incubados com 6 N HCl por 14 h a 105 ° C para hidrólise. As amostras foram então resfriadas à temperatura ambiente, centrifugadas e a concentração de hidroxiprolina foi determinada de acordo com método colorimétrico descrito

por Woessner, 1961, usando 4-(dimetilamino) benzaldeído (Sigma Aldrich, kit de ensaio de hidroxiprolina, MAK008). A absorbância foi mensurada em 560 nm.

Método de Folch e quantificação de lipídios hepáticos

De acordo com o protocolo descrito por Folch et al., (1957) foram pesados 100 mg de fígado e homogeneizados em solução de clorofórmio/metanol (2:1) permanecendo em repouso para extração. No dia seguinte, foi adicionada solução salina a 0,9% para separação da parte insolúvel na proporção de 2mL para 10mL do filtrado. Após a separação das fases, uma alíquota da parte clorofórmica foi transferida para recipiente previamente pesado e, realizada quantificação por gravimetria da gordura resultante do evaporado. As concentrações de colesterol total e triglicerídeo foram determinadas por meio de kit enzimático (KATAL, Belo Horizonte, MG) após a suspensão da gordura obtida anteriormente em 500 µL de isopropanol, em espectrofotômetro a 505 nm

Processamento do tecido adiposo para extração de citocinas e ensaio enzimático

Fragmentos de 100 mg epWAT foram homogeneizados em homogeneizador na presença de 1 mL de tampão de extração de citocina refrigerado (100 mM Tris [pH 7,4], 150 mM NaCl, 1 mM de EGTA, 1 mM de EDTA, 1% de Triton X-100, 0,5% de desoxicolato de sódio e 1% de inibidor de protease coquetel). O homogeneizado resultante foi centrifugado (10.000 g, 15 min, 4°C), o sobrenadante coletado para a dosagem de citocinas por ELISA.

Determinação de citocinas e quimiocinas por ELISA

Para a quantificação das citocinas no epWAT foram utilizados kits DuoSet de ELISA (Enzyme Linked ImmuneSorbent Assay) para TNF e IL-10. Foram seguidas as instruções do fabricante para a realização dos ensaios (R&D System, Inc., Minneapolis, USA) em placas de 96 poços (C96 MicroWell™ Plates, Nunc, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Para tanto, os anticorpos de captura foram diluídos em PBS, pH 7.4, sendo a sensibilização *overnight* a 4° C. O bloqueio da reação foi feito com PBS acrescido de 1% de albumina bovina. A detecção foi obtida pela incubação com estreptavidina conjugada com peroxidase (“HRP-Streptavidin Pharmingen” – 1:200) ligada ao anticorpo de detecção e revelada com OPD (o-phenylenediamine dihydrochloride – Sigma). Após cerca de 20 minutos a reação foi interrompida com H₂SO₄ 1 M e a leitura adquirida no espectrofotômetro com filtro para um comprimento de onda de 490 nm.

Reação em cadeia pela polimerase de transcrição reversa quantitativa (RT-qPCR)

O RNA total do epWAT e subWAT foram extraídos conforme o Mini Kit PureLink RNA (Invitrogen, Carlsbad, USA). A medida do PCR em tempo real foi realizada por meio do sistema de detecção de sequência ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems, Warrington, UK) com SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) para reação de transcrição reversa de 2 µg de RNA. Os níveis relativos de expressão genética foram determinados pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ usando camundongos magros controle e foram normalizados à expressão do RPLP0. Foram utilizados primers para verificar a expressão de TNF, IL-10, CCL2, SREBP-1c, HIF-1 α , TGF β , das lipases Atgl, Hsl e LPL.

Gene	Sequência do primer (5'-3')	
	Forward	Reverse
RPLP0	AGAGACTGAGTACACCTTCCCCT	CGCAAATGCAGATGGATCA
HIF-1 α	GCTGCCCAGAAGACAACACAGAATC	TGCAGTTCTGGCTCGGGGGA
ATGL	CAACGCCACTCACATCTACGG	GGACACCTCAATAATGTTGGCAC
HSL	AACGAGACAGGCCTCAGTGTG	GAATCGGCCACCGGTAAAGAG
LPL	AGTCTGGCCTCGAACTAACTATGTAT	TCCCAGGACACAGGAAGCTAA
TNF	AGATAGCAAATCGGCTGACG	ACGGCATGGATCTCAAAGAC
IL-10	GCTCTTACTGACTGGCATGAG	CGCAGCTCTAGGAGCATGTG
SREBP-1c	AAGCAAATCACTGAAGGACCTGG	AAAGACAAGGGCTACTCTGGGAG

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas por meio do software Prisma 8.0 (GraphPad). Primeiramente, foi verificada a distribuição dos dados pelo teste de Shapiro-Wilk. Comparações paramétricas entre dois ou mais grupos foram realizadas utilizando teste t de Student ou análise de variância (ANOVA) one-way ou two-way, seguido de pós-teste de múltiplas comparações de Dunnett. Para comparações não paramétricas, foi realizado teste de Kruskal-Wallis. Os resultados estão apresentados em média \pm desvio padrão (SD). Diferenças com um valor de $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas.

RESULTADOS

Resposta distinta à alteração na adiposidade induzida pelo jejum e realimentação em camundongos magros e moderadamente obesos

Durante as 8 semanas de experimentação, ambos os grupos de animais apresentaram peso corporal (Fig. 2A) e consumo alimentar semanal semelhantes (Fig. 2B). Apesar da ingestão alimentar inalterada e do ganho de peso corporal semelhante, os camundongos que receberam a dieta HC exibiram aumento considerável na adiposidade visceral, avaliada pelo índice de adiposidade (IAV) (Fig. 2C). A análise individual dos sítios adiposos demonstrou aumento no epWAT, mesWAT e ingWAT dos animais alimentados com a dieta HC, sendo os mesmos considerados moderadamente obesos (Fig. 2G, I e J). Não ocorreram alterações no peso do tecido adiposo marrom (bWAT) (Fig. 2K) e do músculo gastrocnêmio (Fig. 2L) de animais moderadamente obesos quando comparados com animais magros.

Com o objetivo de promover a mobilização de gordura do tecido adiposo, inicialmente, os animais foram submetidos ao protocolo de jejum de 24h ou 48h (Fig. 1B). Após o jejum de 24h, os animais magros e moderadamente obesos não apresentaram redução significativa do índice de adiposidade (IAV). Em contrapartida, o jejum de 48h resultou em importante redução da adiposidade em animais magros (70%), enquanto em animais moderadamente obesos a redução não foi tão expressiva e significativa (27%) (Fig. 2C). Assim, a análise da mobilização do WAT após realimentação foi realizada apenas nos animais submetidos ao jejum de 48h. Entretanto, análises comparativas entre o jejum de 24h e 48h foram mantidas para todas as análises realizadas.

Após jejum de 48 horas, tanto os animais magros quanto os moderadamente obesos apresentaram redução significativa no peso corporal, que não foi completamente recuperado após 24 horas de realimentação, independentemente do tipo de dieta oferecida (Fig. 2D). Embora a massa corporal não tenha sido completamente restaurada, o consumo alimentar durante as 24 horas de realimentação foi maior nos animais moderadamente obesos que receberam a dieta rica em carboidratos refinados (Fig. 2E).

Após jejum de 24h, foi observada redução da adiposidade somente no retroWAT dos animais magros (Fig. 2H). Com o prolongamento do tempo de jejum para 48h, ocorreu a redução do IAV, epWAT, retroWAT, mesWAT, ingWAT e bWAT (Fig. 2F-K) exclusivamente em animais magros. Entretanto, mesmo após prolongamento do jejum, não foi

possível reduzir a adiposidade em nenhum tecido dos animais moderadamente obesos (Fig. 2F-K).

Após a realimentação (Fig. 1C) com dieta padrão, todos os tecidos avaliados nos animais magros foram restaurados em relação ao peso relativo (2F, G, I, J e K), exceto o retroWAT (Fig. 2H). Embora os animais moderadamente obesos não tenham apresentado redução significativa nos depósitos de gordura mesmo após 48h de jejum, o IAV e mesWAT (Fig. 2F e I) foram reduzidos após realimentação com dieta padrão. De forma geral, não ocorreram diferenças significativas no peso dos depósitos de WAT dos animais moderadamente obesos realimentados com dieta padrão em comparação com aqueles que mantiveram a dieta HC (Fig. 2F-K). Não ocorreram alterações no peso do gastrocnêmio em nenhuma das dietas após jejum e realimentação (Fig. 2L).

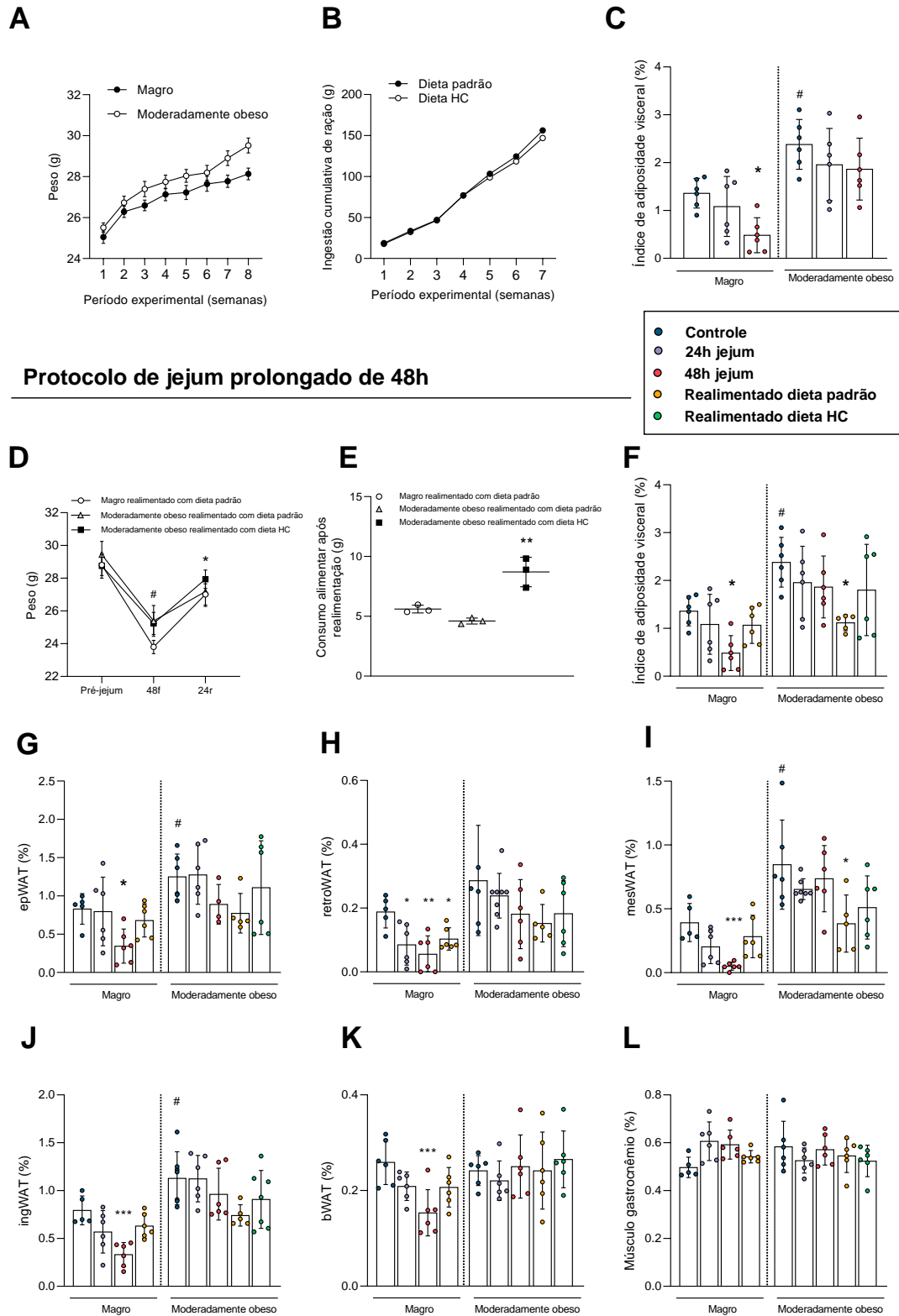


Figura 2. Ganho de peso corporal, ingestão alimentar pós-realimentação e peso dos tecidos após jejum e realimentação. (A) Ganho de peso corporal. (B) Consumo alimentar ao longo das 8 semanas de dieta. (C) Índice de adiposidade visceral (IAV) proporcional ao peso corporal após jejum de 24h e 48h. (D) Peso corporal pré jejum (PRÉ-J), pós-jejum de 48h (48J) e posterior realimentação de 24h (24R). (E) Consumo alimentar após a realimentação (n = 6) (F) Índice de adiposidade visceral (IAV) proporcional ao peso corporal. (G) Peso do tecido adiposo visceral (epWAT) proporcional ao peso corporal. (H) Peso do tecido adiposo

retroperitoneal (retroWAT) proporcional ao peso corporal. (I) Peso do tecido adiposo mesentérico (mesWAT) proporcional ao peso corporal. (J) Peso do tecido adiposo inguinal (ingWAT) proporcional ao peso corporal. (K) Peso do tecido adiposo marrom (bWAT) proporcional ao peso corporal. (L) Peso do músculo gastrocnêmico proporcional ao peso corporal. As barras representam os valores médios \pm DP (n=6). Difere estatisticamente pelo teste ANOVA two-way (A-C) ou one-way (D-K), seguido de pós teste de múltiplas comparações de Dunnett *(p<0,05 vs. Controle); ** (p<0,01 vs. Controle); e teste t de Student # (p<0,05 vs. Magro).

Realimentação com dieta padrão favorece a redução de adipócitos hipertróficos no epWAT de animais moderadamente obesos

Em seguida, foi avaliado o efeito do jejum e realimentação na morfometria do epWAT e ingWAT de animais magros e moderadamente obesos. Animais moderadamente obesos apresentaram aumento da área de adipócitos no epWAT e ingWAT em comparação com animais magros (Fig. 3A e C). A área dos adipócitos do epWAT e ingWAT de animais magros e moderadamente obesos não foi alterada após o jejum de 24h, porém, após o jejum de 48h, houve redução da área dos adipócitos somente no epWAT em ambos os grupos (Fig. 3A).

Os adipócitos dos animais magros recuperaram seu tamanho após a realimentação com dieta padrão, em comparação ao período de jejum de 48h. Interessantemente, animais moderadamente obesos que foram realimentados com dieta padrão apresentaram redução do tamanho dos adipócitos no epWAT, ao passo que, quando realimentados com dieta HC, o tamanho dos mesmos eram similares ao período pré-jejum (Fig. 3A). A frequência da distribuição da área dos adipócitos foi avaliada e observou-se aumento na frequência de adipócitos menores que 1000 μm^2 no epWAT de animais magros e moderadamente obesos realimentados com dieta padrão. Em contraste, animais moderadamente obesos realimentados com dieta HC continuaram a apresentar menor frequência de adipócitos menores que 1000 μm^2 , semelhante ao estado prévio ao jejum (Fig. 3B).

Analisando de forma geral a área dos adipócitos do epWAT em animais magros, não foram observadas alterações no tamanho das células, independentemente do período de jejum ou realimentação (Figura 3C). Já em animais moderadamente obesos, foi constatada uma área maior de adipócitos inguinal em comparação aos animais magros, sem modificação na média da área dos mesmos, independentemente do período de jejum ou realimentação (Figura 3C).

Examinando a frequência de distribuição dos adipócitos por área, verificou-se uma maior frequência de adipócitos menores (<1000 μm^2) em animais magros submetidos ao jejum e realimentação com dieta padrão (Fig. 3D). Ainda que os animais moderadamente obesos também tenham apresentado adipócitos menores durante o jejum e realimentação, a proporção dessas células foi menor do que a observada nos animais magros (Fig. 3D). Embora a média

do tamanho dos adipócitos do ingWAT não tenha sofrido alterações, os cortes histológicos revelaram a presença de adipócitos "multiloculares" misturados com regiões de adipócitos "uniloculares" após jejum e realimentação em animais magros e moderadamente obesos (Fig. 3F; setas no painel apontam os adipócitos "multiloculares"). Esses resultados sugerem que a redução e o reganho de tecido adiposo em resposta ao jejum e realimentação podem ocorrer de

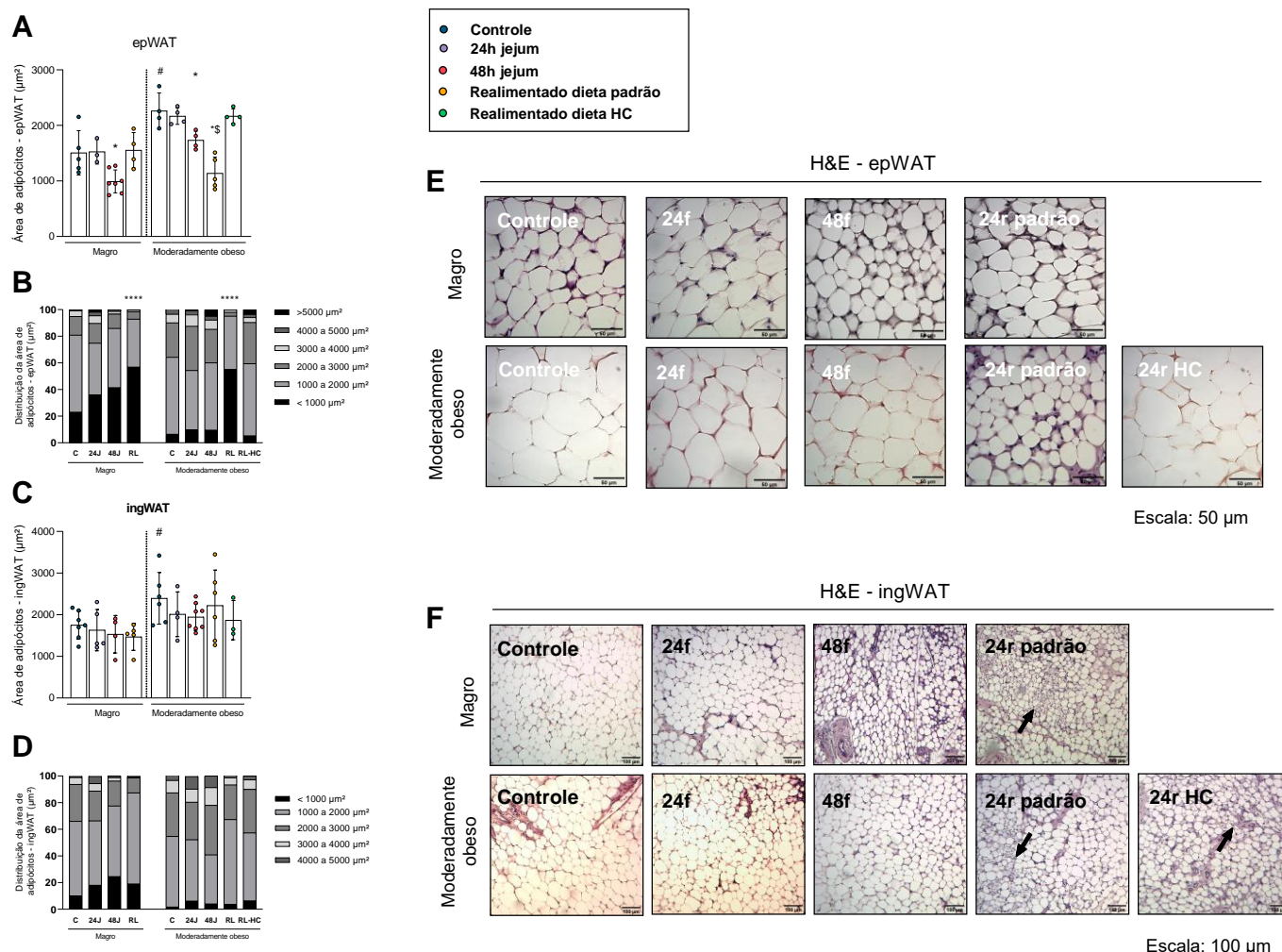


Figura 3. Alterações histomorfológicas do tecido adiposo de camundongos magros e moderadamente obesos submetidos a jejum e realimentação. A) Quantificação do tamanho médio dos adipócitos do tecido adiposo epididimal (epWAT). (B) Distribuição dos adipócitos por área no epWAT. (C) Figuras representativas da morfologia com hematoxilina-eosina de amostras do epWAT (D) Quantificação do tamanho médio dos adipócitos no tecido adiposo inguinal (ingWAT). (E) Distribuição dos adipócitos por área no ingWAT. (F) Figuras representativas da morfologia com hematoxilina-eosina de amostras do ingWAT. As barras representam os valores médios \pm DP (n=6). *(p<0,05 vs. Controle); ** (p<0,01 vs. Controle); *** (p<0,001 vs. Controle); e teste t de Student # (p<0,05 vs. Magro). Legenda: C = controle; 24J = 24h jejum; 48J = 48h jejum; RL = realimentação com dieta padrão; RL-HC = realimentação com dieta hc. Setas = adipócitos multiloculares.

maneira distinta entre o epWAT e ingWAT, bem como entre animais magros e moderadamente obesos.

Jejum prolongado promoveu aumento de fibrose apenas no tecido adiposo de animais magros

Para avaliar a fibrose do tecido adiposo, mensuramos a área positiva de coloração Tricômico de Masson no epWAT e ingWAT por meio de análises morfométricas (Fig. 4). Animais moderadamente obesos apresentaram menor área positiva de fibras de colágeno no epWAT quando comparados com os magros (Fig. 4A), entretanto, sem diferença no sítio ingWAT (Fig. 4D). Em seguida, para verificar se a hipertrofia do tecido adiposo estava relacionada ao aumento de um ambiente hipóxico, avaliamos a expressão de HIF-1 α . Enquanto a expressão de HIF-1 α estava aumentada no epWAT dos animais moderadamente obesos em comparação com os animais magros (Figura 4B), estava reduzida no ingWAT desses animais (Figura 4E). Para avaliar se ocorreu aumento da concentração de colágeno no ingWAT de animais moderadamente obesos, foi realizada a quantificação de hidroxiprolina. Não houve diferença no ingWAT de animais magros e moderadamente obesos na quantificação de hidroxiprolina (Fig. 4G).

Após jejum de 24h, não houve mudanças na área de deposição de colágeno no epWAT e ingWAT de animais magros (Fig. 4A e D). Já no epWAT de animais moderadamente obesos (Fig. 4A), mas não no ingWAT (Fig. 4D), ocorreu aumento de fibrose. A expressão de HIF-1 α não sofreu alterações após o jejum de 24h em ambos os tecidos adiposos, independentemente do estado nutricional dos animais (Fig. 4B e E). Com o prolongamento do jejum, ocorreu aumento significativo da fibrose tanto no epWAT quanto no ingWAT em animais magros (Fig. 4A e D). Em contrapartida, em animais moderadamente obesos, houve aumento da fibrose apenas no epWAT após o jejum prolongado (Fig. 4A). Além disso, houve redução na expressão de HIF-1 α apenas no ingWAT de animais magros com o prolongamento do jejum, não sendo observada essa redução nos animais moderadamente obesos (Figura 4E). A quantificação bioquímica de hidroxiprolina no ingWAT corroborou com o aumento de fibrose observado no jejum prolongado de animais magros (Figura 4G).

Após a realimentação com dieta padrão, os animais magros apresentaram manutenção do aumento da fibrose no epWAT, mas redução no ingWAT (Fig. 4A e D), enquanto animais moderadamente obesos apresentaram diferenças na área positiva de Masson tanto no epWAT quanto no ingWAT, independentemente da dieta oferecida (Fig. 4A e D). Observou-se aumento na expressão de HIF-1 α no epWAT de animais magros realimentados com dieta padrão e em

animais moderadamente obesos realimentados com dieta HC (Fig. 4B). No entanto, não houve alteração na expressão de HIF-1 α no ingWAT de animais magros realimentados com dieta padrão. Em contraste, animais moderadamente obesos realimentados com dieta padrão apresentaram redução na expressão de HIF-1 α em comparação com animais realimentados com dieta HC (Fig. 4E). A realimentação com dieta padrão em animais magros não modificou a quantificação de hidroxiprolina, enquanto a realimentação com dieta HC em animais moderadamente obesos resultou em redução da mesma (Fig. 4G).

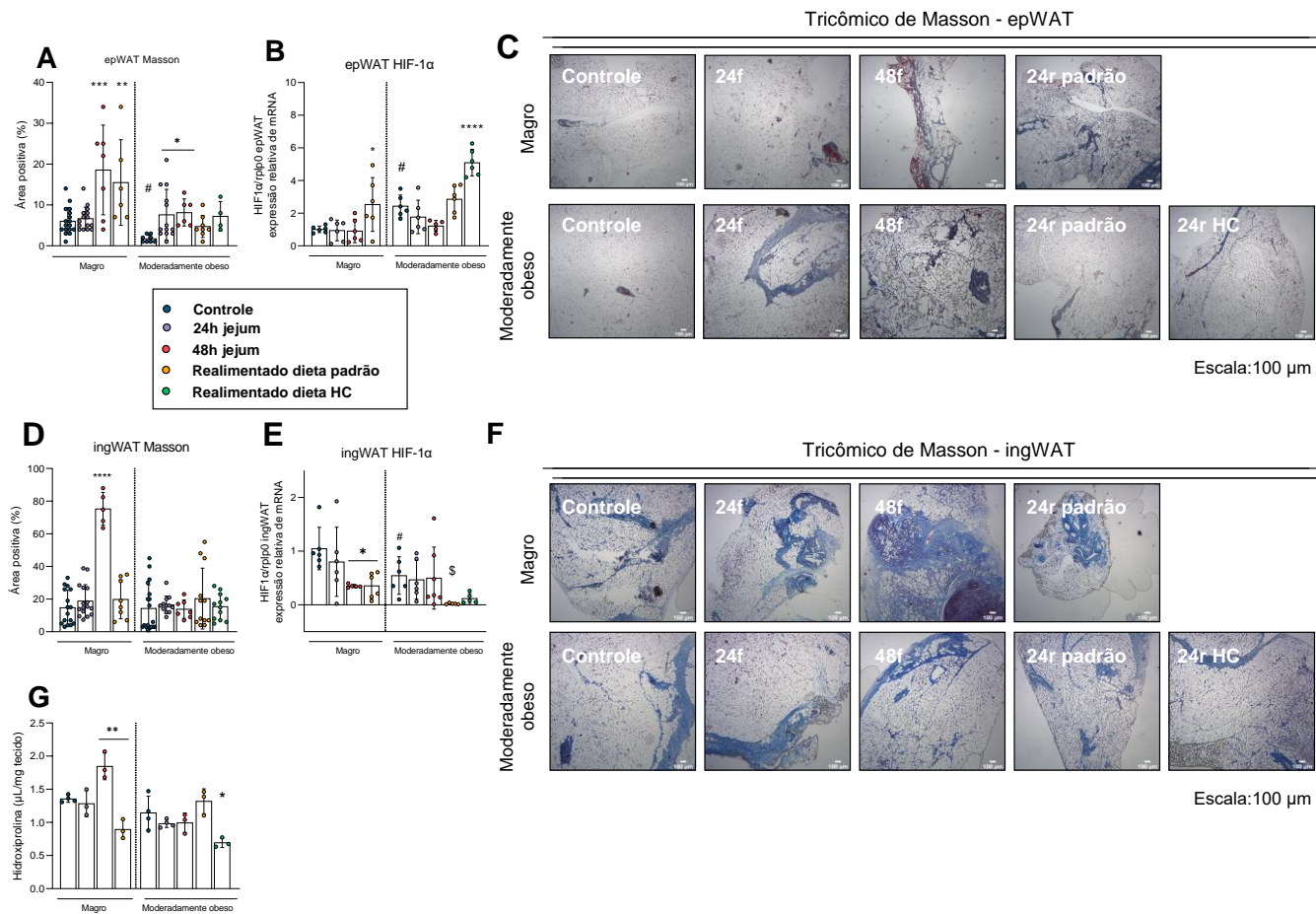


Figura 4. Quantificação e caracterização da fibrose intersticial no tecido adiposo de camundongos machos alimentados com dieta padrão ou rica em carboidratos refinados submetidos a jejum e realimentação. (A) Quantificação de área positiva da coloração de Tricômico de Masson no tecido adiposo epididimal (epWAT). (B) Expressão de HIF-1 α no epWAT. (C) Figuras representativas da fibrose com coloração de Masson de amostras do epWAT (D) Quantificação de área positiva da coloração de Tricômico de Masson no tecido adiposo inguinal (ingWAT). (E) Expressão de HIF-1 α no ingWAT. (F) Figuras representativas da fibrose com coloração de Masson de amostras do ingWAT. (G) Conteúdo de hidroxiprolina no ingWAT (n=3-4). As barras representam os valores médios \pm DP (n=6) *(p<0,05 vs. Controle); ** (p<0,01 vs. Controle); *** (p<0,001 vs. Controle); **** (p<0,0001 vs. Controle); \$ (p<0,05 vs. Realimentado com dieta HC); e teste t de Student # (p<0,05 vs. Magro).

Alteração do perfil metabólico em animais moderadamente obesos submetidos ao jejum e realimentação

A expansão da massa adiposa e a hipertrofia de adipócitos foram acompanhadas por aumentos nas concentrações séricas de glicose e colesterol (Fig. 5A e C) em animais moderadamente obesos em comparação com animais magros. Essas disfunções também foram associadas a alterações nas concentrações séricas de leptina, resistina e adiponectina (Fig. 5E-G). Não foram observadas alterações nas concentrações séricas de triglicérides e ácidos graxos livres nos animais moderadamente obesos em comparação com os magros (Fig. 5B e D). Além

disso, a concentração sérica de pentraxina 3 (PTX3; proteína de fase aguda; Fig. 5I) foi reduzida em animais moderadamente obesos em comparação com animais magros.

A inflamação pós-prandial refere-se à resposta inflamatória que ocorre após a ingestão de uma refeição, especialmente quando a refeição é rica em gorduras ou carboidratos refinados. Durante a digestão e absorção dos nutrientes, ocorrem alterações nos níveis de glicose, lipídios e outros metabólitos no sangue, o que pode desencadear respostas inflamatórias no organismo.

O jejum de 24h não alterou as concentrações séricas de glicose, triglicérides e colesterol em animais magros (Fig. 5 A, B e C), mas reduziu as concentrações de leptina e resistina (Fig. 5E e F). Já em animais moderadamente obesos, houve redução de glicose e colesterol séricos (Fig. 5A e C). As concentrações séricas de triglicérides, AGL, adiponectina, relação adiponectina/resistina e PTX3 permaneceram inalteradas após o jejum de 24h em ambos os grupos (Fig. 5B, D, G, H e I). Com a prolongamento do jejum para 48h, as concentrações de glicose, triglicérides e leptina reduziram em ambos os grupos (Fig. A, B e E), enquanto apenas animais moderadamente obesos apresentaram redução nas concentrações de colesterol (Fig. 5C). Em animais magros, mas não em animais moderadamente obesos, o jejum prolongado resultou em redução das concentrações de resistina e PTX3 (Fig. 5F e I).

Em animais magros, após realimentação com dieta padrão, apenas a glicose manteve a redução de forma sustentada (Fig. 5A). Já as concentrações séricas de triglicérides, leptina e resistina aumentaram (Fig. 5B, E e F), e a adiponectina diminuiu significativamente (Fig. 5G). Animais moderadamente obesos apresentaram concentrações próximas de glicemia e triglicérides ao período pré-jejum após realimentação com dieta padrão ou HC (Fig. 5A e B). A concentração de colesterol retornou aos valores pré-jejum apenas nos animais realimentados com dieta HC (Fig. 5C). Não houve alteração nos AGL em nenhum dos desafios dietéticos avaliados (Fig. 5D). A realimentação com dieta HC aumentou as concentrações de leptina e resistina, sem alteração na adiponectina, enquanto a realimentação com dieta padrão manteve as concentrações de leptina próximas ao jejum (Fig. 5E e F). Independentemente da dieta ofertada no período de realimentação, ocorreu aumento do PTX3 em animais moderadamente obesos (Fig. 5I).

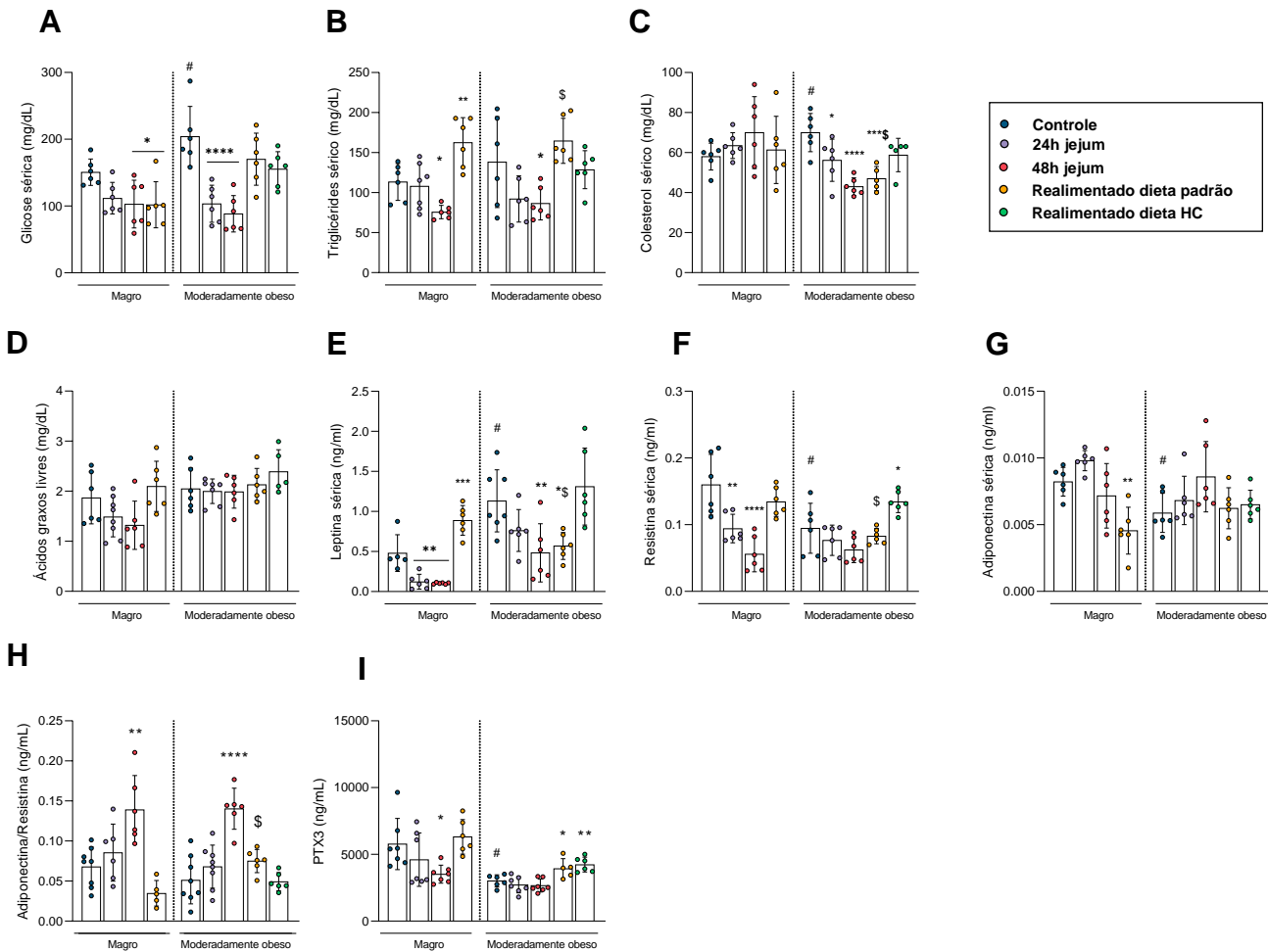


Figura 5. Concentração circulante de metabólitos e adipocinas de camundongos magros e moderadamente obesos submetidos a jejum e realimentação. Concentrações séricas de (A) Glicose, (B) Triglicérides e (C) Colesterol total (mg/dl). (D) Dosagem de Ácidos Graxos Livres (Mmol/l). Concentrações séricas de adipocinas: (E) Leptina; (F) Resistina e (G) Adiponectina (ng/mL). (H) Relação adiponectina/resistina (ng/mL). (I) Concentração sérica de Pentraxina 3 (ng/mL) (PTX3). As barras representam os valores médios \pm DP (n=5-7). *(p<0,05 vs. Controle); ** (p<0,01 vs. Controle); *** (p<0,001 vs. Controle); \$ (p<0,05 vs. Realimentado com dieta HC); e teste t de Student # (p<0,05 vs. Magro).

Realimentação com dieta HC promove aumento de leucócitos, linfócitos e granulócitos

Não foram observadas diferenças no número de leucócitos, linfócitos e granulócitos circulantes entre animais magros e moderadamente obesos (Fig. 6A-C), mesmo após 24h de jejum. No entanto, após 48h de jejum, os animais magros apresentaram redução no número de leucócitos e granulócitos circulantes (Fig. 6A e C), enquanto os animais moderadamente obesos tiveram apenas redução no número de granulócitos após o jejum de 48h (Fig. 6C).

Após período de realimentação, os animais magros apresentaram números semelhantes de leucócitos, linfócitos e granulócitos em comparação com o período anterior ao jejum. Já os animais moderadamente obesos que foram realimentados com dieta padrão não apresentaram alteração no número de células circulantes, no entanto, houve aumento significativo no número de leucócitos, linfócitos e granulócitos quando alimentados com dieta HC (Fig. 6A-C).

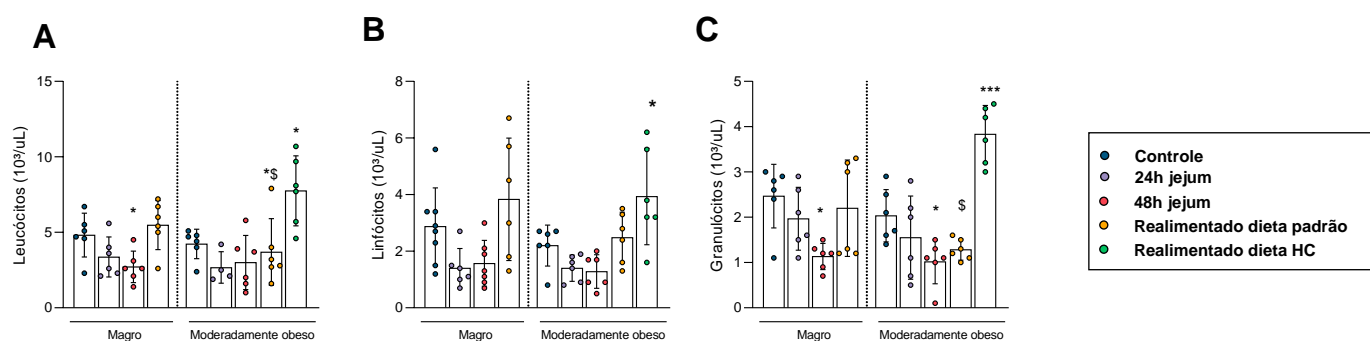


Figura 6. Avaliação da plasmática de células brancas em camundongos magros e moderadamente obesos após jejum e realimentação. (A-C) Expressos em μL de sangue. (A) Número de leucócitos totais. (B) Avaliação do número de linfócitos. (C) Avaliação do número de granulócitos. As barras representam os valores médios \pm DP ($n=4-7$). *($p<0,05$ vs. Controle); *** ($p<0,001$ vs. Controle); \$ ($p<0,05$ vs. Realimentado com dieta HC).

Animais moderadamente obesos não apresentaram aumento da expressão de genes lipolíticos mesmo após jejum prolongado de 48h

Em seguida, investigou-se a lipólise no epWAT e ingWAT de animais magros e moderadamente obesos por meio da análise da expressão de mRNA da lipase triglicéridica adiposa (ATGL) e lipase hormônio-sensível (HSL). Verificou-se que, no epWAT, os animais moderadamente obesos apresentaram maior expressão de ATGL e HSL em comparação aos animais magros (Fig. 7A e C). Já no ingWAT, houve aumento somente na expressão da HSL nos animais moderadamente obesos (Fig. 7B).

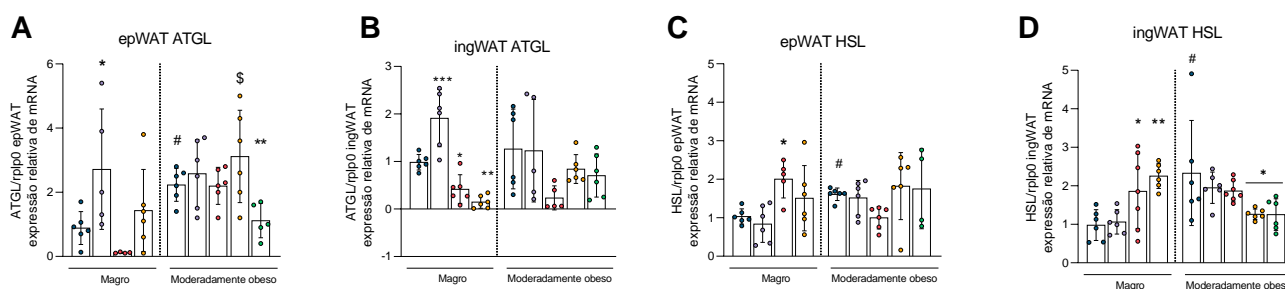
Após período de jejum de 24h, a expressão da enzima ATGL aumentou tanto no epWAT como no ingWAT dos animais magros (Fig. 7A e B), enquanto que o aumento da HSL nesses depósitos ocorreu com o prolongamento do jejum (Fig. 7C e D). Contudo, o jejum de 24h ou 48h não induziu alterações nas expressões de ATGL e HSL em ambos os tecidos dos animais moderadamente obesos (Fig. 7A-D). Dessa forma, em animais magros, primeiro ocorre o aumento da expressão de ATGL, seguido pelo aumento da expressão de HSL, enquanto nos animais moderadamente obesos, ocorre a perda da regulação de ambas as enzimas.

A realimentação com dieta padrão reestabeleceu a expressão da ATGL no epWAT dos animais magros, mas não no ingWAT (Fig. 7A e B). A expressão da HSL não se diferenciou do período pré-jejum no epWAT, mas manteve-se elevada no ingWAT (Fig. 7C e D). Já nos animais moderadamente obesos realimentados com dieta padrão, a expressão da ATGL no epWAT permaneceu elevada em relação aos realimentados com dieta HC (Fig. 7A). Ademais, a realimentação com dieta HC nos animais moderadamente obesos também reduziu a expressão da enzima ATGL no tecido adiposo epididimal (Fig. 7A). Já, no sítio inguinal a expressão da enzima HSL apresentou-se reduzida independentemente do tipo de dieta da realimentação (Fig. 7D).

Em seguida, foi avaliada a expressão de mRNA da enzima lipase lipoproteica (LPL) e do fator de transcrição SREBP-1, envolvidos na captação de triglicerídeos das lipoproteínas circulantes e na biossíntese de lipídios e esteróis, respectivamente. Em camundongos moderadamente obesos, houve aumento na expressão de LPL e SREBP-1c no epWAT e ingWAT, em comparação com animais magros (Fig. 7E-H). No entanto, o jejum de 24h e 48h não promoveu alteração na expressão de LPL e SREBP-1c em ambos os tecidos dos camundongos magros e moderadamente obesos (Fig. 7E-H).

Após a realimentação com dieta padrão, a expressão de LPL no epWAT e ingWAT dos animais magros não sofreu alteração (Fig. E e F), mas houve aumento na expressão de SREBP-1c em ambos os sítios (Fig. G e H). Por outro lado, nos animais moderadamente obesos, a expressão de LPL no ingWAT diminuiu (Fig. 7F), independentemente da dieta utilizada na realimentação, enquanto a expressão de LPL no epWAT e SREBP-1c no ingWAT não sofreu alteração após a realimentação com dieta padrão e HC (Fig. 7E e H). Ainda, constatou-se que a expressão de SREBP-1c no epWAT aumentou após realimentação com dieta padrão em animais moderadamente obesos (Fig. 7G), enquanto apenas animais magros apresentaram aumento no ingWAT (Fig. 7H). Esses achados indicam que o jejum seguido de realimentação com dieta padrão regula ativamente o fator de transcrição envolvido no armazenamento de ácidos graxos e lipogênese do tecido.

Lipólise



Lipogênese

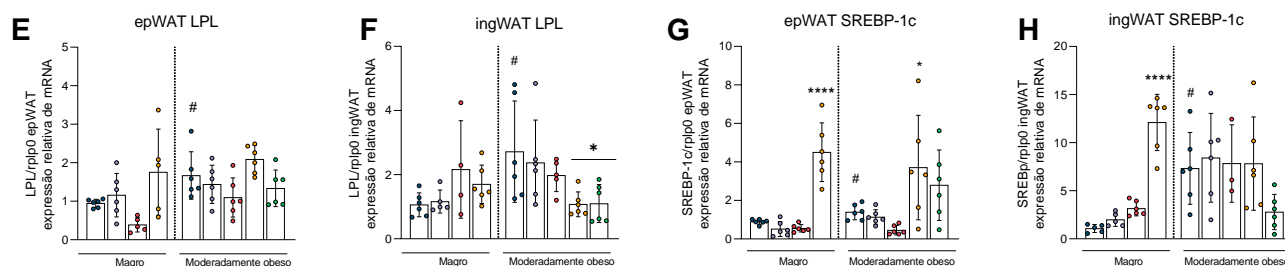


Figura 7. Alterações na expressão de genes lipolíticos e lipogênicos no tecido adiposo de camundongos magros e moderadamente obesos submetidos a jejum e realimentação. Expressão de genes lipolíticos (A-D): ATGL e HSL no tecido adiposo epididimal (epWAT; A-C) e tecido adiposo inguinal (ingWAT; B-D). Expressão de genes lipogênicos (E-H): LPL e SREBP-1c no tecido adiposo epididimal (epWAT; E-G) e tecido adiposo inguinal (ingWAT; F-H). As barras representam os valores médios \pm DP (n=6). *(p<0,05 vs. Controle); ** (p<0,01 vs. Controle); *** (p<0,001 vs. Controle); \$ (p<0,05 vs. Realimentado com dieta HC); e teste t de Student # (p<0,05 vs. Magro).

Jejum e realimentação apresentaram respostas inflamatórias distintas entre animais magros e moderadamente obesos

Para investigar a possível relação entre inflamação e redução da adiposidade após jejum e realimentação, avaliamos marcadores inflamatórios, que já foram previamente avaliados em estudo anterior, no tecido adiposo epididimal e inguinal. Embora não tenha havido diferenças nas concentrações séricas de TNF e IL10 em nenhum dos grupos ou tratamentos avaliados (Fig. 8A e D), observamos que animais moderadamente obesos apresentaram alterações na expressão de TNF, IL10 e CCL2 no epWAT e ingWAT em comparação com animais magros

(Fig. 9B, C, E, F, G e H). Além disso, a expressão de TGF- β estava aumentada apenas no epWAT de animais moderadamente obesos em comparação com animais magros (Fig. 9I)

Após jejum de 24h, as concentrações de TNF e IL-10 não foram alteradas em animais magros e moderadamente obesos (Fig. 9A e D). No entanto, apenas os animais moderadamente obesos apresentaram aumento da expressão de IL-10 e CCL2 no tecido adiposo inguinal após o jejum de 24h (Fig. 9F e J). Com o prolongamento do jejum para 48h, observou-se aumento na expressão de TNF, IL10 e CCL2 no epWAT e ingWAT de animais magros (Fig. 9B, C, E, F, G e H). Por outro lado, nos animais moderadamente obesos, houve alteração da expressão de IL-10 e CCL2 apenas no ingWAT (Fig. 9F e H), enquanto a expressão de TGF- β foi reduzida no epWAT (Fig. 9I). Dessa forma, sob o estímulo do jejum, animais moderadamente obesos apresentam resposta inflamatória reduzida quando comparados com animais magros, e essa resposta parece ser sitio específica, visto que apenas o ingWAT apresentou aumento de IL-10 e CCL2 após jejum prolongado.

Após período de realimentação, animais magros e moderadamente obesos alimentados com as diferentes dietas não alteraram as concentrações de TNF e IL-10 no epWAT (Fig. 8A e D). Entretanto, no ingWAT, animais magros mantiveram a expressão aumentada TNF e IL-10 após a realimentação (Fig. 8C e F). Em contrapartida, apenas no ingWAT, os animais moderadamente obesos realimentados com dieta HC apresentaram aumento de TNF (Fig. 8C). A expressão de CCL2 manteve-se aumentada tanto no epWAT quanto no ingWAT dos animais magros (Fig. G e H). Curiosamente, não ocorreram alterações após jejum e realimentação na expressão de TGF- β no epWAT e ingWAT de animais magros (Fig. 8I e J). No período da realimentação, apenas no ingWAT, ocorreu redução da expressão de TGF- β de animais moderadamente obesos independente da dieta ofertada (Fig. 8J).

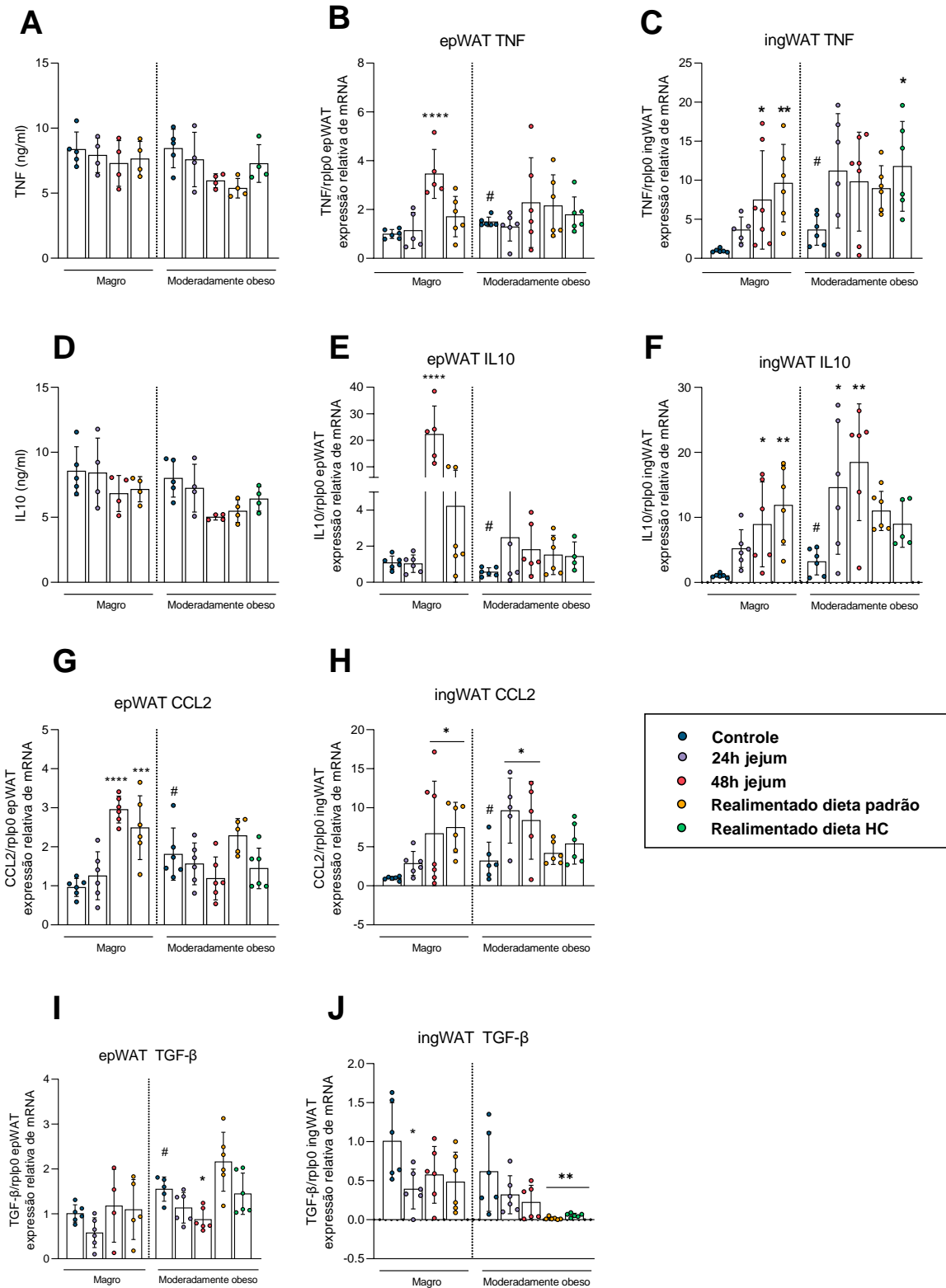


Figura 8. Alterações nos padrões inflamatórios de camundongos magros e moderadamente obesos submetidos a jejum e realimentação. Concentrações de (A e D) TNF e IL10 (ng/mL) no epWAT; Expressão de TNF no epWAT (B) e ingWAT (C); Expressão de IL10 no epWAT (E) e ingWAT (F); Expressão de CCL2 no epWAT (G) e ingWAT (H); Expressão de TGF- β no epWAT (I) e ingWAT (J). As barras representam os valores médios \pm DP (n=5-6). * (p<0,05 vs. Controle); ** (p<0,01 vs. Controle); *** (p<0,001 vs. Controle); e teste t de Student # (p<0,05 vs. Magro).

Jejum induz aumento de gotículas lipídicas em animais magros e moderadamente obesos

Para avaliar as adaptações metabólicas do fígado frente à transição do estado de jejum e realimentação, foram analisados metabólitos hepáticos e seções histológicas em camundongos moderadamente obesos e magros. O peso do fígado não apresentou alterações significativas entre os grupos ou os tempos de jejum e realimentação (Fig. 9A). No entanto, o conteúdo hepático de colesterol e triglicerídeos, bem como a gordura total e a contagem de gotículas hepáticas, estavam aumentadas nos camundongos moderadamente obesos (Fig. 9B-E). Além disso, no soro, não houve alteração nas concentrações de ALT e AST nos camundongos moderadamente obesos em comparação com os magros (Fig. 9G e H).

Após jejum de 24h, houve aumento da gordura hepática total em camundongos magros (Fig. 9D), bem como no número de gotículas de gordura em animais magros e moderadamente obesos (Fig. 9E). Com o prolongamento do jejum, os conteúdos hepáticos de colesterol e triglicerídeos aumentaram ainda mais, apenas nos animais magros (Fig. 9B e C). Para avaliar se o conteúdo de gordura no fígado após o jejum estava associado a mudanças na morfologia, foram analisadas seções histológicas do tecido hepático (Fig. 9I). Após jejum de 48h, animais magros apresentaram aumento na quantidade de gotículas lipídicas macrovesiculares ($>65 \mu\text{m}^2$; Fig. 9F). Além disso, somente em camundongos moderadamente obesos ocorreu redução nas concentrações de AST após jejum de 48h (Fig. 9G).

Após a realimentação com dieta padrão, observou-se aumento das concentrações de colesterol hepático em animais magros e moderadamente obesos (Fig. 9B). No entanto, não houve alterações na contagem de gotículas de gordura nesses grupos (Fig. 9E). Além disso, o triglicerídeo hepático aumentou apenas em animais moderadamente obesos após a realimentação com dieta padrão (Fig. 9C). Esse aumento na contagem de gotículas foi acompanhado pelo aumento no número de gotículas macrovesiculares nesses animais (Fig. 9F)

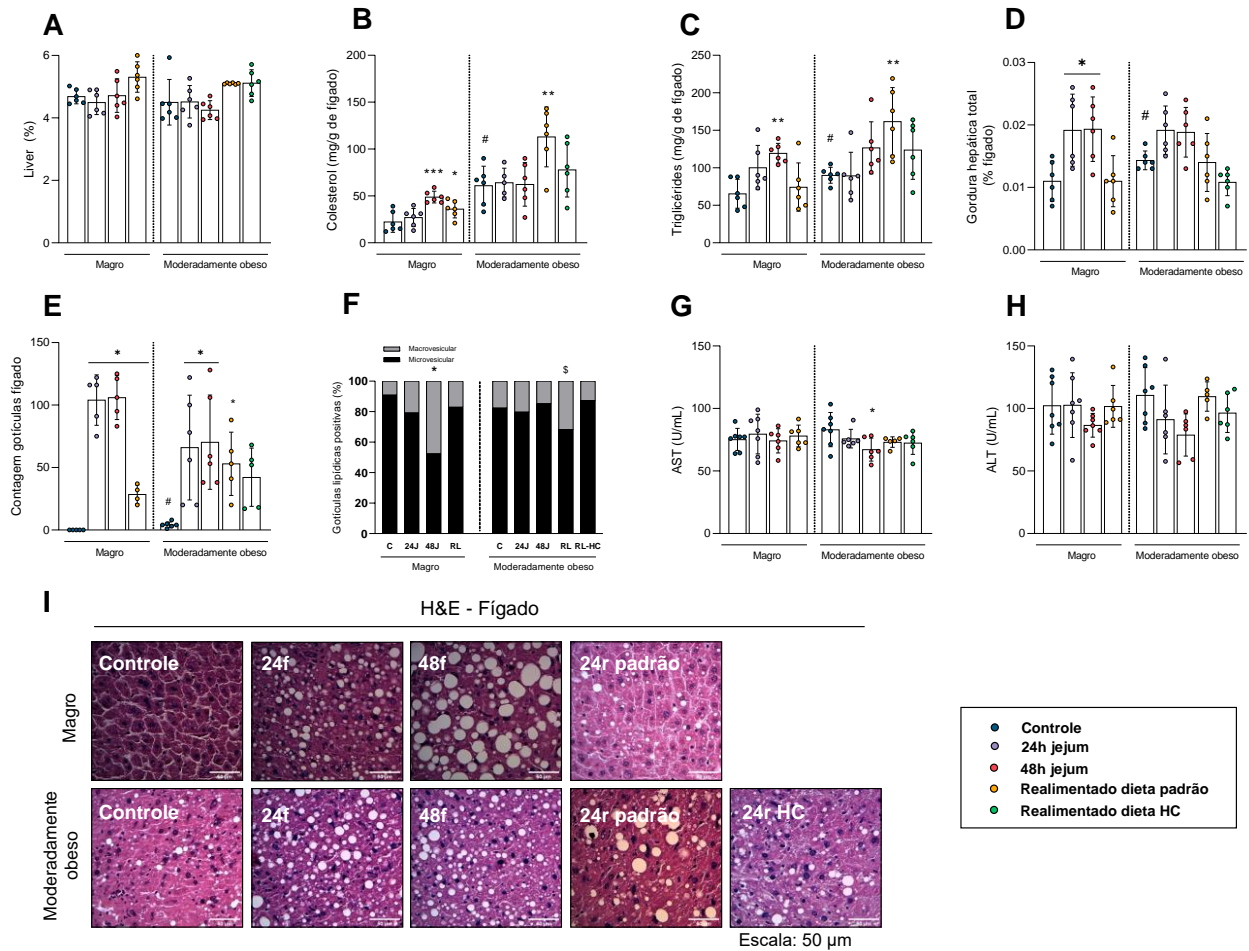


Figura 9. Análise morfológica e perfil lipídico do tecido hepático de camundongos magros e moderadamente obesos submetidos a jejum e realimentação. (A) Peso do fígado proporcional ao peso corporal, $n=6-8$. (B) Colesterol no fígado. (C) Triglicérides. (D) Conteúdo de lipídios totais. (E) Quantidade de gotículas de gordura por campo no tecido hepático. (F) Fração da área ocupada pelas gotículas de gordura por campo no tecido hepático. (G) Concentrações sorológicas de aspartato aminotransferase e (H) Alanina aminotransferase. (I) Figuras representativas da morfologia com hematoxilina-eosina de amostras do fígado (x40). As barras representam os valores médios \pm DP ($n=6$). * ($p<0,05$ vs. Controle); ** ($p<0,01$ vs. Controle); \$ ($p<0,05$ vs. Realimentado com dieta HC); e teste t de Student # ($p<0,05$ vs. Magro). Legenda: C = controle; 24J = 24h jejum; 48J = 48h jejum; RL = realimentação com dieta padrão; RL-HC = realimentação com dieta hc

DISCUSSÃO

A obesidade é caracterizada por um estado de inflamação crônica de baixo grau que contribui para a resistência à insulina e diabetes tipo 2 (COELHO; OLIVEIRA; FERNANDES, 2013). Um dos mecanismos que relaciona a obesidade com essas doenças é a inflexibilidade metabólica, que se define como a incapacidade do organismo de alternar entre diferentes fontes de substrato energético em resposta às mudanças na disponibilidade de nutrientes (GOODPASTER; SPARKS, 2017). Diversas estratégias dietéticas têm sido propostas para o tratamento da obesidade, incluindo o jejum, que é amplamente prescrito para populações com sobrepeso e obesidade e tem sido utilizado em vários estudos clínicos e experimentais (GOTTHARDT et al., 2016; TANG et al., 2017; SUTTON et al., 2018; LOWE et al., 2020). Durante o jejum, ocorre uma mudança na fonte primária de energia, de glicose para gorduras armazenadas no tecido adiposo (LONGO; MATTSON, 2014). No entanto, dados do nosso grupo e da literatura indicam que animais moderadamente obesos (LACERDA et al., 2019a) ou aqueles com disfunção metabólica (ASTERHOLM et al., 2012) apresentam menor capacidade de reduzir o tecido adiposo após o jejum. Essa menor mobilização de gordura em animais obesos ou com disfunção metabólica parece estar associada à inflexibilidade metabólica ou ainda à inflexibilidade imunológica. Apesar disso, há de se considerar que os efeitos do jejum são dependentes de sua duração, tipo e composição da dieta durante o período de realimentação (TANG et al., 2017).

Com base nisso, surgem questões relevantes: Qual o impacto da realimentação em animais magros e moderadamente obesos após período de jejum? A composição da dieta na realimentação pode afetar a resposta metabólica e o remodelamento do tecido adiposo em animais moderadamente obesos? Neste estudo, foi observado que uma dieta rica em carboidratos refinados levou à (i) expansão do tecido adiposo sem aumento de peso, bem como mudanças metabólicas sistêmicas, morfológicas e inflamatórias; (ii) a inflexibilidade metabólica e inflamatória, evidenciada pela incapacidade de mobilizar gordura e aumentar a expressão de mediadores inflamatórios no tecido adiposo mesmo após jejum prolongado; e (iii) alterações nos níveis de inflamação pós-prandial após realimentação, dependendo do tipo de dieta oferecida.

Em concordância com estudos prévios realizados pelo nosso grupo de pesquisa (FERREIRA et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2013; MENEZES-GARCIA et al., 2014; MARTINS et al., 2018; LACERDA et al., 2019), camundongos alimentados com dieta HC apresentaram importante expansão do tecido adiposo sem aumento de peso corporal, bem como

aumento da área de adipócitos, hiperglicemia, hiperlipidemia e alterações nas concentrações circulantes de adipocinas, incluindo leptina, adiponectina e resistina, bem como da expressão de mRNA das citocinas TNF, TGF- β , IL-10 e da quimiocina CCL2 no tecido adiposo. A maioria das adipocinas é produzida em maior quantidade no estado obeso e as que têm caráter pró-inflamatório estão geralmente associadas à indução de doenças metabólicas relacionadas à obesidade. Além disso, a concentração de leptina no sangue correlaciona-se positivamente com a massa adiposa, o que indica a ocorrência de resistência à leptina (OUCHI et al., 2011). A resistina também está aumentada em indivíduos obesos e já foi demonstrado que é um dos fatores responsáveis pela resistência à insulina (STEPPAN et al., 2001).

O aumento da adiposidade decorrente da dieta rica em carboidratos refinados, com alto teor de sacarose (glicose + frutose), pode ser explicado pelo alto nível glicêmico da dieta, que está diretamente relacionado ao aumento das concentrações de insulina pós-prandial. A rápida elevação da concentração de glicose após o consumo de alimentos com alto índice glicêmico estimula a liberação de grandes quantidades de insulina para captar a glicose circulante e restaurar suas concentrações séricas (KIM et al., 2008; PARKS, 2002). Esse fenômeno pode levar à resistência à insulina, e por sua vez, estimular a lipogênese *de novo* no fígado e tecido adiposo, que é o processo pelo qual o corpo cria novas moléculas de gordura a partir da glicose e outros precursores (SONG; XIAOLI; YANG, 2018). Além disso, o acúmulo de gordura no tecido adiposo promovido pela insulina pode aumentar o tamanho e a diferenciação dos adipócitos, levando à hipertrofia e hiperplasia (RODRÍGUEZ et al., 2015).

A privação alimentar ocasionada pelo jejum reduz a concentração de hormônios envolvidos na saciedade, como a leptina e insulina, enquanto promove o aumento de hormônios orexígenos. Dessa forma, tem sido sugerido que ocorra aumento do consumo calórico como forma de compensar a privação alimentar (JOHNSTONE, 2015; PEDROSO et al., 2016). Entretanto, após o período de privação alimentar, a composição da dieta durante a realimentação parece se fazer importante. Estudos anteriores já mostraram que camundongos alimentados com dieta rica em sacarose, com alto índice glicêmico, apresentaram hiperfagia após período hipoglicêmico (GAYSINSKAYA et al., 2011). Outra hipótese para a hiperfagia pós-jejum são as concentrações séricas de leptina. A leptina atua atenuando a hiperfagia pós-restrição alimentar em camundongos. Assim, o aumento da sensibilidade à leptina pode ser uma estratégia promissora para reduzir a hiperfagia e o reganho de peso após a restrição calórica (PEDROSO et al., 2016).

Estudo prévio demonstrou que, após jejum de 72h, camundongos C57/BL6 apresentaram aumento inicial no consumo alimentar durante os primeiros 24 horas de realimentação, em comparação com os períodos subsequentes (TANG et al., 2017). Por outro lado, Briggs et al. (2011) demonstraram que camundongos alimentados com uma dieta rica em gorduras (HF) por 9 ou 12 semanas tiveram uma resposta atenuada no consumo de dieta após apenas 5h de realimentação (BRIGGS et al., 2011). No nosso trabalho, observamos que animais moderadamente obesos apresentaram redução da glicemia e leptina após jejum prolongado e, ao serem realimentados com dieta rica em carboidratos, apresentaram hiperfagia acompanhada por aumento da leptina em comparação com os animais magros. No entanto, apesar do aumento na ingestão alimentar, a recuperação de peso corporal não ocorreu de forma imediata, fazendo-se necessário uma análise em período maior após realimentação. Por outro lado, animais moderadamente obesos realimentados com dieta padrão apresentaram melhor sensibilidade à leptina em comparação com aqueles realimentados com dieta rica em carboidratos, o que pode explicar a ausência de hiperfagia nesse grupo. Assim, pode-se concluir que tanto a composição da dieta quanto o estado de insensibilidade à insulina e/ou à leptina desempenham papéis importantes no desenvolvimento da hiperfagia após um período de restrição alimentar.

Diversas pesquisas têm demonstrado que o jejum pode levar a uma rápida redução no tamanho do tecido adiposo (JENSEN et al., 2013; DING et al., 2016; BAZHAN et al., 2019). Entretanto, estudos conduzidos anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa apontaram que animais com obesidade moderada apresentaram menor perda de adiposidade em resposta ao jejum (LACERDA et al., 2019, 2020). Nesse trabalho, inicialmente objetivamos avaliar se animais moderadamente obesos responderiam de forma apropriada aos tempos de jejum de 24h e 48h. Nossos resultados indicam que o protocolo de jejum de 24h não foi suficiente para mobilizar adiposidade nos animais estudados, tanto magros como nos moderadamente obesos. No entanto, com a extensão do tempo de jejum para 48h, foi observada redução significativa da adiposidade nos depósitos viscerais (IAV = 70%) e inguinal (ingWAT = 47%) em animais magros. Por outro lado, mesmo após jejum prolongado, animais moderadamente obesos não apresentaram perda significativa de adiposidade (IAV = 27% e ingWAT = 31%).

Vários autores relatam variações nas perdas de adiposidade em camundongos magros após serem submetidos ao estímulo do jejum. Estudos prévios já avaliaram a mobilização da adiposidade em camundongos magros submetidos ao protocolo de jejum de 24 horas, e verificaram redução significativa do tecido adiposo visceral, porém sem uma redução inicial no tecido adiposo subcutâneo (DING et al., 2016). Somente após o prolongamento do jejum,

em um período de 48 horas, houve a redução do tecido adiposo subcutâneo (TANG et al., 2017). Além disso, em estudo anterior, apesar de camundongos magros apresentarem redução da concentração de AGL e camundongos moderadamente obesos não apresentaram tal alteração (LACERDA et al., 2019). Neste estudo, observou-se que as concentrações séricas de ácidos graxos livres (AGL) não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os períodos de jejum e realimentação avaliados. Uma possível explicação para a ausência do aumento esperado após 48 horas de jejum em animais magros é que o tempo de coleta utilizado pode não ter sido suficiente para detectar as alterações metabólicas. Assim, sugere-se que seja realizado um estudo com avaliação de um tempo intermediário entre 24 e 48 horas de jejum, a fim de investigar possíveis variações nas concentrações de AGL nesse período.

A regulação do tamanho do tecido adiposo envolve mecanismos de armazenamento e mobilização de gordura, controlados pelas vias metabólicas que regulam a lipogênese, bem como pela atuação das enzimas lipolíticas e fatores oxidativos. A lipólise, processo de hidrólise dos TAGs armazenados nos adipócitos, é realizada por enzimas como a ATGL e HSL, responsáveis pela hidrólise dos ácidos graxos e subsequente liberação na corrente sanguínea para uso energético (NIELSEN et al., 2014). Por outro lado, durante a realimentação, o fator de transcrição SREBP-1c e a enzima LPL são alguns dos responsáveis por regular a lipogênese no tecido adiposo. A regulação positiva de SREBP-1c no tecido adiposo é estimulada pela insulina, o que aumenta a biossíntese de ácidos graxos e ativa a biogênese mitocondrial e a capacidade antioxidante. Esses efeitos são mediados pelo receptor ativado pelo proliferador γ coativador-1 α (PGC-1 α), que se liga ao elemento regulador de esterol (SRE) na região promotora de genes envolvidos nesses processos (KOBAYASHI et al., 2018). Para avaliar as respostas adaptativas do tecido adiposo após jejum e realimentação, foram investigadas as enzimas ATGL, HSL e LPL, bem como o fator de transcrição SREBP-1c. Observamos que animais magros apresentaram redução dos depósitos de gordura acompanhada de aumento na expressão de genes de enzimas relacionadas à via lipolítica, ATGL e HSL, enquanto que esse aumento não foi observado em animais moderadamente obesos submetidos ao jejum prolongado de 48h. Esses dados indicam que a resistência à perda de adiposidade nos animais obesos possa ser devido a menor ativação das vias lipolíticas, mesmo quando submetidos ao jejum de 48h.

Trabalhos anteriores já avaliaram a regulação das enzimas lipolíticas e lipogênicas em camundongos magros após jejum agudo. Em estudos com ratos Wistar magros, foi observado aumento na expressão de ATGL no WAT após 24h de jejum, mas não de HSL. Após uma

realimentação de 3h, houve aumento na expressão de SREBP-1c (PALOU et al., 2008). Já em camundongos C57/BL6 magros, o jejum prolongado de 48h aumentou significativamente a expressão de ATGL e HSL no epWAT e ingWAT (TANG et al., 2017). Além disso, indivíduos submetidos a um jejum de 72h também demonstraram aumento na expressão de ATGL no WAT (NIELSEN et al., 2011). Contudo, em animais moderadamente obesos, foi observada resistência na perda de adiposidade, mesmo após período prolongado de jejum. A resistência a perda de adiposidade em camundongos obesos já foi reportada na literatura (UENO; ASAKAWA; INUI, 2007). Estudos prévios sugerem que a dificuldade em reduzir a adiposidade pode estar relacionada à inflexibilidade metabólica (MUOIO, 2014; GOODPASTER; SPARKS, 2017) e inflamatória observada em animais moderadamente obesos (LACERDA et al., 2019, 2020).

Nosso grupo de pesquisa já demonstrou que a expressão de SREBP-1 no epWAT de animais alimentados com dieta HC é maior do que naqueles alimentados com a dieta padrão ou rica em gorduras (HF) (FERREIRA et al., 2014). No presente trabalho evidenciamos aumento basal de LPL e SREBP-1c em animais moderadamente obesos. Durante os períodos de jejum de 24h e de 48h não ocorreu alteração da expressão do SREBP-1c, no epWAT e ingWAT. Por outro lado, a atividade do SREBP-1c aumentou intensamente no epWAT durante a realimentação com dieta padrão em animais magros e moderadamente obesos. Curiosamente, a realimentação de animais moderadamente obesos com dieta HC não gerou intensificação na expressão do SREBP-1c. Esse achado sugere que o grau de aumento da atividade do SREBP-1c difere de acordo com o tipo de tecido, duração do jejum e composição da dieta durante a realimentação. Dessa forma, uma dieta com características mais “saudáveis” parece modular mais apropriadamente a expressão de SREBP-1 no tecido adiposo.

A redução do tecido adiposo estimulada pela ação das enzimas ATGL e HSL eleva as concentrações locais de AGL e, conseqüentemente, o recrutamento de macrófagos adiposos (ATM), o aumento de citocinas pró-inflamatórias e o número de neutrófilos (KOSTELI et al., 2010; ASTERHOLM et al., 2012; LACERDA et al., 2019). Em estudo anterior do nosso grupo de pesquisa, verificou-se que em animais magros a redução de gordura corporal seguida por jejum de 24h levou ao aumento de citocinas inflamatórias no tecido adiposo, como IL-6, TNF, IL-10, TGF- β e CXCL-1, ao contrário do que ocorreu nos animais moderadamente obesos. Embora os animais moderadamente obesos tenham uma inflamação basal mais elevada, eles parecem incapazes de aumentar ainda mais a inflamação e, conseqüentemente, perder massa adiposa em proporções comparáveis aos animais magros (LACERDA et al., 2019). Em nosso

estudo, analisamos marcadores do processo inflamatório em animais magros e moderadamente obesos após um período de jejum prolongado e realimentação. Verificamos que o jejum prolongado aumentou a resposta inflamatória no tecido adiposo de camundongos magros. Já os animais moderadamente obesos apresentaram perda da capacidade de mobilizar substrato energético, juntamente com menor responsividade ao estímulo inflamatório proporcionado pelo jejum. Enquanto os animais magros têm aumento na expressão das citocinas TNF, IL10 e quimiocina CCL2, nos animais moderadamente obesos essa alteração não foi observada. Nossos resultados estão de acordo com outros estudos que encontraram aumento de mediadores da inflamação sistêmica após jejum (KOSTELI et al., 2010; DING et al., 2016; LIU et al., 2019; FAZELI et al., 2020) ou após indução de estímulo beta-adrenérgico (FLACH et al., 2013). Dessa forma, o aumento de mediadores inflamatórios parece desempenhar importante papel fisiológico no remodelamento do tecido adiposo. No entanto, a falta de uma resposta inflamatória sob estímulo agudo ao jejum pode estar relacionada à incapacidade de reduzir a adiposidade em indivíduos obesos, o que é conhecido como "inflexibilidade inflamatória". Esse estado pode dificultar a mobilização de gordura corporal durante o jejum, resultando em resistência à perda de peso e diminuição da eficácia do jejum como uma estratégia terapêutica para a obesidade.

O aumento da fibrose no tecido adiposo está associado à inflamação e resistência à insulina, sendo caracterizada pelo acúmulo de componentes da matriz extracelular, tais como colágeno e fibronectina. (CHRISTEN; CLÉMENT; SPIEGELMAN, 2010). Alguns estudos sugerem que a lipólise promovida pelo jejum no tecido adiposo pode levar ao aumento da produção de ERO e diminuição das defesas antioxidantes, o que pode causar estresse oxidativo e inflamação no tecido adiposo, que por sua vez pode levar à fibrose (LEMPESIS et al., 2020). Por isso, investigamos as alterações da arquitetura do tecido adiposo após jejum e realimentação. Curiosamente, animais moderadamente obesos não apresentaram aumento da deposição de matriz extracelular no WAT, sugerindo que a dieta rica em carboidratos refinados não foi suficiente para aumentar a fibrose como em uma dieta HF (LIU et al., 2019). Outro aspecto relevante é que animais obesos C3H/HeOuj apresentam maior propensão à fibrose no WAT, tornando-os um modelo interessante para avaliar essa condição nesse tecido adiposo específico, em contraste com os modelos BALB/c ou C57/BL6 (MARCELIN et al., 2017). Além disso, após jejum de 48h, nós observamos aumento agudo da fibrose tecidual inguinal, evidenciada pela hidroxiprolina, seguida de redução após realimentação em animais magros.

Em contrapartida, em animais moderadamente obesos, identificamos redução do conteúdo de hidroxiprolina inguinal após jejum e realimentação.

Na literatura, existe uma discrepância entre os dados apresentados de fibrose em indivíduos e animais obesos. O tecido adiposo obeso é marcado por hipertrofia dos adipócitos, a qual é acompanhada pelo aumento de fibrose com deposição de colágeno (WERNSTEDT ASTERHOLM; SCHERER, 2016). Entretanto, em estudo de Muir e colaboradores, indivíduos diabéticos apresentaram redução da deposição de matriz extracelular (MEC) em seus tecidos adiposos subcutâneo e visceral (MUIR et al., 2016). Nossos resultados, também demonstraram uma redução da fibrose no tecido adiposo epididimal em camundongos moderadamente obesos. Uma possível explicação para essas divergências pode estar na metodologia utilizada para detectar a deposição de MEC. Outra hipótese é de que a fibrose no tecido adiposo obeso seja marcada por outras características. Após avaliar o tecido adiposo de camundongos magros, foram encontradas grandes quantidades de MEC organizada em feixes fibrosos chamados de "septa". As septas são responsáveis por compartimentalizar a gordura em unidades menores. Em resposta à dieta HF, a septa reduziu significativamente (WERNSTEDT ASTERHOLM et al., 2014). Os autores supõem que o desaparecimento dessas septas possa ser um passo importante para permitir a expansão dos adipócitos. Em estudo com camundongos (TANAKA et al., 2014) e indivíduos obesos (CLÉMENT et al. 2010), o tecido adiposo apresentou aumento de fibrose perivascular, ou seja, fibras de colágeno ao redor dos adipócitos, ao invés de deposição de MEC no tecido visceral e subcutâneo. A fibrose perivascular está associada com CLS que estão aumentadas no tecido obeso, refletindo a “conversa” cruzada local de remanescentes de adipócitos com macrófagos infiltrados. Dessa forma, parece que a redução da MEC em animais moderadamente obesos, não reflete em redução da fibrose tecidual, sendo necessário levar em consideração a estrutura ou qualidade do colágeno ao avaliar mudanças na fibrose tecidual durante a perda de peso em estudos futuros.

Como mencionado anteriormente, o tecido adiposo pode expandir tanto por hipertrofia dos adipócitos, que é o aumento dos adipócitos, ou por hiperplasia, que é a diferenciação de novos adipócitos a partir de pré-adipócitos (WEN et al., 2022). A hipertrofia dos adipócitos pode ocasionar redução do fluxo sanguíneo para o tecido, assim como aumento na demanda de oxigênio, levando a aumento de hipóxia local do tecido adiposo. A hipóxia celular pode atuar como um gatilho para o início da inflamação e da fibrose do tecido adiposo, ativando o fator induzível por hipóxia (HIF-1 α) (LEE et al., 2014). A concentração de HIF-1 α já foi avaliada em camundongos magros e Ob/Ob após jejum e realimentação. Verificou-se aumento pós-

prandial das concentrações de HIF-1 α em animais magros (GARCÍA-FUENTES et al., 2015). Nossos dados corroboram com esse conceito, uma vez que a expressão de HIF-1 α estava aumentada em camundongos moderadamente obesos no epWAT e ingWAT. Curiosamente, no período da realimentação os tecidos apresentaram resultados controversos. No epWAT ocorreu aumento da expressão de HIF-1 α em animais moderadamente obesos após realimentação com dieta HC, enquanto no ingWAT ocorreu redução da expressão de HIF-1 α após jejum e realimentação com dieta padrão de animais magros e moderadamente obesos. Essa diferença entre os depósitos possivelmente acontece porque os adipócitos são menores no ingWAT e abaixo do limiar para a expressão gênica hipóxica.

Referente às alterações na adiposidade em função da troca de dieta, Schofield et al. (2016) avaliaram animais alimentados com uma dieta HF durante 6 semanas, seguidas de mais 6 semanas de dieta controle. Após este período de troca de dieta, foi observada diferença do tecido adiposo entre os animais que permaneceram na dieta HF e aqueles que trocaram para dieta padrão (SCHOFIELD et al., 2016). No nosso estudo, animais moderadamente obesos realimentados com dieta padrão não apresentaram redução de adiposidade quando comparados com aqueles realimentados com dieta HC. É importante ressaltar que em outros estudos que encontraram redução na adiposidade após a troca de dieta, os animais foram avaliados após um período prolongado de tempo. Portanto, a alteração aguda da dieta, ou seja, da dieta HC para a dieta padrão, parece não ter efeito sobre a adiposidade dos animais após jejum, quando avaliado a curto prazo.

Por outro lado, apesar de não haver alteração na adiposidade em animais moderadamente obesos após realimentação aguda com dieta padrão, outros parâmetros, como a distribuição da frequência de adipócitos, redução da expressão de HIF no ingWAT, o colesterol sérico, a leptina, a resistina, o aumento da razão adiponectina/resistina, a redução de leucócitos e a manutenção de granulócitos, foram alterados em comparação com os animais que permaneceram com a dieta HC após realimentação. Além disso, os animais moderadamente obesos apresentaram inflamação no período pós-prandial que dependia do tipo de dieta oferecida. Estes resultados foram marcados pelo aumento significativo do número de leucócitos, linfócitos e granulócitos circulantes, associados à maior concentração sérica de PTX3 e resistina em animais moderadamente obesos que foram realimentados com a dieta HC. O período pós-prandial, após o consumo agudo de diferentes dietas, já foi avaliado anteriormente. A ingestão aguda de uma dieta rica em frutose foi capaz de promover o aumento do número de leucócitos e as altas concentrações séricas de PTX3, leptina e resistina

(RODRIGUES et al., 2014). Assim, de acordo com a literatura, nossos dados indicam que em animais moderadamente obesos, o consumo de carboidratos refinados durante o período pós-prandial está associado a um perfil pró-inflamatório.

O acúmulo de gordura no fígado, também conhecido como doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), é uma desordem multifatorial que pode ocorrer em resposta a vários distúrbios metabólicos, incluindo o jejum (TARGHER et al., 2021). Os mecanismos por trás do acúmulo de gordura no fígado após o jejum não são totalmente compreendidos, mas vários mecanismos potenciais foram propostos: aumento de lipólise no tecido adiposo, redução de sensibilidade à insulina no fígado, aumento de inflamação transitória devido ao jejum e aumento de lipogênese *de novo* (CORDEIRO et al., 2020). Ademais, o jejum induz à produção hepática de glicose e corpos cetônicos, depleção de glicogênio e acúmulo de triacilglicerol. O acúmulo de triacilglicerol é uma resposta ao aumento da lipólise no tecido adiposo. O aumento da concentração de triglicerídeos e colesterol no soro pode ser devido à maior exportação hepática na forma de VLDL e, portanto, maior formação de LDL (RASINENI et al., 2021). Demonstramos que animais moderadamente obesos apresentam acúmulo ectópico de gordura hepática, acompanhado de aumento também no conteúdo hepático de triglicérides e colesterol. Fato esse evidenciado pela avaliação morfológica de contagem de gotículas no fígado. Após jejum prolongado, as gotículas lipídicas nos hepatócitos de animais magros apresentaram-se como macrovesículas, enquanto após o período da realimentação retornaram à conformação inicial. No período da realimentação ocorre a inibição da lipólise do tecido adiposo e a redução das gotículas lipídicas hepáticas e de triglicérides hepático.

A característica histopatológica da DHGNA consiste na presença de esteatose macrovesicular perivenular, que pode se estender pelo tecido hepático, dependendo da gravidade. A esteatose caracterizada por gotículas macrovesiculares é reversível, enquanto a esteatose microvesicular está correlacionada com alterações patológicas da DHGNA (TRANDA et al., 2011). Em nosso estudo, observamos aumento fisiológico de gotículas macrovesiculares em conjunto com a redução do tecido adiposo de animais magros. Em contrapartida, animais moderadamente obesos apresentaram principalmente gotículas microvesiculares. Após a realimentação com dieta padrão, esses animais apresentaram mudança no padrão de gotículas, com aumento de gotículas macrovesiculares no tecido hepático.

O aumento da aminotransferase sérica é um índice de lesão dos hepatócitos. Em linha com nossos estudos prévios e outros (ECHEVERRÍA et al., 2018), os camundongos moderadamente obesos, mesmo apresentando alterações hepáticas, não manifestaram alterações nas concentrações sistêmicas das enzimas AST e ALT. No entanto, de forma curiosa, o jejum prolongado reduziu as concentrações de AST em animais moderadamente obesos. Alguns estudos tem relatado a normalização das enzimas hepáticas após restrição alimentar e exercício físico (MALAGUARNERA et al., 2012; PARKER et al., 2012; HUANG et al., 2022). Além disso a redução do AST tem sido observada em animais alimentados com dieta HF após jejum de 48h (RASINENI et al., 2021). As alterações nas enzimas hepáticas em modelos de doença induzida por dieta são predominantemente associadas à ingestão excessiva de gordura na alimentação (ECHEVERRÍA et al., 2018; RASINENI et al., 2021; TERAYAMA et al., 2022; VARANI et al., 2022; ZHOU et al., 2017). Portanto, a hipótese é de que as alterações decorrentes do consumo de dieta rica em carboidratos refinados não sejam suficientes para estimularem alterações nas concentrações das transaminases e que, para tal, seja necessário um maior grau de dano hepático.

CONCLUSÃO

Embora a inflamação seja conhecida principalmente por seus efeitos prejudiciais em indivíduos obesos, mostramos que citocinas e células imunes também podem ter um propósito fisiológico que é o de mediar a remodelação do tecido adiposo. O jejum de 48h diminui a adiposidade promovendo o aumento da lipólise (ATGL e HSL) e de citocinas apenas no tecido adiposo de camundongos magros. Em contraste, na obesidade, as respostas inflamatórias são prejudicadas, mesmo após jejum prolongado, podendo ser esse um dos fatores responsáveis pela resistência a perda de peso nesses animais. Dessa forma, a inflexibilidade metabólica característica do tecido adiposo disfuncional é associada a uma “inflexibilidade inflamatória” que é observada como parte de um ciclo normal de alimentação/jejum.

A mudança no padrão alimentar, mesmo sem perda de peso, revelou-se importante para evitar a inflamação pós-prandial causada pelo consumo de dietas ricas em carboidratos refinados. A relação entre obesidade, inflamação de baixo grau e alto consumo de carboidratos é complexa e ainda está sob investigação, mas está se tornando evidente que controlar a ingestão de carboidratos e o índice glicêmico da dieta é um passo importante na prevenção da obesidade e das doenças relacionadas.

Embora muitos estudos tenham explorado os efeitos do jejum na adiposidade, ainda há questões importantes que permanecem sem resposta com relação ao período da realimentação. Por exemplo, é necessário caracterizar a infiltração de macrófagos no tecido adiposo durante o processo de jejum e realimentação, bem como determinar qual tipo de colágeno é depositado no tecido adiposo durante essas fases. Além disso, é preciso investigar se as mudanças no padrão alimentar após a realimentação mantêm as alterações encontradas no modelo agudo de jejum e redução de adiposidade de forma crônica. Estudos que elucidem os mecanismos moleculares subjacentes à manutenção da redução de adiposidade são fundamentais para o desenvolvimento de novos tratamentos e para a prevenção da obesidade.

Em conclusão, o estudo destaca a importância da inflamação no remodelamento do tecido adiposo e como a falta da flexibilidade inflamatória pode influenciar nesse processo. Também ressalta a relação entre obesidade, inflamação e consumo de carboidratos refinados, sugerindo a importância de controlar a ingestão desses alimentos para prevenir doenças relacionadas (Fig. 10).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALZAIM, I. et al. Adipose tissue immunomodulation: A novel therapeutic approach in cardiovascular and metabolic diseases. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, v. 7, n. November, p. 1–40, 2020.
- ANDRES, R.; CADER, G.; ZIERLER, K. L. The quantitatively minor role of carbohydrate in oxidative metabolism by skeletal muscle in intact man in the basal state; measurements of oxygen and glucose uptake and carbon dioxide and lactate production in the forearm. **Journal of Clinical Investigation**, v. 35, n. 6, p. 671–682, 1 jun. 1956.
- ANTON, S. D. et al. Flipping the Metabolic Switch: Understanding and Applying the Health Benefits of Fasting. **Obesity**, v. 26, n. 2, p. 254–268, 2018.
- 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, 2012.
- BAZHAN, N. et al. Sex Differences in Liver, Adipose Tissue, and Muscle Transcriptional Response to Fasting and Refeeding in Mice. **Cells**, v. 8, n. 12, p. 1529, 2019.
- BOOTH, A. et al. Adipose tissue: An endocrine organ playing a role in metabolic regulation. **Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation**, v. 26, n. 1, p. 25–42, 2016.
- BRAGA, T. T.; AGUDELO, J. S. H.; CAMARA, N. O. S. Macrophages during the fibrotic process: M2 as friend and foe. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. NOV, p. 1–8, 2015.
- BRIGGS, D. I. et al. Diet-Induced Obesity Attenuates Fasting-Induced Hyperphagia. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 23, n. 7, p. 620–626, 2011.
- CANCELLO, R.; CLÉMENT, K. Is obesity an inflammatory illness? Role of low-grade inflammation and macrophage infiltration in human white adipose tissue. **BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 113, n. 10, p. 1141–1147, 2006.
- CASTRO, A. M.; MACEDO-DE LA CONCHA, L. E.; PANTOJA-MELÉNDEZ, C. A. Low-grade inflammation and its relation to obesity and chronic degenerative diseases. **Revista Médica del Hospital General de México**, v. 80, n. 2, p. 101–105, 2017.
- CHEN, Y.; YU, Q.; XU, C. B. A convenient method for quantifying collagen fibers in atherosclerotic lesions by imagej software. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 10, n. 10, p. 14904–14910, 2017.
- CHOE, S. S. et al. Adipose tissue remodeling: Its role in energy metabolism and metabolic disorders. **Frontiers in Endocrinology**, v. 7, n. APR, p. 1–16, 2016.
- CHRISTEN, Y.; CLÉMENT, K.; SPIEGELMAN, B. M. **Novel Insights into Adipose Cell Functions**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010. v. 4
- COELHO, M.; OLIVEIRA, T.; FERNANDES, R. Biochemistry of adipose tissue: An endocrine organ. **Archives of Medical Science**, v. 9, n. 2, p. 191–200, 2013.

CORDEIRO, A. et al. Does adipose tissue inflammation drive the development of non-alcoholic fatty liver disease in obesity? **Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology**, p. 1–9, 2020.

DIMINA, L.; MARIOTTI, F. The Postprandial Appearance of Features of Dietary Substances. **Nutrients**, v. 1963, n. 11, p. 1–23, 2019.

DING, H. et al. Fasting induces a subcutaneous-to-visceral fat switch mediated by microRNA-149-3p and suppression of PRDM16. **Nature Communications**, v. 7, n. May, 2016.

DOS SANTOS, A. R. DE O. et al. Adipokines, myokines, and hepatokines: Crosstalk and metabolic repercussions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 5, p. 1–23, 1 mar. 2021.

DUNCAN, R. E. et al. Regulation of lipolysis in adipocytes. **Annual Review of Nutrition**, v. 27, p. 79–101, 2007.

DWAIB, H. S. et al. Modulatory Effect of Intermittent Fasting on Adipose Tissue Inflammation: Amelioration of Cardiovascular Dysfunction in Early Metabolic Impairment. v. 12, p. 626313, 2021a.

DWAIB, H. S. et al. Modulatory Effect of Intermittent Fasting on Adipose Tissue Inflammation: Amelioration of Cardiovascular Dysfunction in Early Metabolic Impairment. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, p. 626313, 9 abr. 2021b.

ECHEVERRÍA, F. et al. Attenuation of high-fat diet-induced rat liver oxidative stress and steatosis by combined hydroxytyrosol-(HT-) eicosapentaenoic acid supplementation mainly relies on HT. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, 2018.

FAZELI, P. K. et al. Prolonged fasting drives a program of metabolic inflammation in human adipose tissue. **Molecular Metabolism**, v. 42, n. September, p. 101082, 2020.

FERREIRA, A. V. M. et al. Distinct metabolic pathways trigger adipocyte fat accumulation induced by high-carbohydrate and high-fat diets. **Nutrition**, v. 30, n. 10, p. 1138–1143, 2014.

FLACH, R. J. R. et al. B3-Adrenergic Receptor Stimulation Induces E-Selectin-Mediated Adipose Tissue Inflammation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 4, p. 2882–2892, 2013.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **The Journal of biological chemistry**, v. 226, n. 1, p. 497–509, 1957.

FRÜHBECK, G. et al. **Regulation of adipocyte lipolysis**. [s.l: s.n.]. v. 27

GARCÍA-FUENTES, E. et al. Hypoxia is associated with a lower expression of genes involved in lipogenesis in visceral adipose tissue. **Journal of Translational Medicine**, v. 13, n. 1, p. 1–9, 2015.

GAYSINSKAYA, V. A. et al. Hyperphagia induced by sucrose: Relation to circulating and CSF glucose and corticosterone and orexigenic peptides in the arcuate nucleus. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 97, n. 3, p. 521–530, jan. 2011.

GEISLER, C. E. et al. Hepatic adaptations to maintain metabolic homeostasis in response to fasting and refeeding in mice. **Nutrition and Metabolism**, v. 13, n. 1, p. 1–13, 2016.

GHABEN, A. L.; SCHERER, P. E. Adipogenesis and metabolic health. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 20, n. 4, p. 242–258, 2019.

GIMENEZ DA SILVA-SANTI, L. et al. Liver Fatty Acid Composition and Inflammation in Mice Fed with High-Carbohydrate Diet or High-Fat Diet. 2016.

GOMES, J. A. S. et al. A high-refined carbohydrate diet facilitates compulsive-like behavior in mice through the nitric oxide pathway. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, v. 80, p. 61–69, 1 nov. 2018.

GOODPASTER, B. H.; SPARKS, L. M. Metabolic Flexibility in Health and Disease. **Cell Metabolism**, v. 25, n. 5, p. 1027–1036, 2017.

GOSMAIN, Y. et al. Regulation of SREBP-1 expression and transcriptional action on HKII and FAS genes during fasting and refeeding in rat tissues. **Journal of Lipid Research**, v. 46, n. 4, p. 697–705, 2005.

GOTTHARDT, J. D. et al. Intermittent fasting promotes fat loss with lean mass retention, increased hypothalamic norepinephrine content, and increased neuropeptide Y gene expression in diet-induced obese male mice. **Endocrinology**, v. 157, n. 2, p. 679–691, 2016.

GOTTHARDT, J. D.; BELLO, N. T. Meal pattern alterations associated with intermittent fasting for weight loss are normalized after high-fat diet re-feeding. **Physiology and Behavior**, v. 174, n. 2016, p. 49–56, 2017.

HACZEYNI, F.; BELL-ANDERSON, K. S.; FARRELL, G. C. Causes and mechanisms of adipocyte enlargement and adipose expansion. **Obesity Reviews**, v. 19, n. 3, p. 406–420, 2018.

HIBUSE, T. et al. Aquaporins and glycerol metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1758, n. 8, p. 1004–1011, 2006.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 860–867, 2006.

HOTAMISLIGIL, G. S.; SHARGILL, N. S.; SPIEGELMAN, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : Direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**, v. 259, n. 5091, p. 87–91, 1993.

HU, E.; LIANG, P.; SPIEGELMAN, B. M. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 18, p. 10697–10703, 1996.

HUANG, W. C. et al. Effects of exercise on high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease and lipid metabolism in ApoE knockout mice. **Nutrition and Metabolism**, v. 19, n. 1, p. 1–13, 2022.

JENSEN, T. L. et al. Fasting of mice: A review. **Laboratory Animals**, v. 47, n. 4, p. 225–240, 2013.

JIANG, G.; ZHANG, B. B. Glucagon and regulation of glucose metabolism. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 284, n. 4 47-4, 2003.

JOHNSTONE, A. Fasting for weight loss: An effective strategy or latest dieting trend?. **International Journal of Obesity**, v. 39, n. 5, p. 727–733, 2015.

KELLEY, D. E. et al. Skeletal muscle fatty acid metabolism in association with insulin resistance, obesity, and weight loss. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 277, n. 6 40-6, 1999.

KIM, K. et al. Cross-sectional relationship between dietary carbohydrate, glycaemic index, glycaemic load and risk of the metabolic syndrome in a Korean population. **British Journal of Nutrition**, v. 100, n. 03, p. 576–584, 10 set. 2008.

KIM, K. H. et al. Intermittent fasting promotes adipose thermogenesis and metabolic homeostasis via VEGF-mediated alternative activation of macrophage. **Cell Research**, v. 27, n. 11, p. 1309–1326, 2017.

KOBAYASHI, M. et al. Srebp-1c-dependent metabolic remodeling of white adipose tissue by caloric restriction. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 11, p. 1–11, 2018.

KOLB, H. et al. Ketone bodies: from enemy to friend and guardian angel. **BMC Medicine**, v. 19, n. 1, p. 1–15, 2021.

KOSTELI, A. et al. Kosteli 2010, JCI. Baja peso e inflamación..pdf. v. 120, n. 10, p. 3466–3479, 2010a.

KOSTELI, A. et al. Weight loss and lipolysis promote a dynamic immune response in murine adipose tissue. **Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 10, p. 3466–3479, 1 out. 2010b.

LACERDA, D. R. et al. Role of adipose tissue inflammation in fat pad loss induced by fasting in lean and mildly obese mice. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 72, 2019a.

LACERDA, D. R. et al. Role of adipose tissue inflammation in fat pad loss induced by fasting in lean and mildly obese mice. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 72, 1 out. 2019b.

LACERDA, D. R. et al. Mechanisms underlying fat pad remodeling induced by fasting: role of PAF receptor. **Nutrition**, v. 71, 1 mar. 2020a.

LACERDA, D. R. et al. Mechanisms underlying fat pad remodeling induced by fasting: role of PAF receptor. **Nutrition**, v. 71, 1 mar. 2020b.

LAFONTAN, M. Fat cells: Afferent and efferent messages define new approaches to treat obesity. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 45, p. 119–146, 2005.

LARABEE, C. M.; NEELY, O. C.; DOMINGOS, A. I. Obesity: a neuroimmunometabolic perspective. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 16, n. 1, p. 30–43, 2020.

LEE, S. et al. Adenylyl cyclase-associated protein 1 is a receptor for human resistin and mediates inflammatory actions of human monocytes. **Cell Metabolism**, v. 19, n. 3, p. 484–497, 2014a.

LEE, Y. S. et al. Increased adipocyte O₂ consumption triggers HIF-1 α , causing inflammation and insulin resistance in obesity. **Cell**, v. 157, n. 6, p. 1339–1352, 2014b.

LEMPEIS, I. G. et al. Oxygenation of adipose tissue: A human perspective. **Acta Physiologica**, v. 228, n. 1, p. 1–17, 2 jan. 2020.

LIU, B. et al. Markers of adipose tissue inflammation are transiently elevated during intermittent fasting in women who are overweight or obese. **Obesity Research and Clinical Practice**, v. 13, n. 4, p. 408–415, 2019a.

LIU, B. et al. Intermittent fasting improves glucose tolerance and promotes adipose tissue remodeling in male mice fed a high-fat diet. **Endocrinology**, v. 160, n. 1, p. 169–180, 2019b.

LONGO, M. et al. Adipose tissue dysfunction as determinant of obesity-associated metabolic complications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 9, 2019.

LONGO, V. D.; MATTSON, M. P. Fasting: Molecular mechanisms and clinical applications. **Cell Metabolism**, v. 19, n. 2, p. 181–192, 2014.

LOWE, D. A. et al. Effects of Time-Restricted Eating on Weight Loss and Other Metabolic Parameters in Women and Men with Overweight and Obesity: The TREAT Randomized Clinical Trial. **JAMA Internal Medicine**, v. 180, n. 11, p. 1491–1499, 2020.

LUMENG, C. N.; BODZIN, J. L.; SALTIEL, A. R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, 2007.

MAEDA, K. et al. cDNA Cloning and Expression of a Novel Adipose Specific Collagen-like Factor, apM1 (Adipose Most Abundant Gene Transcript 1)(Reprinted from **BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS**, vol 221, pg 286-289, 1996). **Biochemical and biophysical research communications**, v. 221, n. 2, p. 286–289, 1996.

MAGNÉ, J. et al. Early postprandial low-grade inflammation after high-fat meal in healthy rats: Possible involvement of visceral adipose tissue. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 21, n. 6, p. 550–555, 2010.

MALAGUARNERA, M. et al. Bifidobacterium longum with fructo-oligosaccharides in patients with non alcoholic steatohepatitis. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 57, n. 2, p. 545–553, 2012.

MARCELIN, G. et al. A PDGFR α -Mediated Switch toward CD9high Adipocyte Progenitors Controls Obesity-Induced Adipose Tissue Fibrosis. **Cell Metabolism**, v. 25, n. 3, p. 673–685, 2017.

MARTINS, L. B. et al. Paradoxical role of tumor necrosis factor on metabolic dysfunction and adipose tissue expansion in mice. **Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)**, v. 50, p. 1–7, 1 jun. 2018.

MATTSON, M. P. et al. Intermittent metabolic switching, neuroplasticity and brain health. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 19, n. 2, p. 81–94, 2018.

MENESES, M. E. et al. Postprandial inflammatory response in adipose tissue of patients with metabolic syndrome after the intake of different dietary models. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 55, n. 12, p. 1759–1770, 2011.

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**, v. 22, n. 3, p. 663–672, 2014.

MORIGNY, P. et al. Lipid and glucose metabolism in white adipocytes: pathways, dysfunction and therapeutics. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 0123456789, 2021.

MUIR, L. A. et al. Adipose tissue fibrosis, hypertrophy, and hyperplasia: Correlations with diabetes in human obesity. **Obesity**, v. 24, n. 3, p. 597–605, 2016.

MUOIO, D. M. Metabolic inflexibility: When mitochondrial indecision leads to metabolic gridlock. **Cell**, v. 159, n. 6, p. 1253–1262, 2014.

NIELSEN, T. S. et al. Dissecting adipose tissue lipolysis: Molecular regulation and implications for metabolic disease. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 52, n. 3, 2014.

OKAWA, T.; NAGAI, M.; HASE, K. Dietary Intervention Impacts Immune Cell Functions and Dynamics by Inducing Metabolic Rewiring. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 4 fev. 2021.

OLIVEIRA, M. C. DE et al. Platelet-activating factor modulates fat storage in the liver induced by a high-refined carbohydrate-containing diet. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 26, n. 9, p. 978–985, 2015.

OLIVEIRA, M. C. et al. Acute and sustained inflammation and metabolic dysfunction induced by high refined carbohydrate-containing diet in mice. **Obesity**, v. 21, n. 9, p. 396–406, 2013a.

OLIVEIRA, M. C. et al. Acute and Sustained Inflammation and Metabolic Dysfunction Induced by High Refined Carbohydrate-Containing Diet in Mice. **Obesity**, 2013b.

O'NEILL, L. A. J.; KISHTON, R. J.; RATHMELL, J. A guide to immunometabolism for immunologists. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 9, p. 553–565, 2016.

OSBORN, O.; OLEFSKY, J. M. The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. **Nature Medicine**, v. 18, n. 3, p. 363–374, 2012.

OUCHI, N. et al. Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 2, p. 85–97, 2011.

PALOU, M. et al. Sequential changes in the expression of genes involved in lipid metabolism in adipose tissue and liver in response to fasting. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v. 456, n. 5, p. 825–836, 2008.

PAPACKOVA, Z.; CAHOVA, M. Fatty Acid Signaling: The New Function of Intracellular Lipases. **Int. J. Mol. Sci**, v. 16, p. 3831–3855, 2015.

PARK, J. et al. Effect of alternate-day fasting on obesity and cardiometabolic risk: A systematic review and meta-analysis. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 111, p. 154336, 2020.

PARKER, H. M. et al. Omega-3 supplementation and non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Hepatology**, v. 56, n. 4, p. 944–951, 2012.

PARKS, E. J. Dietary carbohydrate's effects on lipogenesis and the relationship of lipogenesis to blood insulin and glucose concentrations. **British Journal of Nutrition**, v. 87, n. S2, p. S247–S253, 2002.

PATIKORN, C. et al. Intermittent Fasting and Obesity-Related Health Outcomes: An Umbrella Review of Meta-analyses of Randomized Clinical Trials. **JAMA Network Open**, v. 4, n. 12, p. 1–12, 2021.

PEDROSO, J. A. B. et al. Changes in leptin signaling by SOCS3 modulate fasting-induced hyperphagia and weight regain in Mice. **Endocrinology**, v. 157, n. 10, p. 3901–3914, 2016.

PELLEGRINELLI, V.; CAROBBIO, S.; VIDAL-PUIG, A. Adipose tissue plasticity: how fat depots respond differently to pathophysiological cues. **Diabetologia**, v. 59, n. 6, p. 1075–1088, 2016.

PENG, C. et al. Non-Alcoholic Steatohepatitis: A Review of Its Mechanism, Models and Medical Treatments. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, n. December, 2020.

PETTA, S. et al. Pathophysiology of non alcoholic fatty liver disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 12, 2016.

RASINENI, K. et al. Contrasting Effects of Fasting on Liver-Adipose Axis in Alcohol-Associated and Non-alcoholic Fatty Liver. **Frontiers in Physiology**, v. 12, n. March, p. 1–16, 2021.

RATH, M. et al. Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: Two competing arginine pathways in macrophages. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. OCT, p. 1–10, 2014.

RODEN, M.; SHULMAN, G. I. The integrative biology of type 2 diabetes. **Nature**, v. 576, n. 7785, p. 51–60, 2019.

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. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 25, n. 4, p. 388–394, 2014.

RODRÍGUEZ, A. et al. Revisiting the adipocyte: A model for integration of cytokine signaling in the regulation of energy metabolism. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 309, n. 8, p. E691–E714, 2015.

RUI, L. Energy Metabolism in the Liver. Em: **Comprehensive Physiology**. [s.l.] Wiley, 2014. v. 176p. 177–197.

RUIZ-OJEDA, F. J. et al. Extracellular matrix remodeling of adipose tissue in obesity and metabolic diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 19, 2019.

SCHEITHAUER, T. P. M. et al. **Gut Microbiota as a Trigger for Metabolic Inflammation in Obesity and Type 2 Diabetes**. **Frontiers in Immunology** Frontiers Media S.A., , 16 out. 2020.

SCHERER, P. E. et al. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 45, p. 26746–26749, 1995.

SCHOFIELD, S. E. et al. Metabolic dysfunction following weight cycling in male mice. **International Journal of Obesity**, v. 41, n. 3, p. 402–411, 2017.

SCHROEN, D. et al. Validation of an Off-the-Shelf , Diet-Induced NASH Mouse Model using Digital Whole Slide Scanning of Liver Tissue and Artificial Intelligence-Enabled , Quantitative. 2019.

SHIMOMURA, I. et al. Insulin resistance and diabetes mellitus in transgenic mice expressing nuclear SREBP-1c in adipose tissue: Model for congenital generalized lipodystrophy. **Genes and Development**, v. 12, n. 20, p. 3182–3194, 1998.

SMITH, U.; KAHN, B. B. Adipose tissue regulates insulin sensitivity: role of adipogenesis, de novo lipogenesis and novel lipids. **Journal of Internal Medicine**, v. 280, n. 5, p. 465–475, 2016.

SONG, Z.; XIAOLI, A. M.; YANG, F. Regulation and metabolic significance of De Novo lipogenesis in adipose tissues. **Nutrients**, v. 10, n. 10, p. 1–22, 2018.

STEPPAN, C. M. et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. p. 307–312, 2001.

SUTTON, E. F. et al. Early Time-Restricted Feeding Improves Insulin Sensitivity, Blood Pressure, and Oxidative Stress Even without Weight Loss in Men with Prediabetes. **Cell Metabolism**, v. 27, n. 6, p. 1212- 1221.e3, 2018.

TANAKA, M. et al. Macrophage-inducible C-type lectin underlies obesity-induced adipose tissue fibrosis. **Nature Communications**, v. 5, 2014.

TANG, H. N. et al. Plasticity of adipose tissue in response to fasting and refeeding in male mice. **Nutrition and Metabolism**, v. 14, n. 1, p. 1–14, 2017.

TARGHER, G. et al. The complex link between NAFLD and type 2 diabetes mellitus — mechanisms and treatments. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 0123456789, 2021.

TERAYAMA, Y. et al. High-fat diet-induced nonalcoholic steatohepatitis is accelerated by low carnitine and impaired glucose tolerance in novel murine models. **Laboratory Investigation**, v. 102, n. 6, p. 621–630, 2022.

UENO, N.; ASAKAWA, A.; INUI, A. Blunted metabolic response to fasting in obese mice. **Endocrine**, v. 32, n. 2, p. 192–196, 2007.

UNAMUNO, X. et al. Adipokine dysregulation and adipose tissue inflammation in human obesity. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 48, n. 9, p. 0–2, 2018.

VAN BAAK, M. A.; MARIMAN, E. C. M. Mechanisms of weight regain after weight loss — the role of adipose tissue. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 15, n. 5, p. 274–287, 2019.

VARANI, J. et al. Liver Protein Expression in NASH Mice on a High-Fat Diet: Response to Multi-Mineral Intervention. **Frontiers in Nutrition**, v. 9, n. May, p. 1–19, 2022.

WANG, W.; SEALE, P. Control of brown and beige fat development. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 17, n. 11, p. 691–702, 2016.

WANG, Y. et al. Macrophage-derived extracellular vesicles: diverse mediators of pathology and therapeutics in multiple diseases. **Cell Death and Disease**, v. 11, n. 10, 2020.

WEN, X. et al. Signaling pathways in obesity: mechanisms and therapeutic interventions. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 7, n. 1, p. 298, 28 ago. 2022.

WENSVEEN, F. M. et al. The “Big Bang” in obese fat: Events initiating obesity-induced adipose tissue inflammation. **European Journal of Immunology**, v. 45, n. 9, p. 2446–2456, 1 set. 2015.

WERNSTEDT ASTERHOLM, I. et al. Adipocyte inflammation is essential for healthy adipose tissue expansion and remodeling. **Cell Metabolism**, v. 20, n. 1, p. 103–118, 2014.

WERNSTEDT ASTERHOLM, I.; SCHERER, P. E. Fibrosis - Streaks and splatters: Some things are not always what they seem to be. **Obesity**, v. 24, n. 3, p. 552–553, 2016.

WOESSNER, J. F. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 93, n. 2, p. 440–447, maio 1961.

YOUNGSTROM, T. G.; BARTNESS, T. J. Catecholaminergic innervation of white adipose tissue in Siberian hamsters. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 268, n. 3 37-3, 1995.

ZENG, W. et al. Sympathetic Neuro-adipose Connections Mediate Leptin-Driven Lipolysis. **Cell**, v. 163, n. 1, p. 84–94, 24 set. 2015.

ZHANG, Y. et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, 1994.

ZHOU, D. et al. Sodium butyrate attenuates high-fat diet-induced steatohepatitis in mice by improving gut microbiota and gastrointestinal barrier. **World Journal of Gastroenterology**, v. 23, n. 1, p. 60–75, 2017.

ZHU, Q. et al. Neuroendocrine Regulation of Energy Metabolism Involving Different Types of Adipose Tissues. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 11, p. 2707, 1 jun. 2019.