

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

SALLY LIECHOCKI

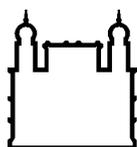
AVALIAÇÃO DO PERFIL INFLAMATÓRIO DE DIFERENTES DEPÓSITOS DE TECIDO
ADIPOSO NA OBESIDADE.

Tese apresentada ao Instituto
Oswaldo Cruz como parte dos requisitos
para obtenção do título de Doutor em
Biologia Celular e Molecular

Orientadora: Dr. Clarissa Menezes Maya Monteiro

RIO DE JANEIRO

Março, 2018



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Autor: SALLY LIECHOCKI

AVALIAÇÃO DO PERFIL INFLAMATÓRIO DE DIFERENTES DEPÓSITOS DE
TECIDO ADIPOSEO NA OBESIDADE.

ORIENTADOR: Prof. Dra. Clarissa Menezes Maya Monteiro

Aprovada em: 12/03/2018

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Carlos Escande, Instituto Pasteur de Montevideú

Prof. Dr. Marcus Fernandes de Oliveira, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

Prof. Dra. Patricia Cuervo Escobar, Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ/RJ)

Prof. Dra. Adriana Cesar Bonomo, Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ/RJ)

Prof. Dr. Bruno Lourenço Diaz, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

Rio de Janeiro, 12 de março de 2018.

Liechocki, Sally .

Avaliação do perfil inflamatório de diferentes depósitos de tecido adiposo na obesidade. / Sally Liechocki. - Rio de Janeiro, 2018.

XIII, 127f. f.; il.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2018.

Orientadora: Clarissa Menezes Maya Monteiro.

Bibliografia: f. 111-127

1. Obesidade. 2. Tecido adiposo . 3. Inflamação. 4. Adipócitos. 5. Leptina.
I. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais e irmão por todo o suporte durante esta longa jornada. Por compreenderem todos os momentos de estresse, ausências e angústia e por vibrarem junto a cada vitória.

À orientadora e amiga Clarissa Maya-Monteiro que me acompanhou durante todos esses anos. Obrigada pela dedicação, incentivo, confiança, pelos ensinamentos e técnicas canônicas de bancada e pelos truques Macgyver.

À Dra. Patrícia T. Bozza e Hugo Caire Castro-Faria-Neto por terem em recebido no seu laboratório e aos demais pesquisadores do laboratório, em especial aos mais próximos: Dra. Cecília Jacques Gonçalves de Almeida e Dra. Adriana Lima Vallochi.

Às integrantes do grupo Leptina Gláucia, Lohanna, Jéssica, Bárbara e Kamila por cuidarem dos experimentos quando não pude estar presente. Um obrigado especial à Gláucia que me ensinou o trato com os animais, pelas correções de inglês e por ser minha cia em terras estrangeiras.

Ao Dr. João Regis Carneiro, Ana Carolina Nader, Karina e Leandra que foram essenciais para condução deste trabalho e responsáveis por intermediar a coleta de amostras dos pacientes obesos.

A todos os profissionais do Programa Multidisciplinar de Atendimento ao Obeso Mórbido e do Hospital dos Servidores do Estado do Rio de Janeiro, em especial ao Dr. Antônio Augusto P. de Souza e Dr. Daniel Ferreira.

Ao Dr. Jens Rietdorf por sempre me mostrar novas oportunidades.

A todos que fizeram e fazem parte do grande laboratório de Imunofarmacologia por sempre compartilharem sempre conhecimento, trabalhos, ajustes de protocolo e muitas risadas. Em especial Alan, Surrage, Luciana, N. Roque, Juliana, V. Cardoso, Ana Paula, Maria Fernanda, Giselle e Nara que tornaram este meu percurso muito mais interessante.

Aos amigos e companheiros do turno da noite V. Guerra, Lívia e Ester e não menos importante Oswaldinho e Peggynha. Obrigada Vini por mostrar empolgação com a ciência mesmo em momentos de dificuldade. Ester e Lívia, muito obrigada por compartilharem comigo sua amizade, por me mostrarem o que é força, o significado de resiliência e a importância do estudo e paixão pela descoberta.

Ao Dr. Carlos Escande e Dr. Karsten Kristiansen pela gentileza de me receberem em seu laboratório e contribuírem para o desenvolvimento deste trabalho e meu desenvolvimento

profissional. Agradeço também ao Dr. Niels Banhos Danneskiold-Samsøe por confiar em mim e me mostrar novas áreas.

Ao Edson Assis e Rose Branco. O laboratório de Imunofarmacologia não existiria sem vocês. Obrigada por toda ajuda!

Ao Fernando Silva de Lima pelo auxílio com os cortes histológicos.

Aos funcionários do pavilhão 108: Edna, Bruno, Márcia, Fernanda, Aldo, Daniel e Maurício. Pessoas cujo suporte foi essencial para a boa condução desse trabalho.

Aos professores da banca de tese, que gentilmente aceitaram participar apesar do curto tempo entre a entrega da tese e a defesa! MUITÍSSIMO obrigada

À Julimar pela paciência, eficiência e cuidado com os alunos da pós-graduação de Biologia Celular e Molecular.

Ao CNPq, CAPES, FAPERJ e à FIOCRUZ pelo apoio científico e financeiro.

Aos voluntários que doaram seus tecidos para a realização deste estudo.

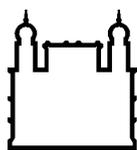
À Alexandra Elbakyan por toda ajuda durante este período.

A todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

A todos os amigos e familiares que de alguma forma contribuíram para esta conquista. Obrigada.

RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IX
LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE TABELAS	XIII
1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Obesidade	15
1.2 O tecido adiposo	19
1.2.1 Diferentes depósitos de tecido adiposo branco.....	20
1.2.2 O processo de adipogênese.....	24
1.3 O tecido adiposo, lipólise e lipotoxicidade.....	27
1.4 Adipocinas, inflamação e obesidade	30
1.5 Justificativa.....	35
2 OBJETIVOS	36
2.1 Objetivo geral	37
2.2 Objetivos específicos	37
3 MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1 Voluntários	39
3.2 Animais.....	40
3.3 Coleta de amostras de sangue e tecido adiposo humano.....	39
3.4 Coleta de sangue e tecido adiposo de modelo experimental de obesidade induzida por dieta	40
3.5 <i>Western Blot</i>	42
3.6 Dosagem de adipocinas	43
3.6.1 Ensaio multiplex	43
3.6.2 ELISA.....	44
3.7 PCR em tempo real.....	44
3.8 Fotos macroscópicas e histologia	46
3.9 Marcação de gota lipídica.....	47
3.9.1 Tecido adiposo branco.....	47
3.9.2 Avaliação da formação de gota lipídica em cultura de macrófagos	47
3.10 Fracionamento celular de tecido adiposo	48
3.10.1 Isolamento e cultivo de adipócitos maduros e fração estromal vascular.....	48

3.11	Indução de diferenciação adipogênica <i>in vitro</i>	49
3.12	Diferenciação de macrófagos a partir de medula óssea murina	49
3.13	Análise estatística	50
4	RESULTADOS	51
4.1	Dados clínicos - pacientes obesos e voluntários.....	52
4.2	Avaliação do perfil inflamatório plasmático	54
4.3	Aspecto macroscópico e análise histológica de tecido adiposo branco em indivíduos obesos	56
4.4	Avaliação de gota lipídica e proteínas relacionadas em tecido adiposo de pacientes obesos mórbidos	58
4.5	Comparação da expressão de proteínas relacionadas ao metabolismo lipídico em diferentes depósitos de tecido adiposo	60
4.6	Inflamação em diferentes depósitos de tecido adiposo humano.....	62
4.7	Caracterização do modelo de obesidade experimental induzida por dieta.....	69
4.8	Avaliação do perfil inflamatório em camundongos submetidos à dieta hiperlipídica	71
4.9	Avaliação da expansão dos diferentes depósitos de tecido adiposo.....	72
4.10	Avaliação da gota lipídica e proteínas relacionadas em tecido adiposo branco de camundongo ND x HFD.....	77
4.11	Inflamação em diferentes depósitos de tecido adiposo branco em camundongos ND <i>versus</i> HFD	79
4.12	Comparação da contribuição de adipócitos e da fração estromal vascular para o quadro inflamatório crônico presente na obesidade	82
4.13	Análise da modulação de macrófagos por adipócitos e pré-adipócitos de distintos depósitos de tecido adiposo de camundongos ND <i>versus</i> HFD	87
4.14	Avaliação da capacidade adipogênica de pré-adipócitos derivados de diferentes depósitos de tecido adiposo em camundongos ND x HFD	91
4.15	Quadro de resumo de resultados.....	93
5	DISCUSSÃO	95
6	CONCLUSÃO.....	109
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111



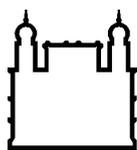
Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

RESUMO

O tecido adiposo desempenha papel fundamental na regulação do balanço energético e na modulação do sistema imune. A obesidade, caracterizada pelo excesso de tecido adiposo branco (WAT, do inglês *white adipose tissue*), é uma doença de caráter inflamatório crônico e que prejudica esses dois sistemas. Considera-se que depósitos de WAT distintos respondem de maneira diferente a estímulos lipolíticos, adipocinas e a mediadores lipídicos. Neste trabalho investigamos o perfil de mediadores inflamatórios de pacientes com obesidade mórbida (OB) e o papel de distintos depósitos de tecido adiposo humano e de modelo experimental de obesidade induzida por dieta no desenvolvimento da inflamação característica do grande obeso. Na análise dos níveis séricos de adipocinas observamos que o grupo OB apresentou níveis mais elevados de leptina e menores níveis circulantes de resistina, MCP-1/CCL2 PAI-1, TNF- α e IL-1 β quando comparados a indivíduos com IMC normal. Ainda, depósitos abdominais de tecido adiposo humano e depósitos de WAT murino foram investigados em relação à hipertrofia e mediadores inflamatórios. Amostras de tecido adiposo de indivíduos obesos foram obtidas durante cirurgia de gastroplastia. Os depósitos de tecido adiposo de camundongo C57BL/6J em dieta normal (ND) e dieta hiperlipídica (HFD) foram obtidos ao final de 3-5 meses de dieta. Os depósitos de WAT humano (SC-subcutâneo, PP- pré-peritoneal e VC-visceral) apresentaram diferenças macroscópicas como dimensão do lóbulo gorduroso e irrigação, todavia não observamos distinção no tamanho dos adipócitos maduros. Em humanos, o WAT pré-peritoneal apresenta maior expressão de ATGL quando comparado aos dois outros depósitos de WAT. O tecido adiposo VC apresenta maior nível da proteína ADRP e adiponectina, embora não tenha sido encontrada diferença na expressão de *mRNA* de *PLIN2* e *ADIPOQ*. A expressão de *PLIN1*, *LEPR* e *FABP4* também é semelhante nos tecidos SC, PP e VC de pacientes obesos, assim como a presença de perilipina avaliada por *Western blot*. Os depósitos de tecido adiposo humano variam bastante em relação aos mediadores inflamatórios. Observamos maior conteúdo de leptina, IFN γ e GM-CSF no extrato total de WAT SC em contraste com maior nível de MCP-1/CCL2 no extrato total de tecido adiposo PP. Entretanto, os depósitos de tecido adiposo humano apresentaram nível semelhante do marcador de macrófagos (CD14). Tal qual em humanos, os depósitos de WAT murino apresentam mesma quantidade de perilipina na análise por *Western blot*, mesmo depois de dieta hiperlipídica e consequente aumento ponderal. O tamanho dos adipócitos também varia entre os diferentes depósitos de WAT, com grande hipertrofia pós dieta *high-fat*, sendo menor no SC e maior no epididimal (EP). Observamos diminuição de PPAR γ 1 nos quatro depósitos de tecido adiposo em camundongos HFD. Ainda, observamos maiores níveis de citocinas pró-inflamatórias no WAT de camundongos HFD (leptina e MCP-/CCL2), além da mudança no perfil inflamatório de adipócitos maduros primários entre os diferentes depósitos de WAT também em decorrência de dieta hiperlipídica. Adipócitos murinos diferenciados *in vitro* apresentam perfil de secreção de citocinas diferente de células adiposas primárias, principalmente em relação à leptina. Nossos resultados sugerem que os distintos depósitos de tecido adiposo possuem variações no perfil inflamatório assim como em relação às enzimas associadas ao processo de lipólise que podem influenciar diretamente e de maneira distinta as alterações moleculares presentes durante a obesidade. Os modelos de obesidade experimental em camundongos, embora ajudem a esclarecer diversos mecanismos e vias de sinalização alterados na obesidade, não têm correlação direta aos depósitos de tecido adiposo subcutâneo e visceral em humanos.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ABSTRACT

The adipose tissue has a fundamental role in the regulation of energy homeostasis and immune system modulation. Obesity is a chronic inflammatory disease characterized by excess of adipose tissue, which contributes to the impairment of both systems. It is considered that distinct adipose tissue depots respond differently to lipolytic stimulus, adipokines and lipid mediator secretion. Here we evaluate the plasma cytokine profile of morbidly obese patients as well as the role of distinct abdominal adipose tissue depots from obese individuals (OB) and diet-induced obese mice (DIO) on the moderate chronic inflammatory feature present in obesity. In the analysis of serum adipokine levels, we observed that obese (OB) group had higher levels of leptin and lower circulating levels of resistin, MCP-1/CCL2, PAI-1, TNF- α and IL-1 β when compared to individuals with normal BMI. Furthermore, we investigate inflammatory mediators and hypertrophy of human abdominal adipose tissue and murine WAT depots. Adipose tissue samples from obese individuals were obtained during bariatric surgery. C57BL/6J murine adipose tissue depots were obtained from DIO mice, which were fed on high-fat diet (HFD) for 3-5 months, or from paired-lean mice fed with normal diet (ND). Human WAT depots (SC-subcutaneous, PP-preperitoneal and VC-visceral) showed macroscopic differences such as fat lobe size and blood irrigation, however we did not observe any distinction in the mature adipocytes size. In humans, PP adipose tissue has increased expression of ATGL when compared to the other WAT depots. VC WAT showed increased ADRP and adiponectin protein expression, although such outcome was not observed in *PLIN2* and *ADIPOQ* mRNA analysis. *PLIN1*, *LEPR* and *FABP4* expression was similar between SC, PP and VC tissue samples from morbidly obese patients, as well as perilipin protein expression analyzed by Western blot. The human adipose tissue depots presented great variation in relation to the inflammatory mediators. We observed higher content of leptin, IFN γ and GM-CSF in SC WAT in contrast to higher level of MCP-1/CCL2 in PP adipose tissue. Nevertheless, human adipose tissue depots had the same amount of CD14 macrophage marker. As in humans, murine adipose tissue showed same amount of perilipin, even after high-fat diet and consequent weight increase. All fat pads from DIO mice presented significantly hypertrophy when compared to WAT depots from lean mice. In addition, SC WAT had smaller adipocyte size and EP WAT had a larger size when comparing with VC and RP WAT in lean and obese mice. Also, PPAR γ 1 is decreased in the four adipose tissue depots from obese mice. In the analysis of inflammatory mediators, we observed higher levels of proinflammatory cytokines in the WAT from DIO mice (leptin and MCP-1/CCL2). Furthermore, primary mature adipocytes derived from different WAT depots showed changes in the inflammatory profile due to a high-fat diet. *In vitro* differentiated murine adipocytes showed different cytokine secretion profile from primary adipose cells, mainly in relation to leptin. Our results suggest that distinct adipose tissue depots have variations in the inflammatory profile as well as in enzymes associated to the lipolysis process that can directly and distinctly influence on the molecular alterations present during obesity. Also, experimental obesity models in mice do not make direct reference to subcutaneous and visceral adipose tissue depots in humans.

LISTA DE ABREVIATURAS

AdipoR	<i>Receptor de adiponectina</i>
ADRP	Perilipina 2 ou Adipofilina ou <i>adipose differentiation-related protein</i>
AFI	Índice de gordura abdominal (<i>Abdominal fat index</i>)
AKT	Proteína cinase B
API	Proteína ativadora 1 (<i>Activating protein 1</i>)
ASC	Célula tronco derivada de tecido adiposo (<i>Adipose-derived stem cells</i>)
ATGL	Lipase de triglicerídeos de adipócitos (<i>Adipocyte trygliceride lipase</i>)
BAT	Tecido adiposo marrom (<i>Brown adipose tissue</i>)
BMM	Macrófago derivado de medula óssea (<i>Bone marrow macrophage</i>)
BODIPY	<i>4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene</i>
C/EBP	<i>CAAT/enhancer binding proteins</i>
CD14	Grupo de diferenciação 14 (<i>Cluster of differentiation 14</i>)
cDNA	DNA complementar
CGI-58	Identificação genética comparativa 58 (<i>Comparative gene identification-58</i>)
GL	Gota lipídica
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DEPC	Dicarbonato de dietila
DIO	Obesidade induzida por dieta (<i>Diet induced obesity</i>)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i>
DMSO	<i>Dimetilsulfóxido</i>
DNA	Ácido desoxirribunucleico (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DT	Diabético
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática (<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
EP	Tecido adiposo epididimal
FABP4	Proteína de ligação à ácido graxo (<i>Fatty acid binding protein 4</i>)
FAS	Ácido graxo sintase (<i>Fatty acid synthase</i>)
FFA	Ácido graxo livre (<i>Free fatty acid</i>)
FSV	Fração estromal vascular
GM-CSF	<i>Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)</i>
H&E	Hematoxilina & eosina
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HCl	Ácido clorídrico

HDL	Lipoproteína de alta densidade (<i>High density lipoprotein</i>)
HFD	Dieta hiperlipídica (<i>High-fat diet</i>)
HSE	Paciente obeso
HSE-RJ	Hospital dos Servidores do Estado do Rio de Janeiro
HSL	Lipase sensível à hormônio (<i>Hormone sensitive lipase</i>)
HUCFF	Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
IBMX	Isometilbutilxantina
IFN	Interferon
IL	<i>Interleucina</i>
IMC	Índice de massa corporal
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida (<i>Induced Nitric oxide synthases</i>)
IRS	Substrato do receptor de insulina 1 (<i>Insulin receptor substrate 1</i>)
JAK	Proteína Janus cinase (<i>Janus kinase protein</i>)
LEPR	Receptor de leptina
MAD	Meio condicionado de adipócito maduro primário
MCP-1/CCL2	Proteína quimioatrativa de monócito 1 (<i>Monocyte chemoattractant protein 1</i>)
M-CSF	Fator estimulante de colônia (<i>Colony stimulating factor 1</i>)
MDI	Meio de indução
ME	Matriz extracelular
MHO	Obesidade metabólica saudável (<i>Metabolic health obesity</i>)
MM	Meio de maturação
mTOR	Alvo de rapamicina em mamíferos (<i>Mammalian target of rapamycin</i>)
ND	Dieta normolipídica (<i>Normal diet</i>)
NDT	Não diabético
NFκB	Fator nuclear kappa B (<i>Nuclear factor kappa B</i>)
OB	Paciente obeso
ObR	Ver LEPR
OGTT	Teste oral de tolerância à glicose (<i>Oral glucose tolerance test</i>)
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORO	<i>Oil red o</i>
OXPAT	Perilipina 5 ou <i>Lipid Storage Droplet Protein 5</i>
PAI-1	Inibidor do ativador de plasminogênio 1 (<i>Plasminogen activator inhibitor 1</i>)
PBS	<i>Tampão fosfato</i>
PI3K	<i>Fosfoinositol cinase 3</i>
PKA	Proteína cinase A

PLIN 1	Perilipina 1
PLIN2	Perilipina 2, adipofilina, ADRP
PP	Tecido adiposo pré-peritoneal
PPAR	Receptor ativado por proliferador de peroxisoma (<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>)
Pref-1	Fator de pré-adipócito 1 (<i>Preadipocyte factor 1</i>)
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
RNA	Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic acid</i>)
RP	Tecido adiposo retroperitoneal
RPM	Rotações por minuto
RXR	Receptor retinoico X (<i>Retinoic x receptor</i>)
RYGBP	<i>Roux-en-Y gastric bypass</i>
Sc	Tecido adiposo subcutâneo
SFB	Soro fetal bovino
SREBP-1	Proteína de ligação ao elemento de resposta ao esterol (<i>Sterol response element binding protein 1</i>)
STAT	Transdução de sinal e ativador de transcrição (<i>Signal transduction and activator of transcription</i>)
TAG	Triacilglicerol
TBST	Tampão TBS Tween
TGFβ	Fator de crescimento tumoral beta (<i>Tumor growth fator beta</i>)
Tip47	Perilipina 3 ou 47 <i>kda mannose 6-phosphate receptor-binding protein</i>
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa (<i>Tumor necrose fator alpha</i>)
UCP-1	Proteína desacopladora 1 (<i>Uncoupling protein 1</i>)
VC	Tecido adiposo visceral
WAT	Tecido adiposo branco (<i>White adipose tissue</i>)

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1 Mapa global de prevalência de obesidade (2015).</i>	16
<i>Figura 3 Depósitos de tecido adiposo subcutâneo e pré-peritoneal.</i>	21
<i>Figura 4 Imagens do omento maior e omento menor.</i>	22
<i>Figura 5 Depósitos de tecido adiposo murino.</i>	24
<i>Figura 6 Adipogênese.</i>	27
<i>Figura 7 Regulação do processo de lipólise.</i>	29
<i>Figura 8 Inflamação do tecido adiposo.</i>	34
<i>Figura 9 Avaliação do perfil inflamatório dos pacientes com obesidade mórbida.</i>	55
<i>Figura 10 Aspecto macroscópico e hipertrofia de tecido adiposo humano.</i>	57
<i>Figura 11 Avaliação do tamanho de gota lipídica e proteínas relacionados em tecido adiposo humano.</i>	59
<i>Figura 12 Comparação do metabolismo lipídico em diferentes depósitos de tecido adiposo humano.</i>	61
<i>Figura 13 Avaliação de PPARγ em tecido adiposo.</i>	63
<i>Figura 14 Avaliação de TNF-α em tecido adiposo.</i>	63
<i>Figura 15 Avaliação de leptina e adiponectina em tecido adiposo abdominal.</i>	65
<i>Figura 16 Comparação de MCP-1/CCL2 e GM-CSF em tecido adiposo branco.</i>	67
<i>Figura 17 Análise de lisado proteico de três diferentes depósitos de tecido adiposo branco.</i>	68
<i>Figura 18 Caracterização do modelo de obesidade induzida por dieta hipercalórica.</i>	70
<i>Figura 19 Avaliação do perfil inflamatório de camundongos C57B/16 sob dieta HFD.</i>	71
<i>Figura 20 Foto representativa de aumento de peso induzido por dieta hipercalórica. e</i>	74
<i>Figura 21 Medidas de peso de diferentes depósitos de tecido adiposo branco.</i>	75
<i>Figura 22 Avaliação da hipertrofia de tecido adiposo.</i>	76
<i>Figura 23 Avaliação do tamanho de gota lipídica em tecido adiposo murino.</i>	78
<i>Figura 24 Comparação da expressão de PPARγ em diferentes depósitos de tecido adiposo.</i>	80
<i>Figura 25 Comparação da expressão de TNF-α em diferentes depósitos de tecido adiposo.</i>	80
<i>Figura 26 Quantificação de adipocinas em lisado de tecido adiposo.</i>	81
<i>Figura 27 Leptina em adipócitos e fração estromal vascular.</i>	84
<i>Figura 28 MCP-1/CCL2 em adipócitos e fração estromal vascular.</i>	85
<i>Figura 29 Citocinas em adipócitos primários e diferenciados in vitro.</i>	86
<i>Figura 30 Formação de corpúsculos lipídicos por meio condicionado de adipócitos.</i>	89
<i>Figura 31 Perfil de secreção de citocinas por macrófagos estimulados com MAD e meio condicionado de FSV.</i>	90
<i>Figura 32 Avaliação do potencial adipogênico.</i>	92

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1 Classificação dos graus de severidade de obesidade.</i>	16
<i>Tabela 2 Risco de desenvolvimento de comorbidades baseado na cintura pélvica.</i>	17
<i>Tabela 3 Formulação das rações.</i>	41
<i>Tabela 4 Teor nutricional das rações.Tabela 5 Formulação das rações.</i>	41
<i>Tabela 6 Teor nutricional das rações.</i>	42
<i>Tabela 7 Teor nutricional das rações.</i>	42
<i>Tabela 8 Lista de anticorpos</i>	43
<i>Tabela 9 Informações clínicas dos voluntários sadios</i>	53
<i>Tabela 10 Informações clínicas dos pacientes obesos mórbidos.</i>	53
<i>Tabela 11 Comparação das características de tecido adiposo humano e murino</i>	93
<i>Tabela 12 Comparação das características de tecido adiposo de camundongo ND versus HFD</i>	93
<i>Tabela 13 Comparação entre adipócitos e FSV em camundongos ND versus HFD</i>	94

1 INTRODUÇÃO

1.1 Obesidade

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a obesidade é uma doença que tem como característica o acúmulo excessivo de tecido adiposo branco (WAT) de modo a apresentar risco à saúde. O aumento da adiposidade é consequência principal do desbalanço energético, no qual o predomínio do ganho de energia resulta em hiperplasia e hipertrofia do tecido adiposo (Drolet et al. 2008; Arner et al. 2010). Segundo a OMS, o número de pessoas obesas quase triplicou desde 1975, alcançando em 2016 mais de 650 milhões de indivíduos adultos obesos (figura 1) e cerca de 1,9 bilhões de pessoas acima de 18 anos com sobrepeso em todo mundo. A obesidade, antigamente considerada um problema de países desenvolvidos, passou a ser um grande problema de saúde também para países em desenvolvimento, acometendo principalmente indivíduos de baixa renda (WHO, 2017).

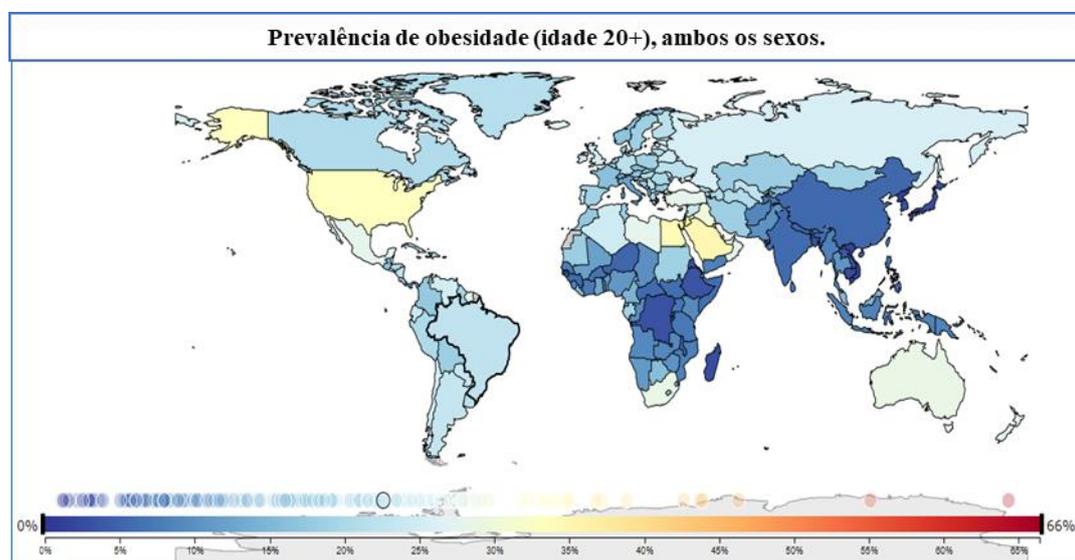


Figura 1 **Mapa global de prevalência de obesidade (2015)**. Observa-se neste mapa o percentual de indivíduos adultos (idade igual ou superior a 20 anos) obesos através de escala de cores, na qual azul representa menor incidência e vermelho maior incidência de obesidade. (Adaptado de <https://vizhub.healthdata.org/obesity/>)

No Brasil, observamos nos últimos dez anos um aumento de 60% na prevalência de adultos obesos, passando de 11,6% em 2006 para 18,9% em 2016. Ainda segundo dados do Ministério da Saúde, indivíduos com sobrepeso representam mais da metade da população adulta brasileira (53,8%). O aumento do peso engloba ambos os sexos, registrando-se 57,7% de excesso de peso em homens e 50,5% em mulheres (figura 2), sendo mais afetados indivíduos de menor escolaridade e baixa renda (Ministério da Saúde 2017).

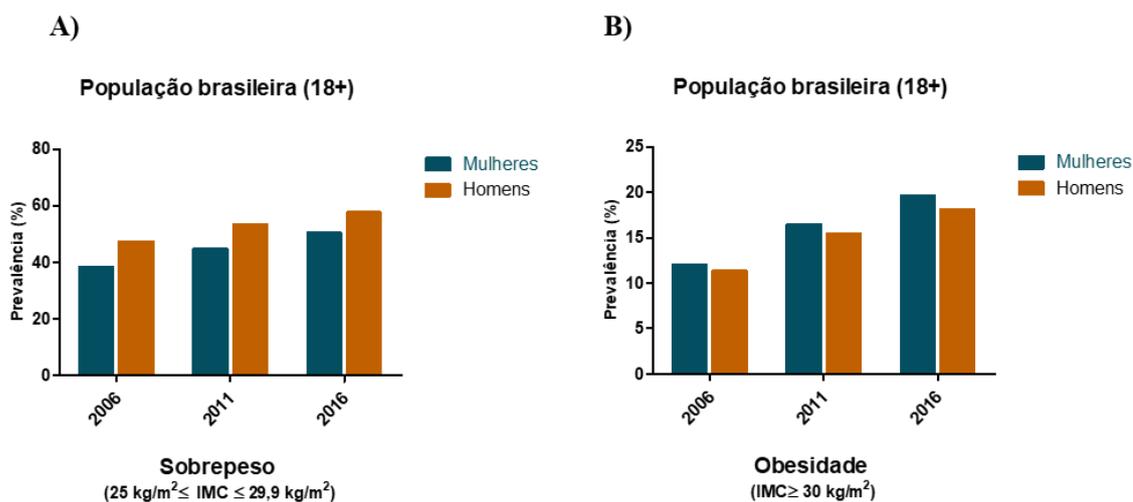


Figura 2 **Obesidade no Brasil (2016)**. Dados divulgados pelo Ministério da Saúde brasileiro, referentes à pesquisa Vigitel no ano de 2016. Os gráficos A e B, mostram a prevalência de sobrepeso e obesidade em mulheres e homens brasileiros, respectivamente.

O desenvolvimento do quadro de obesidade tem etiologia multifatorial, estreitamente relacionada com fatores ambientais, como o aumento do consumo de alimentos e bebidas altamente calóricos e de fraco potencial nutritivo, sedentarismo, bem como fatores socioeconômicos e culturais (Kudel et al. 2018). Outros fatores como estresse, alteração de microbiota intestinal, fatores genéticos e fisiológicos (principalmente distúrbios hormonais) podem também ser responsáveis pela predisposição individual para o aumento de peso. O conjunto destes fatores elevam esta doença a um patamar altamente complexo e de difícil tratamento (Bouchard et al. 1990; Wang & Crespi 2011; Delavari et al. 2013).

A obesidade é uma doença definida pelo aumento excessivo de tecido adiposo branco e pode ser classificada em diferentes graus de severidade, usando o índice de massa corporal (IMC) como indicador. IMC é obtido através da razão entre o peso (quilos) e o quadrado da altura (em metros) e é usado para determinar faixas de peso ideais ou aquelas que podem levar a um comprometimento da saúde de acordo com a tabela abaixo:

Tabela 1 **Classificação dos graus de severidade de obesidade**. Adaptado de https://www.nhlbi.nih.gov/health/educational/lose_wt/BMI/bmi_dis.htm

	IMC (kg/m ²)	Grau de obesidade
Abaixo do peso	< 18,5	
Peso normal	18,5 – 24,9	
Sobrepeso	25 – 29,9	
Obesidade	30 – 34,9	I
	35 – 39,9	II
Obesidade mórbida	40 ≤	III

O acúmulo de tecido adiposo no quadro de obesidade pode ocorrer de duas diferentes formas, dividindo a obesidade em duas categorias: 1- obesidade ginecoide, na qual o excesso de tecido adiposo acumula-se na região gluteofemoral e 2- obesidade androide, na qual a maior parte do tecido adiposo se concentra na região abdominal. A partir desta divisão, outro indicador usado para predizer o grau de severidade de obesidade e risco do desenvolvimento de outras co-morbidades é a circunferência da cintura pélvica (tabela 2), uma vez que o aumento na circunferência da cintura está relacionado ao aumento de gordura visceral na região abdominal e desenvolvimento de síndrome metabólica (Després 2006).

Tabela 2 **Risco de desenvolvimento de comorbidades baseado na cintura pélvica.** Adaptado de https://www.nhlbi.nih.gov/health/educational/lose_wt/BMI/bmi_dis.htm

Risco relativo ao peso e circunferência da cintura

	Grau de Obesidade	Homem ≤102cm	Homem >102cm
		Mulher ≤88 cm	Mulher > 88 cm
Abaixo do peso		-	-
Peso normal		-	-
Sobrepeso		Aumentado	Alto
Obesidade	I	Alto	Muito alto
	II	Muito alto	Muito alto
Obesidade mórbida	III	Extremamente alto	Extremamente alto

O termo Síndrome metabólica ou síndrome X, foi proposto por Reaven pela primeira vez em 1988, quando este sugeriu uma correlação entre pacientes com resistência à insulina/diabetes e hipertensão (Reaven 1993). A identificação síndrome metabólica é importante uma vez que o conjunto de sintomas presentes neste quadro clínico predispõe o indivíduo a desenvolver diabetes *mellitus* tipo II e doenças cardiovasculares, levando à uma piora de qualidade de vida e elevada mortalidade. Assim, o estabelecimento do quadro de síndrome metabólica é definido quando pelo menos três dos seguintes fatores estão presentes: obesidade central, hiperglicemia, hipertensão, baixo HDL e hipertrigliceridemia (Eckel et al. 2005; Han & Lean 2016).

A obesidade central, com aumento do tecido adiposo visceral, contribui de forma importante para o desenvolvimento da síndrome metabólica. O aumento da liberação de ácidos graxos livres para a veia porta como resposta da grande capacidade lipolítica do tecido adiposo visceral pode levar a alterações no metabolismo de ácidos graxos e consequentemente

diminuição da resposta tecidual à insulina. Essa resistência à ação da insulina acarreta uma diminuição da captura de glicose pelo músculo e permanente produção de glicose hepática, mesmo em níveis elevados de glicose sanguínea (Klein 2004; Cornier et al. 2008).

Como descrito anteriormente, a obesidade é uma doença crônica e de origem multifatorial, sendo necessárias diferentes abordagens terapêuticas para seu tratamento. O tratamento correto da obesidade consiste em adoção de dieta nutricional adequada, prática de exercícios, acompanhamento psicológico, uso de medicamentos e em casos que não respondem à terapia clínica, faz-se necessária intervenção cirúrgica (gastroplastia).

Existem diversos tipos de gastroplastia (cirurgia bariátrica) para o tratamento da obesidade mórbida (IMC > 40) e suas co-morbidades. As abordagens cirúrgicas mais comuns são: balão gástrico (procedimento temporário) e as gastroplastias com técnicas de *by-pass* (RYGBP) e *sleeve* (procedimentos permanentes). A intervenção cirúrgica para tratamento da obesidade é relativamente nova, no entanto, vem apresentando uma rápida evolução e diferentes aplicações. Essas cirurgias podem ser caracterizadas como cirurgias metabólicas, uma vez que sua aplicação pode ser estendida além do objetivo de perda de peso efetiva e sua manutenção, sendo também usadas para o tratamento, por exemplo, de diabetes *Mellitus* tipo II grave (Keidar 2011; Buchwald 2014). Em um estudo recente, Oliveira e colaboradores mostraram que os gastos com saúde pública associados à obesidade, em 2011 no Brasil, chegam a um total de 269,6 milhões de dólares e cerca de 17,4 milhões de dólares gastos em cirurgias bariátricas para o tratamento desta doença (Oliveira 2013; De Oliveira et al. 2015; Tremmel et al. 2017).

Indivíduos obesos mórbidos submetidos à gastroplastia apresentam perda ponderal acentuada e melhora no quadro metabólico, entretanto, o re-ganho de peso não é incomum nestes pacientes. Hagman e colaboradores mostraram que embora tenha ocorrido melhora no quadro de sensibilidade à insulina e redução de inflamação sistêmica, o tecido adiposo subcutâneo dos pacientes avaliados neste estudo apresentava biomarcadores de disfunção tecidual e inflamação inalterados e sem modificações expressivas em relação ao infiltrado leucocitário (Hagman et al. 2017). Em outro estudo, Baptista e colaboradores demonstraram que o tecido adiposo subcutâneo de pacientes ex-obesos apresentava modificações em relação à irrigação sanguínea e conteúdo de células tronco-mesenquimais (Baptista et al. 2009). Nosso grupo também mostrou que o tecido adiposo subcutâneo de pacientes ex-obesos apresentavam maior capacidade adipogênica quando comparados à indivíduos hígidos e obesos (Silva et al. 2015). Essas alterações no perfil do tecido adiposo podem ter implicações no reganho de peso dos pacientes submetidos à cirurgia bariátrica. Com isso há a necessidade de maior

entendimento das alterações moleculares no tecido adiposo durante obesidade para possibilitar o desenvolvimento de terapias mais efetivas.

1.2 O tecido adiposo

A associação entre o excesso ponderal, o desenvolvimento de síndrome metabólica e outras co-morbidades como doenças cardiovasculares, doenças hepáticas diabetes *mellitus* tipo II, câncer e distúrbios respiratórios tem sido diretamente correlacionada com a condição de moderada inflamação crônica presente no tecido adiposo do grande obeso (Rodén 2006; Bremer & Jialal 2013; De Pergola & Silvestris 2013; Rega-Kaun et al. 2013). A descoberta de que o tecido adiposo exercia papel central no controle da homeostase energética e que este órgão era capaz de secretar diversas citocinas e o aumento exponencial do número de pessoas obesas no mundo todo, colocou o tecido adiposo como alvo de intenso estudo (Pubmed 2018).

O tecido adiposo possui uma gama de funções no organismo, como o armazenamento de calorías em forma de lipídios e o controle da homeostase energética; regulação do sistema reprodutivo através do fornecimento de nutrientes e da sinalização do eixo hipotálamo-hipófise – gônadas (Michalakis et al. 2013); proteção mecânica e térmica. Classicamente o tecido adiposo era dividido em dois tipos: tecido adiposo branco e tecido adiposo marrom. O tecido adiposo branco é o mais abundante em mamíferos, sendo constituído por grandes adipócitos esféricos, uniloculares cuja gota lipídica ocupa quase todo o volume dessas células (Lee et al. 2013). Os adipócitos do tecido adiposo branco apresentam grande capacidade de crescimento, podendo variar de 30 µm a 130 µm e sua capacidade metabólica está diretamente associada ao seu tamanho. O tecido adiposo branco é um órgão especializado no armazenamento de energia, atuando como um centro regulador do metabolismo energético. Com o avanço dos estudos sobre o tecido adiposo, novas funções foram atribuídas a ele. A descoberta de que os adipócitos eram capazes de secretar diversas citocinas/quimiocinas e hormônios, elevou a importância do tecido adiposo branco a um novo patamar, sendo considerado um órgão capaz de modular e interagir com o sistema neuroimunendócrino (Qatanani & Lazar 2007). Essas características colocaram o tecido adiposo como protagonista no estudo do desenvolvimento de obesidade e outras doenças metabólicas tais como diabetes, lipodistrofias, dislipidemia, entre outras (Bremer & Jialal 2013; Klop et al. 2013).

Considera-se atualmente que a localização do depósito de tecido adiposo e não só o aumento excessivo desse tecido é a maior complicadora do quadro de obesidade e co-morbidades (Lee et al. 2013). O tecido adiposo branco está distribuído em diversos sítios anatômicos e varia em relação à estrutura, perfil de expressão gênica, inervação, oxigenação, suporte de nutrientes, entre outros (Wronska & Kmiec 2012).

O tecido adiposo marrom ou BAT (do inglês *brown adipose tissue*) é caracterizado por possuir adipócitos de menor tamanho, multiloculares, enriquecidos em mitocôndrias e com grande expressão basal da proteína UCP-1 (do inglês *Uncoupling Protein 1*). Embora os adipócitos do BAT tenham alta capacidade de absorção de nutriente, não se observa grande capacidade hipertrófica, uma vez que a maior parte destes lipídios é prontamente consumida no processo de termogênese, que constitui a principal função desta célula (Warner & Mittag 2015).

A divisão entre os diferentes tipos de tecido adiposo tem origem na característica morfológica da principal célula deste órgão – o adipócito – assim como na embriogênese e na sua principal função no organismo. Assim, pode-se descrever atualmente um terceiro tipo de tecido adiposo: o tecido adiposo bege ou “brite” (origem na fusão das duas palavras em inglês *brown* e *white*). A observação de que era possível encontrar adipócitos multiloculares ricos em UCP-1 em depósitos de tecido adiposo branco foi feita por Young e colaboradores há cerca de 30 anos (Young et al. 1984). Entretanto, a primeira menção à existência de um tecido adiposo “conversível” foi feita por Loncar e colaboradores só em 1991 (Loncar 1991). Os adipócitos beges apresentam um padrão de expressão gênica sobreposto entre adipócitos marrons e clássicos adipócitos de tecido adiposo branco. Estas células não apresentam expressão basal de UCP-1, porém após estímulo termogênico (exposição ao frio ou estímulo noradrenérgico), esta proteína é altamente induzida nestas células e o processo de geração de calor ocorre (Rosen & Spiegelman 2014a; Warner & Mittag 2015).

1.2.1 Diferentes depósitos de tecido adiposo branco

A distribuição do tecido adiposo branco varia entre espécies. Em humanos, o tecido adiposo branco é dividido em dois grandes depósitos: subcutâneo (SC) e visceral (VC). O tecido adiposo subcutâneo está localizado na camada hipodérmica da pele e distribuído pela região abdominal, glúteos e região femoral. Já o tecido adiposo visceral localiza-se na região intraperitoneal e pode ser compreendido em três grandes depósitos principais: omento, tecido adiposo mesentérico e tecido adiposo retroperitoneal. Existem outros pequenos depósitos de tecido adiposo visceral localizados no mediastino e cercando órgãos específicos, como os tecidos adiposos epicárdico, epigástrico e perivascular (Wronska & Kmiec 2012; Chusyd et al. 2016).

Diversos estudos têm correlacionado a obesidade central com uma maior chance de desenvolver síndrome metabólica (Després & Lemieux 2006; Tchernof & Despres 2013). Este aumento da circunferência abdominal no grande obeso provém da hipertrofia de diferentes depósitos de tecido adiposo na parede abdominal ou intra-abdominal. O tecido adiposo subcutâneo da região abdominal é dividido em duas camadas (superficial e profunda). A camada

SC superficial é dividida em septos fasciais organizados e compactos, enquanto a camada mais profunda do tecido adiposo SC demonstra variações regionais em relação ao seu quadro fascial, relativamente frouxo e menos organizado (figura 3) (Markman & Barton 1987; Tchernof & Despres 2013).

As lâminas membranáceas localizadas abaixo da camada mais profunda de tecido adiposo subcutâneo constituem a fáscia parietal do abdômen (endoabdominal). Junto à porção mais interna da região endoabdominal, está situado o peritônio parietal. Este é separado da fáscia transversal por uma quantidade variável de gordura extraperitoneal (pré-peritoneal) (figura 3A) (Moore et al. 2014). O tecido adiposo pré-peritoneal (PP) representa uma fina camada de depósito gorduroso em indivíduos com IMC normal, entretanto, com advento do quadro de obesidade, este tecido apresenta um crescimento importante (figura 3B). Embora o tecido adiposo pré-peritoneal seja um importante contribuinte para o volume abdominal do grande obeso, pouco se sabe a respeito deste depósito de tecido adiposo (Enevoldsen et al. 2001; Fernández et al. 2010).

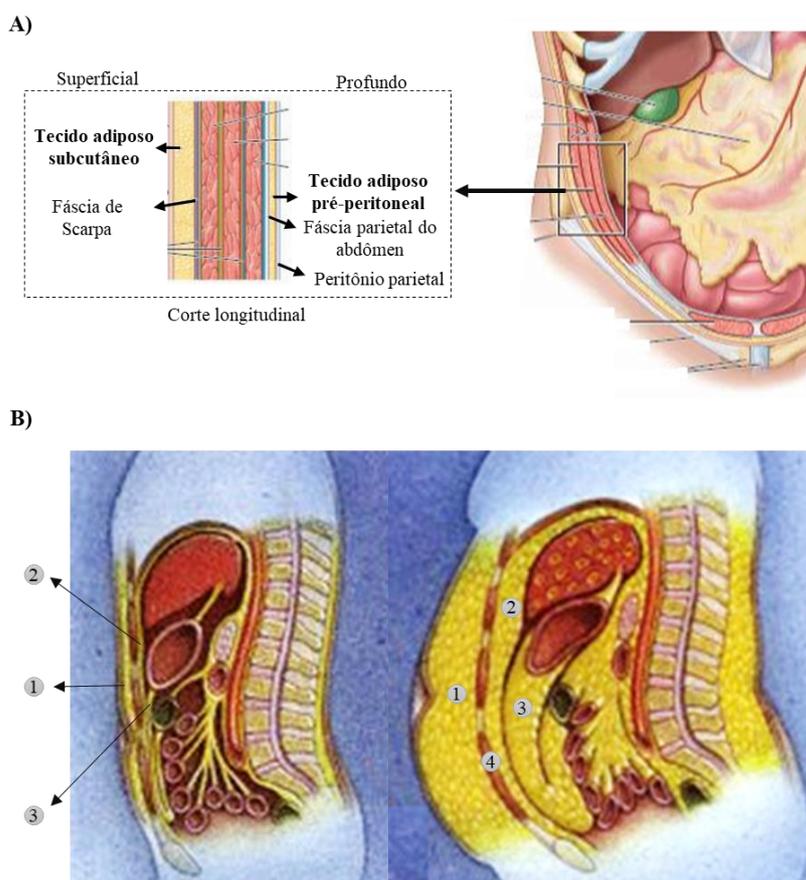


Figura 3 **Depósitos de tecido adiposo subcutâneo e pré-peritoneal.** Esquema dos diferentes depósitos de tecido adiposo humano na região abdominal. A) Corte longitudinal da parede abdominal, com destaque para os tecidos adiposos subcutâneo e pré-peritoneal. B) Imagem ilustrativa do aumento dos depósitos de tecido adiposo abdominal em indivíduos obesos: 1- Tecido adiposo subcutâneo, 2- Tecido adiposo pré-peritoneal, 3- Omento maior (visceral), 4- Músculo da parede abdominal. Ilustrações adaptadas de Moore, *Anatomia aplicada à clínica* (2014) e <http://www.entwellbeing.com.au/body-shape/>.

O omento (omento maior) é uma prega proeminente em quatro camadas, que vai da curvatura maior do estômago e da parte proximal do duodeno, dobra-se como um avental e se fixa à face anterior do colo transversal e mesentério. Este tecido impede a junção entre peritônio parietal e visceral e serve como proteção dos órgãos abdominais contra lesões e proporciona isolamento contra a perda de calor (figura 4) (Moore et al. 2014).

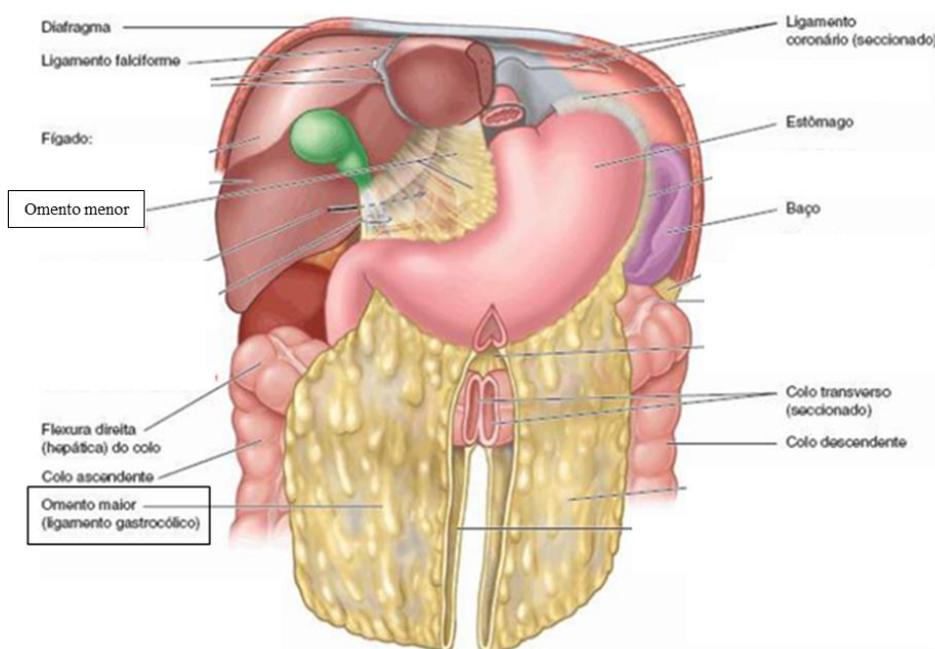


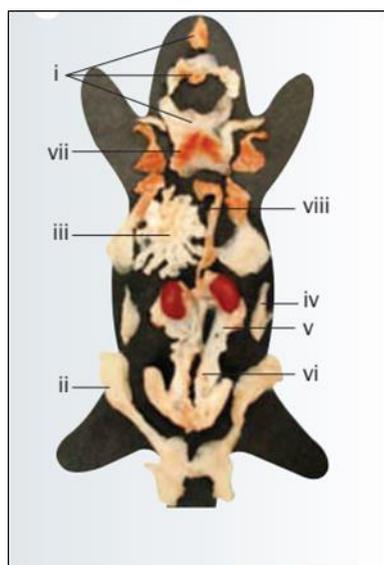
Figura 4 **Imagens do omento maior e omento menor.** Na imagem a parte central do omento maior foi seccionada para mostrar sua relação com o colo transversal. Ilustração adaptada de Moore, *Anatomia aplicada à clínica* (2014).

O aumento de tecido adiposo localizado principalmente na região abdominal tem sido utilizado na clínica como um preditivo direto para o desenvolvimento de distúrbios metabólicos e cardiovasculares (Liu et al. 2003; Elffers et al. 2017; Seyfart et al. 2018). Contudo, como descrito acima, o aumento da circunferência pélvica é consequência da expansão de diferentes depósitos de tecido adiposo; não obstante seja comum a associação do volume abdominal na obesidade androide como aumento principal de gordura visceral. A avaliação da gordura abdominal é feita, em sua maioria, através de imagens como ressonância magnética ou tomografia computadorizada (Liu et al. 2003) e considera o acúmulo do tecido adiposo abdominal como um todo e não necessariamente faz distinções entre os diferentes depósitos de tecido adiposo. Tal fato pode ter levado a interpretações equivocadas entre a quantidade de tecido adiposo e as alterações metabólicas relativas a cada depósito de tecido gorduroso (Tchernof & Despres 2013).

O crescimento da epidemia de obesidade veio acompanhado de importantes avanços no conhecimento da estrutura e função do tecido adiposo branco, principalmente em relação ao tecido adiposo subcutâneo e ao omento. Sabe-se atualmente que estes tecidos apresentam diferenças em relação ao tamanho do adipócito (O'Connell et al. 2010), irrigação sanguínea, resposta a estímulos lipolíticos (Hellmer & Marcus 1992; Hurtado Del Pozo et al. 2011), inflamação (Canello et al. 2006; Claria et al. 2013; Jonas et al. 2015; Wentworth et al. 2017) e até mesmo composição de matriz extracelular (Fain et al. 2004).

O depósito gorduroso pré-peritoneal tem sido negligenciado nos estudos que correlacionam a gordura abdominal com as alterações metabólicas presentes na obesidade, devido à pequena quantidade deste tecido em indivíduos com IMC normal. Sabir e colaboradores demonstraram em um estudo com mulheres antes e depois de perda de peso, que o tecido adiposo pré-peritoneal era o que mais apresentava variação de tamanho frente à dieta (Sabir et al. 2003). Outro estudo clínico sugeriu que o índice de gordura da parede abdominal, obtido pela razão entre a espessura do depósito pré-peritoneal e o tecido adiposo SC abdominal (AFI, *do inglês abdominal fat index*) fosse utilizado como indicador para diagnóstico do desenvolvimento de intolerância à glicose, uma vez que foi observado AFI alto se relacionava positivamente em pacientes com quadro de resistência à insulina e síndrome metabólica (SOYAMA et al. 2005). Suzuki e colaboradores também mostraram que existe uma correlação entre o aumento do tecido PP e gordura visceral, através da avaliação de AFI por ultrassonografia (Suzuki et al. 1993). Embora estes estudos não muito recentes tenham demonstrado a importância clínica do aumento da espessura pré-peritoneal (causado pelo aumento do depósito adiposo pré-peritoneal) muito pouco se sabe da contribuição deste tecido em relação à inflamação crônica presente no quadro de obesidade e desenvolvimento de resistência à insulina.

Assim como em humanos, o tecido adiposo branco em camundongos é dividido em dois grandes depósitos (subcutâneo e visceral) (figura 5). Os depósitos subcutâneos murinos são divididos em regiões anterior e posterior. O tecido adiposo SC anterior está localizado na região escapular, entre pescoço e a região axilar. O tecido adiposo SC posterior é chamado de tecido adiposo inguinal e propaga-se da área dorso-lombar até a região do glúteo. Os depósitos viscerais (intraperitoneais) em camundongos compreendem principalmente: tecido adiposo epididimal (perigonadal), tecido adiposo mesentérico e o tecido adiposo retroperitoneal.



<p style="text-align: center;">Tecido adiposo subcutâneo:</p> <p>I. Tecido adiposo anterior II. Tecido adiposo inguinal (SC)</p> <p style="text-align: center;">Tecido adiposo intraperitoneal:</p> <p>III. Tecido adiposo mesentérico (VC) IV. Tecido adiposo retroperitoneal (RP) VI. Tecido adiposo epididimal (EP)</p>
--

Figura 5 **Depósitos de tecido adiposo murino.** Imagem dos principais depósitos de tecido adiposo branco em camundongos: Adaptado de Tran, *Nature Reviews Endocrinology* (2010).

A utilização de modelos experimentais murinos tem sido importante no estudo do tecido adiposo e obesidade. A grande maioria dos estudos em camundongos utilizam o tecido adiposo inguinal e epididimal como referências para os tecidos adiposos abdominais subcutâneo e visceral, respectivamente. O tecido adiposo inguinal tem correlação anatômica com o tecido subcutâneo gluteofemoral em humanos. O tecido adiposo epididimal é um tecido intraperitoneal que está presente mesmo em camundongos magros, por este motivo é utilizado como representativo de tecido visceral. O depósito gorduroso mesentérico corresponde anatomicamente com o tecido mesentérico humano, em localização e função, entretanto não é comumente utilizado devido limitações cirúrgicas e mesmo quantidade de tecido em camundongos magros ou animais novos. O tecido adiposo epididimal é largamente usado como referência ao omento maior, contudo é um depósito de gordura análogo ao tecido adiposo perigonadal em humanos. Da mesma forma, é controversa a existência de um depósito de tecido adiposo semelhante ao omento em camundongos (Chusyd et al. 2016).

Assim, é necessário um estudo sistemático que leve em consideração as variações dos depósitos anatômicos de tecido adiposo branco em humanos e nos modelos experimentais murino, de forma a estabelecer quais observações tecido-específico em camundongos podem ser comparáveis a humanos.

1.2.2 O processo de adipogênese

O tecido adiposo é formado por grandes adipócitos uniloculares e pela fração estromal vascular (FSV). Esta, por sua vez, é formada por diversos tipos celulares que compreendem células tronco-mesenquimais (ASC, do inglês *adipose-derived stem cells*), pré-adipócitos,

fibroblastos, pericitos e células endoteliais de vasos sanguíneos e linfáticos, e leucócitos. Embora a fração estromal do tecido adiposo supere em número os adipócitos, as células adiposas constituem aproximadamente 90% do volume do tecido adiposo (Lee et al. 2013).

Os adipócitos são formados através de um processo de diferenciação, a partir de células tronco-mesenquimais (figura 6). As ASC derivam do mesoderma e estão comprometidas com diferentes linhagens celulares dependendo do estímulo a qual são submetidas, contribuindo para a homeostase tecidual. O recrutamento das células tronco-mesenquimais e seu comprometimento com a linhagem adipogênica ocorrem mediante demanda energética por um período prolongado. Este estado metabólico direciona as ASC ao processo de hiperplasia e a adoção do fenótipo de pré-adipócitos (Tang & Lane 2012). Assim, o processo de diferenciação adipogênica ocorre em duas etapas: diferenciação das ASC em pré-adipócitos e diferenciação dos pré-adipócitos em células adiposas maduras. Na primeira etapa do processo não se observam mudanças morfológicas importantes, entretanto a célula perde a capacidade de se diferenciar em outro tipo celular. Na segunda etapa deste processo, a célula desenvolve maquinaria necessária para síntese e transporte de lipídios, sensibilidade à insulina e entre outros (Rosen & MacDougald 2006).

O processo de adipogênese sofre controle rígido de diversos fatores transcricionais, que atuam cooperativa e sequencialmente até a fase final do processo de diferenciação. Dentro desse rígido controle destacam-se alguns fatores de transcrição: PPAR γ (do inglês *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*), os membros da família C/EBP (*CAAT/enhancer binding proteins*) e membros da família AP-1 (do inglês *activating protein 1*), essenciais para o processo de diferenciação em adipócito. Além disto, destacam-se outros fatores de transcrição que facilitam a maturação do adipócito: membros da família STAT (do inglês *signal transduction and activator of transcription*) e SREBP-1 (do inglês *sterol response element binding protein 1*). Não menos importantes são os reguladores negativos da diferenciação adipogênica: Pref-1 (*preadipocyte factor 1*) e os membros das famílias Wnt e GATA (Sarjeant e Stephens, 2012). O evento da adipogênese sofre ainda um controle endócrino e por hormônios esteroides (estrogênio, androgênio e glicocorticoides) e peptídicos (GH e IGF-1).

Os C/EBP pertencem à família de fatores de transcrição com estrutura básica de zíper de leucina, que incluem: C/EBP α , C/EBP β , C/EBP δ , C/EBP ϵ e C/EBP ξ . No entanto, apenas os fatores C/EBP α , C/EBP β e C/EBP δ parecem ter participação no processo de adipogênese. Embora não sejam exclusivos da linhagem de adipócitos, são expressos em etapas definidas durante a adipogênese e cada um possui papel regulatório definido nesse processo (Fajas et al. 1998). Os fatores de transcrição C/EBP β e C/EBP δ são os primeiros fatores ativados durante a

fase inicial da diferenciação. Estes por sua vez induzem ativação de C/EBP α . Embora a expressão de C/EBP α apareça apenas 4 a 5 dias pós-indução do processo de adipogênese, não sendo fator primordial no processo de acúmulo lipídico, sua expressão é importante nos estágios mais tardios de adipogênese, sustentando a expressão de PPAR γ e conferindo sensibilidade à insulina em adipócitos (Leff & Granneman 2010).

Os PPAR são fatores de transcrição pertencentes à super família de receptores nucleares de hormônios, possuindo os domínios estruturais clássicos dos receptores nucleares (Feige et al. 2006). Os PPAR se ligam e ativam fatores de transcrição através da formação de um heterodímero com o RXR (do inglês *retinoic x receptor*) (Brun et al. 1996). A família dos receptores PPAR é dividida em três membros: PPAR α , PPAR β/δ e PPAR γ . PPAR α é mais encontrado no coração, rins e fígado e participam da regulação do processo de β -oxidação lipídica. PPAR β/δ está amplamente distribuído em vários tecidos, embora seja mais abundante em órgãos/células associadas ao metabolismo de ácidos graxos como músculo esquelético e cardíaco, hepatócitos, adipócitos e macrófagos. Diversos estudos têm associado a ativação de PPAR β/δ com a modulação da polarização de macrófagos de tecido adiposo, promovendo um perfil mais anti-inflamatório (M2), assim como a inibição da ativação de NF- κ B através de inibição de ERK1/2 em adipócitos e desta forma aumentando a sensibilização à insulina (Luquet et al. 2005; Serrano-Marco et al. 2012; Vázquez-Carrera 2016). Estudos com camundongos com expressão silenciada de PPAR β/δ mostraram adipogênese comprometida, mostrando um papel importante na hiperplasia do tecido adiposo (Matsusue et al. 2004). PPAR γ é expresso no tecido adiposo marrom, tecido adiposo branco, cólon e leucócitos. Existem duas isoformas do receptor PPAR γ : PPAR γ -1 presente no tecido adiposo, fígado e músculo esquelético e PPAR γ -2 que está presente exclusivamente no tecido adiposo (Aprile et al. 2014).

Dentre os diversos fatores que controlam a diferenciação adipogênica, o PPAR γ destaca-se como o fator imprescindível para que este fenômeno aconteça, uma vez que nenhum fator de transcrição é capaz induzir adipogênese na ausência de PPAR γ . Tontonoz e colaboradores (1994) demonstraram, *in vitro*, a participação do PPAR γ na diferenciação de pré-adipócitos e que sua expressão ectópica em fibroblastos não adipogênicos estimulava a adipogênese na presença de ligantes de PPAR γ . O PPAR γ não é apenas crucial para a adipogênese, mas é também importantíssimo para a manutenção do estado diferenciado. A introdução de uma forma dominante negativa de PPAR γ por um adenovírus em adipócitos 3T3-L1 causa retrocesso na diferenciação, com perda do acúmulo de lipídios e diminuição da expressão de marcadores característicos de adipócitos maduros (Tamori et al. 2002). O receptor PPAR γ é ativado por ácidos graxos livres, eicosanoides e seus metabólitos em uma escala nanomolar, além de fármacos tiazolidinedionas (sensibilizadores da resposta à insulina) atuando como um sensor

do estado nutricional da célula, dando a esta proteína um papel importantíssimo no metabolismo de lipídios e carboidratos, na obesidade e diabetes (Christodoulides & Vidal-Puig 2010; Moseti et al. 2016).

SREBP são fatores de transcrição com estrutura básica dupla hélice de zíper de leucina que controlam a transcrição de genes importantes para homeostase de ácidos graxos e colesterol. Em 1993, Tontonoz e colaboradores verificaram que este fator de transcrição estava aumentado durante a adipogênese (Tontonoz et al. 1993; Leff & Granneman 2010). Durante a diferenciação adipogênica, o SREBP-1c (ADD1) induz a atividade de ácido graxo sintetase (FAS, do inglês *fatty acid synthase*), enquanto SREBP1a é importante ativador de enzimas da biossíntese de ácidos graxos e colesterol (Oberkofler et al. 2002). Embora esses fatores de transcrição também regulem a expressão de adiponectina, importante adipocina secretada por adipócitos, estes fatores não são essenciais para o processo adipogênico, uma vez que estudos mostraram que camundongos que não possuem esta proteína não apresentaram alteração na adipogênese.

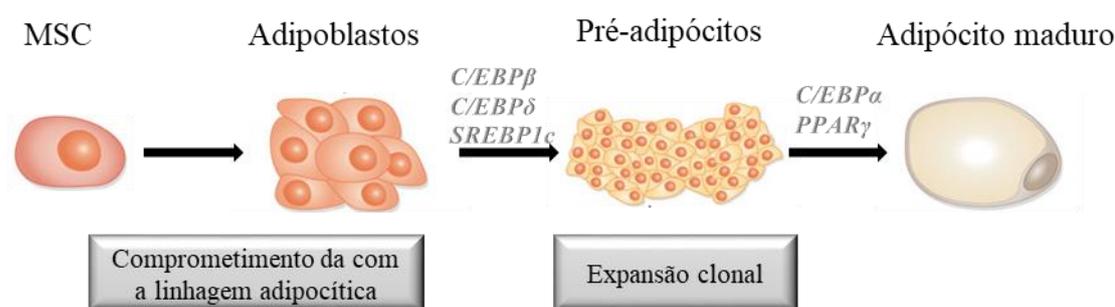


Figura 6 **Adipogênese.** A adipogênese consiste no processo de diferenciação da célula tronco-mesenquimal em adipócito. C/EBPβ e C/EBPδ participam da fase inicial da adipogênese, induzindo expansão clonal de pré-adipócitos. C/EBPα e PPARγ atuam na etapa mais tardia do processo adipogênico, regulando a maturação e manutenção do adipócito maduro. Modificado de Ricoult & Manning, *EMBO reports* (2013).

1.3 O tecido adiposo, lipólise e lipotoxicidade

O tecido adiposo apresenta uma importante função na regulação do metabolismo em resposta ao estado nutricional do organismo. Em resposta ao aumento da demanda energética e a estímulos hormonais, este tecido serve como fonte de ácidos graxos, liberados por lipólise, para outros tecidos. Quando há um aumento de aporte de nutrientes e/ou diminuição da demanda energética o adipócito responde a estes estímulos levando ao maior acúmulo de ácidos graxos. Os ácidos graxos são armazenados em forma de triacilglicerol dentro da gota lipídica (GL), ocupando mais de 90% do volume do adipócito maduro. Esta organela dinâmica está envolvida na síntese, transporte e degradação de lipídios. A gota lipídica é formada por uma

monocamada de fosfolípidios e proteínas associadas e com interior contendo uma gama de lipídios neutros (Brasaemle et al. 2004). As proteínas de GL compreendem perilipina (PLIN1), ADRP, Tip47 e OXPAT e podem ser encontradas entre o citosol e a membrana da gota lipídica ou expressas constitutivamente na monocamada lipídica desta organela (perilipina e ADRP) (Brasaemle 2007). O processo de lipogênese e lipólise no tecido adiposo é altamente dinâmico, controlado e extremamente importante para a manutenção da homeostasia energética (Rutkowski et al. 2015). A lipólise do tecido adiposo é um fenômeno multifacetado que envolve diversas lipases em conjunto com proteínas de gota (especialmente perilipina), em um processo intricado mediado pela ativação da proteína cinase A (PKA) (Birnbaum 2003; Leff & Granneman 2010).

A mobilização de ácidos graxos livres no processo de lipólise se inicia pela ativação de lipases responsáveis pela hidrólise de triacilglicerol presente na gota lipídica. As principais lipases envolvidas neste processo são a ATGL (do inglês *adipocyte trygliceride lipase*) e HSL (do inglês *hormone sensitive lipase*) (Lass et al. 2011). Conforme mostrado na figura 7, a partir de estímulos lipolíticos (adrenérgicos, citocinas) ocorre aumento de AMP cíclico, que leva à ativação de PKA. Esta enzima por sua vez, ativa a lipase HSL e perilipina através de fosforilação, permitindo o acesso da lipase aos lipídios dentro da gota lipídica. Embora a ATGL não seja diretamente ativada por PKA, sua atividade é limitada pela ação desta enzima. CGI-58 (do inglês *Comparative gene identification-58*) atua como um cofator para ATGL. Quando a célula está em estado basal, CGI-58 e perilipina estão associados à membrana da gota lipídica. Quando ocorre estímulo lipolítico, PKA fosforila perilipina levando a dissociação de perilipina e CGI-58, liberando este fator para se ligar à ATGL e aumentar a atividade desta lipase (Ducharme & Bickel 2008; Zechner et al. 2009; Takahashi et al. 2016; Lapid & Graff 2017) .

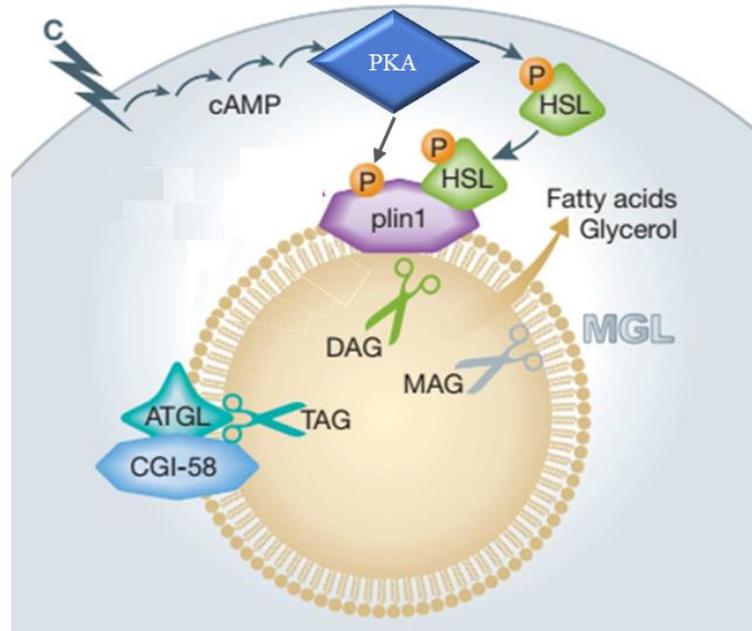


Figura 7 **Regulação do processo de lipólise.** Ilustração simplificada dos mecanismos moleculares da lipólise em adipócitos. Modificado de *Greenberg et al., EMBO Journal (2011)*. Após estímulo, a proteína cinase A (PKA) promove fosforilação de perilipina, liberando a proteína CGI-58 (do inglês *Comparative gene identification-58*). Esta associa-se e ativa ATGL, levando a hidrólise de TAG (triacilglicerol) em DAG (diacilglicerol). PKA também fosforila a proteína HSL (lipase sensível à hormônio), levando à sua translocação e ligação à perilipina fosforilada e à hidrólise do DAG. MGL hidrolisa e libera o ácido gordo restante e glicerol.

Outra proteína importante para a lipólise em adipócitos é a proteína FABP4 (do inglês *fatty acid binding protein 4*), proteína responsável por fazer o transporte de ácidos graxos no interior da célula. FABP4 interage com HSL durante processo de lipólise. HSL é inibida pelo produto final de sua atividade, ácidos graxos livres (FFAs). Assim, ao se ligar ao FFA, FABP4 anula o inibidor de HSL e catalisa a atividade desta lipase (Shen et al. 2001; Bernlohr 2016).

O adipócito é uma célula plástica, sendo capaz de aumentar e diminuir de tamanho de acordo com mudanças na necessidade metabólica. Ainda, Planat-Bérnard e colaboradores demonstraram que adipócitos maduros humanos são capazes de se desdiferenciar, adotando fenótipo de célula imatura seguido novamente por diferenciação adipogênica (Planat-Benard 2004) O aumento do tecido adiposo em resposta ao fornecimento excessivo de nutrientes resulta de dois processos: hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos. Os fatores que regulam o balanço entre hipertrofia e a hiperplasia não são completamente elucidados, mas é sugerido que insulina e glicocorticoides circulantes estimulam a diferenciação do pré-adipócito (Klemm et al. 2001; Gavin et al. 2015; Rutkowski et al. 2015).

Ao contrário do que se acreditava o tecido adiposo não cresce ilimitadamente. Virtue e colaboradores sugeriram que a associação de mecanismos genéticos, como a participação do PPAR γ na hiperplasia do tecido adiposo (diferenciação de células precursoras de adipócitos); a

limitação mecânica através da matriz extracelular (MEC) - a hipertrofia do adipócito induz o aumento da pressão da MEC sobre o mesmo, elevando a produção de adipocinas e à ruptura celular; e fatores inibidores de angiogênese seriam capazes de limitar a capacidade de expansão do tecido adiposo, impedindo que o mesmo seja suficientemente competente para o armazenamento do excesso de nutrientes e, por conseguinte, ocorre aumento do nível de lipídios circulantes (Virtue & Vidal-Puig 2010). Além disso, o volume do adipócito está associado com sua função, de modo que adipócitos maiores geralmente exibem maior atividade metabólica (lipólise) e alteração do perfil secretório, aumentando a produção de citocinas pró-inflamatórias (como leptina e TNF- α) e reduzindo, em contrapartida, a secreção de adiponectina, cuja ação é anti-inflamatória (Couillard et al. 2000; Guilherme et al. 2008)

A limitação da expansibilidade do tecido adiposo em conjunto com disfunção de adipócitos com exacerbada secreção de citocinas e lipólise e conseqüentemente aumento do efluxo de ácidos graxos do tecido adiposo leva ao acúmulo de lipídios em outros órgãos não especializados como fígado, músculo esquelético, e pâncreas. Este processo culmina na disfunção e fibrose destes órgãos e caracteriza o quadro de lipotoxicidade (Virtue & Vidal-Puig 2010; Engin & Engin 2017).

Baseado no conceito de lipotoxicidade, o tecido adiposo serviria como uma espécie de tecido – tampão, protegendo os outros órgãos dos efeitos tóxicos do excesso de lipídios oriundos da dieta. Diversos estudos demonstraram que o tecido adiposo subcutâneo apresenta maior capacidade hiperplásica quando comparado ao omento, no qual o processo principal de expansão é por hipertrofia dos adipócitos. Adipócitos oriundos do tecido omental também apresentam menor volume do que quando comparados ao tecido subcutâneo, porém apenas a hipertrofia do omento foi relacionada ao desenvolvimento de doença metabólica (O’Connell et al. 2010; Veilleux et al. 2011). Além disso, Hellmér e colaboradores demonstraram que o tecido subcutâneo em pacientes obesos é menos lipolítico quando comparado ao tecido omental (Hellmer & Marcus 1992). Somando essas características, o tecido adiposo subcutâneo em humanos adquire um papel protetor contra lipotoxicidade e deposição ectópica de gordura (Porter et al. 2009).

1.4 Adipocinas, inflamação e obesidade

A visão tradicional do tecido adiposo como um reservatório passivo para a reserva de energia já não é mais aceita. De fato, o conceito de que células não endócrinas poderiam secretar moléculas capazes de regular a homeostase de maneira autócrina, parácrina e endócrina foi proposto por Claude Bernard há mais de 100 anos (Kvetnoy et al. 2000). Este conceito foi

renovado em um trabalho publicado por Kennedy, o qual propôs que o tecido adiposo era capaz de atuar na regulação da homeostase energética via hipotálamo, através de algum fator circulante (Kennedy 1953). Entretanto foi apenas com a descoberta da síntese e secreção da leptina que o tecido adiposo passou a ser considerado um órgão endócrino. A leptina é um polipeptídeo de 16 kDa, que tem participação chave no controle do estado nutricional do organismo, atuando no sistema nervoso central, inibindo a ingestão e aumentando o gasto energético (Friedman & Halaas 1998). A inibição da ingestão ocorre quando este hormônio se liga ao seu receptor ObRb em neurônios hipotalâmicos: a ativação de neurônios anorexigênicos aumenta a expressão de peptídeos anorexigênicos, como α -MSH, CRH, CART, que levam à sensação de saciedade, enquanto que sua ligação a ObRb em neurônios orexigênicos inibe-os, diminuindo a expressão gênica de peptídeos orexigênicos como o neuropeptídeo Y (NPY). Em conjunto, esta mudança no balanço de peptídeos resulta na inibição do apetite (Friedman & Halaas 1998). A leptina também é capaz de ativar o sistema nervoso simpático, aumentando a taxa metabólica de repouso e promovendo o gasto energético (Dobbins et al. 2003). Além do seu papel no controle central da ingestão, a leptina apresenta diversas outras funções periféricas na regulação da reprodução, hematopoese, angiogênese, osteogênese e inflamação (Paz-Filho et al. 2012). Assim, devido às suas ações pleiotrópicas, assim como a sua semelhança estrutural com família de citocinas de quatro cadeias longas dupla-hélice, como a interleucina 6, a leptina também é considerada uma citocina.

A leptina é secretada por adipócitos maduros, assim sendo, os níveis circulantes deste hormônio são proporcionais à massa de tecido adiposo branco. Com o desenvolvimento de obesidade, estabelece-se também o quadro de hiperleptinemia que é revertida a partir da perda de peso. A ação da leptina é mediada por seu receptor ObR, que pertence à família dos receptores transmembrana de citocina tipo I e possui atualmente seis isoformas, resultantes de processamento alternativo de mRNA (*splicing*). As isoformas ObRa, ObRc, ObRd e ObRf não apresentam atividade conhecida de transdução de sinal (Löllmann et al. 1997; Paz-Filho et al. 2012). O receptor ObRe é uma isoforma solúvel do receptor de leptina, pois não apresenta as porções transmembrana e intracelular. Estudos sugerem que este receptor teria a função de facilitar a biodisponibilidade de leptina (Schaab & Kratzsch 2015). A isoforma ObRb é única isoforma com domínio intracelular completo e capaz de iniciar o sinal através da ativação de JAK2/STAT3 e PI3K/AKT/mTOR (Tartaglia 1997; Maya-Monteiro et al. 2008; Cota et al. 2009).

O aumento de leptina em consequência da expansão exacerbada do tecido adiposo, leva ao quadro de hiperleptinemia associada a um quadro de resistência central à leptina,

característico da obesidade mórbida (Myers MG Jr, Leibel RL, Seeley RJ 2010). Este quadro de resistência central é devido às alterações inflamatórias hipotalâmicas que levam a uma menor resposta de saciedade apesar da hiperleptinemia. No entanto a leptina mantém, mesmo na obesidade, sua capacidade de modular a resposta imune inata e adaptativa sendo assim um importante fator que contribui para as alterações metabólicas presentes na obesidade (Iikuni et al. 2008; Abella et al. 2017; Pérez-Pérez et al. 2017).

A consolidação do tecido adiposo como um órgão endócrino se deu a partir da descoberta de que este tecido é capaz de sintetizar e secretar não só a leptina como diversas citocinas, quimiocinas e hormônios, denominados conjuntamente de adipocinas. Além da leptina outra adipocina muito estudada é a adiponectina, que foi descrita pela primeira vez por Scherer e colaboradores em 1995 (Scherer et al. 1995). A adiponectina é um hormônio de 30 kDa, expressa exclusivamente e em grande quantidade por adipócitos. Esta proteína apresenta semelhança estrutural com o componente C1q do sistema complemento e conformação globular semelhante ao TNF- α (Kershaw & Flier 2004). A adiponectina é secretada em diversos complexos de alto, médio e baixo peso molecular e exerce suas funções através dos receptores AdipoR1 (expressos em músculo esquelético) e AdipoR2 (expresso no fígado) (Yamauchi & Kadowaki 2008) De maneira contrária à leptina, os níveis reduzidos de adiponectina estão correlacionados com o quadro de obesidade e comorbidades (Scherer 2006). A principal função estudada deste hormônio é a potenciação da sensibilidade à insulina no músculo esquelético e fígado (Scherer 2006). Desta forma, diversos estudos já mostraram que baixos níveis de adiponectina em pacientes obesos estão diretamente relacionados ao desenvolvimento de resistência à insulina e síndrome metabólica (Lihn et al. 2005).

A função endócrina do tecido adiposo branco envolve a secreção de uma variedade de moléculas além da leptina e adiponectina. A variedade de adipocinas secretadas pelo tecido adiposo inclui resistina, visfatina (Al-Suhaimi & Shehzad 2013), omentina (Tan et al. 2010), irisina (Timmons et al. 2012), assim como diversas citocinas pró-inflamatórias clássicas: TNF- α , IL-1 β , IL-1Ra, IL-6, IL-8, IL-10, MCP-1/CCL2, PAI-1 ou anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- β , entre outras. Durante o desenvolvimento do quadro de obesidade, hipertrofia dos adipócitos e consequente disfunção tecidual, ocorre aumento da secreção de citocinas de caráter mais pró-inflamatório (por exemplo TNF- α , IL-6, MCP-1/CCL2) levando a um aumento do infiltrado de leucocitário neste tecido e estabelecendo um quadro de moderada inflamação crônica (Klötting & Blüher 2014; Lafontan 2014).

Como já descrito anteriormente, o tecido adiposo é um órgão complexo formado por uma fração de adipócitos e a fração estromal vascular. Esta última é formada por uma variedade de

células como células endoteliais, fibroblastos, pré-adipócitos, células tronco-mesenquimais e leucócitos. No conjunto de leucócitos presentes no tecido adiposo, encontram-se: células pró-inflamatórias (macrófagos M1, neutrófilos, linfócitos T CD8+, mastócitos) que aumentam conforme agravamento da obesidade e células anti-inflamatórias (macrófagos M2, eosinófilos, células T reguladoras) que diminuem proporcionalmente ao acúmulo de tecido adiposo (Rosen & Spiegelman 2014b).

A expansão do tecido adiposo na obesidade pode estar acompanhada por disfunção e morte de adipócitos maduros, liberando grande conteúdo de lipídio. Esse processo culmina ativação e recrutamento de macrófagos, formando estruturas em formato de coroa, chamadas “crown-like structures” (Zeyda & Stulnig 2007; Zeyda et al. 2007). O recrutamento de macrófagos ocorre também pelo aumento da secreção da quimiocina MCP-1/CCL2, por adipócitos maduros e por células da fração estromal. O aumento local e sérico dos níveis de MCP-1/CCL2 na obesidade estão associados ao desenvolvimento de resistência à insulina e está positivamente relacionado com o risco de doenças cardiovasculares (Kamei et al. 2006; Kanda et al. 2006).

A descoberta do estado inflamatório crônico presente na obesidade em consequência da disfunção tecidual e infiltração leucocitária trouxe novas perspectivas para a abordagem clínica e tratamento dos indivíduos com obesidade. Embora muitos estudos tenham sido feitos na avaliação das principais mudanças metabólicas que ocorrem no tecido adiposo no quadro de obesidade, há ainda muito a se descobrir em relação à contribuição tecido-específica dos diversos depósitos de tecido adiposo para o quadro inflamatório do grande obeso. Assim esse trabalho propõe a hipótese que diferentes depósitos de tecido adiposo contribuem de maneira distinta para o quadro de inflamação crônica moderada presente na obesidade.

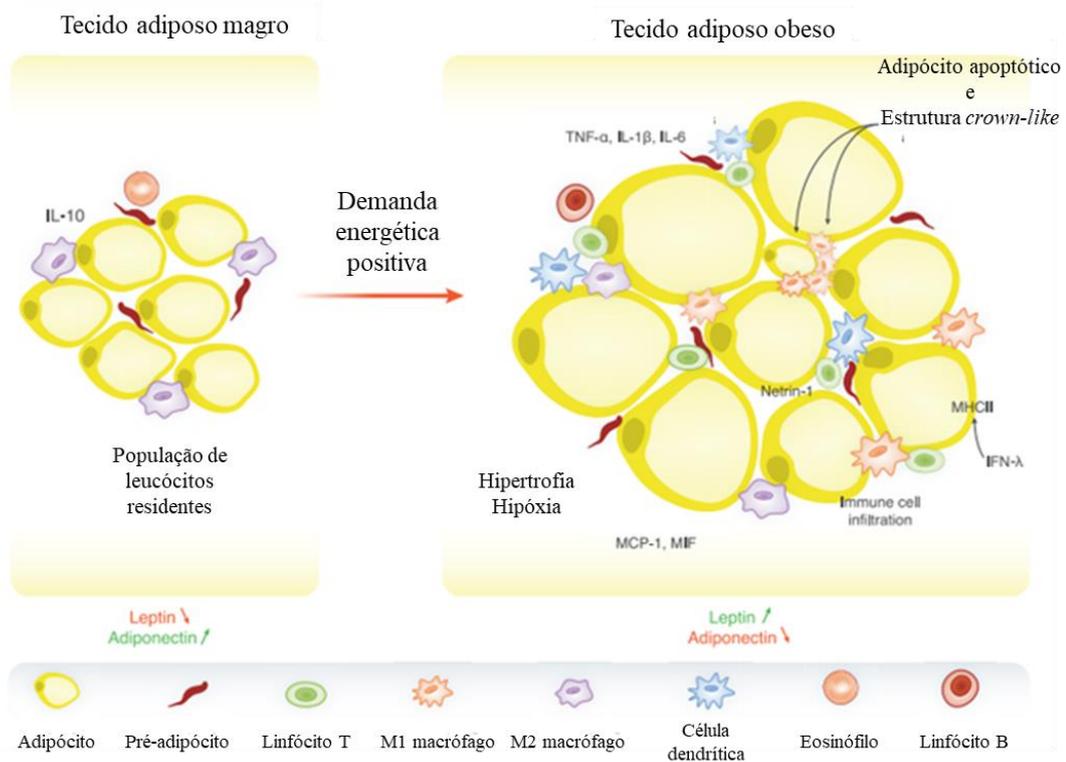


Figura 8 **Inflamação do tecido adiposo.** Tecido adiposo magro com número reduzido de células imunes residentes. Expansão tecidual em decorrente de contínua demanda energética positiva, levando à quadro de hipóxia, aumento da secreção de citocinas e aumento do infiltrado leucocitário com predomínio de células de caráter pró-inflamatório. Adaptado de *Vieira-Potter, Cell. Microbiol.*(2014)

1.5 Justificativa

Em decorrência do crescimento da prevalência da obesidade mórbida surge a necessidade de um maior conhecimento a respeito dos mecanismos fisiopatológicos associados a esta doença.

O desenvolvimento da obesidade requer um remodelamento tecidual que inclui eventos de hiperplasia, hipertrofia, inflamação, angiogênese e remodelamento da MEC, dependente da participação de diversos tipos celulares. Diversos estudos vêm retratando a comparação da contribuição para o quadro inflamatório do tecido adiposo subcutâneo e omento em indivíduos obesos. Entretanto, diante de um quadro de obesidade mórbida, ocorre expansão de outros depósitos de tecido adiposo que também contribuem para o volume abdominal, dentre eles está o tecido adiposo pré-peritoneal, ainda pouco estudado.

A utilização de modelos experimentais de obesidade, seja por modificação genética ou por obesidade induzida por dieta, tem sido bastante útil na compreensão dos mecanismos envolvidos e alterações moleculares presentes no quadro de obesidade. Contudo, ainda não há um estudo sistemático que compare a relação existente entre cada depósito de tecido adiposo destes animais e os depósitos de tecido adiposo humano.

Acreditamos que os diferentes depósitos de tecido adiposo branco contribuem de maneira distinta para o quadro de inflamação crônica presente na obesidade. Assim, este trabalho propõe-se a atender à necessidade de um estudo mais aprofundado avaliando o metabolismo lipídico e o perfil de adipocinas que participam deste processo inflamatório além da contribuição de cada depósito de tecido adiposo neste quadro de inflamação crônica presente no grande obeso.

2 OBJETIVOS

2.1 **Objetivo geral**

Comparar os diferentes depósitos de tecido adiposo branco e entender a participação destes no quadro inflamatório associado à obesidade.

2.2 **Objetivos específicos**

- ✓ Avaliar a contribuição de cada depósito de tecido adiposo em relação aos mediadores inflamatórios, em modelo experimental e em humanos;
- ✓ Caracterização do depósito de tecido adiposo pré-peritoneal;
- ✓ Avaliar processo de disfunção do tecido adiposo no quadro de obesidade, com foco no metabolismo lipídico;
- ✓ Correlacionar as características e alterações moleculares entre os tecidos adiposos e interespécies.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Voluntários

Participaram deste estudo pacientes obesos integrantes do Programa de Atendimento Multidisciplinar ao Obeso Mórbido, do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF), da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ e pacientes acompanhados pelo Serviço de Endocrinologia do Hospital dos Servidores do Estado do Rio de Janeiro (HSE-RJ), candidatos à cirurgia de gastroplastia. Utilizou-se como critério de inclusão neste estudo, indivíduos com IMC acima de 35, portadores ou não de hipertensão arterial sistêmica, diabetes *mellitus* tipo II e/ou dislipidemia e que não possuíam quaisquer outras moléstias não associadas à condição de obesidade mórbida.

Como controle deste estudo participaram indivíduos hígidos com IMC normal (≤ 20 e $\geq 24,9$) cadastrados no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho – UFRJ.

Todos os procedimentos experimentais executados neste projeto seguiram as recomendações pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob o número 022/11 e pelo Comitê de Ética do Hospital dos Servidores do Estado do Rio de Janeiro, sob o número 000.528.

3.2 Coleta de amostras de sangue e tecido adiposo humano

Cerca de 10 mililitros de sangue de indivíduos obesos foram recolhidos durante o momento cirúrgico, com os pacientes em jejum. A coleta de sangue de indivíduos controle (~10ml de sangue) foi feita em consultório médico, com os voluntários em jejum. O sangue coletado foi transferido para tubos de coleta específicos para separação de plasma e soro – Tubo *BD Vacutainer Buffer Na Citrate®*, catálogo 369714 (contendo solução-tampão de citrato de sódio 3,2%) e Tubo *BD Vacutainer SST® II Advance®*, catálogo 367955 (revestido de sílica por pulverização e contendo gel de polímero para separação de soro), respectivamente. Após coleta, as amostras de sangue foram mantidas em gelo até processamento.

Para obtenção de plasma e soro, o sangue foi centrifugado a 3000rpm, durante 15 minutos, em centrífuga clínica. As amostras de plasma/soro foram divididas em alíquotas de 500 µl em criotubo e armazenadas em nitrogênio líquido até análise.

Amostras de tecido adiposo branco: subcutâneo (SC), pré-peritoneal (PP), visceral (omento, VC) foram coletadas durante cirurgia de gastroplastia do Serviço de Cirurgia Geral do Hospital dos Servidores do Estado do Rio de Janeiro (HSE-RJ) e do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF-UFRJ). Após coleta, as amostras de tecido adiposo branco (WAT) foram submetidas a um rápido processo de dissecação para remoção do excesso de tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e partes de tecido danificadas pelo bisturi elétrico. As

amostras de tecido adiposo foram processadas de acordo com protocolo experimental a ser seguido: 1) Para análises de *Western blot* e ensaio imunoenzimático (ELISA), fragmentos de WAT de aproximadamente 100-200 mg foram congelados em nitrogênio líquido, onde ficaram armazenados até o momento do experimento. 2) Para avaliação dos adipócitos maduros e fração estromal vascular (FSV), as amostras de WAT foram processadas de acordo com protocolo de isolamento, descrito na seção 3.10. 3) Para análise histológica foram separados fragmentos de WAT de aproximadamente 30 mg, seguido por fixação em 30 ml de solução de formaldeído 10% em tampão fosfato (PBS) e posterior processo de impregnação em parafina, descrito detalhadamente adiante neste documento (seção 3.8).

3.3 Animais

Foram utilizados camundongos adultos machos das linhagens C57BL/6J, com peso entre 15 e 20g, fornecidos pelo biotério central da Fundação Oswaldo Cruz. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas (máximo de 5 camundongos por gaiola), com livre acesso à água e ração, em sala com controle de temperatura (25 - 28°C), com ciclos de 12 h luz/escuro no biotério do Pavilhão Hélio e Peggy Pereira (HPP), Fiocruz-RJ.

Os animais foram vermifugados com uso tópico de ivermectina (Ivomec®) e uso oral de 200 µl/animal de suspensão de pamoato de prantel, pamoato de oxantel e praziquantel (Ptzi Plus®) e o início dos experimentos se deu após uma semana da vermifugação.

Todos os procedimentos utilizados foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Fiocruz sob o Protocolo LW 36/10 e L011.2015

3.4 Coleta de sangue e tecido adiposo de modelo experimental de obesidade induzida por dieta

Camundongos C57BL/6J (machos) de aproximadamente 15-25g foram separados em dois grupos: 1- ND (do inglês *normal diet*), camundongos que foram submetidos à dieta com conteúdo normal de lipídios e açúcar (3850 cal/g, sendo 9% de gordura e 8% de sacarose.) e 2- HFD (do inglês *high-fat diet*), camundongos que foram submetidos à dieta rica em lipídios (4728 cal/g, sendo 45% de gordura e 17% de sacarose). O experimento foi conduzido durante 15 a 17 semanas, com troca de ração semanal e pesagem dos animais a cada 15 dias.

Camundongos C57BL/6J submetidos à dieta foram eutanasiados em câmara de gás carbônico. Amostras de sangue foram coletadas por meio de punção cardíaca, imediatamente

após eutanásia dos animais. Para coleta, foi utilizado agulha de 26G em seringa de 1ml contendo 100 µl de citrato de sódio, equivalente à 10% do volume total de sangue. O sangue foi transferido para tubo de polipropileno de 1,5 ml, seguido de centrifugação à 1500 g/10min/4°C. As amostras de plasma foram armazenadas à -80 °C.

Em seguida, amostras de diferentes depósitos de tecido adiposo branco (subcutâneo - SC, epididimal - EP, mesentérico - VC e retroperitoneal - RP) foram removidas e então processadas de acordo com protocolo experimental a ser seguido: 1) Para análises de *Western blot* e ensaio imunoenzimático (ELISA), os fragmentos de WAT foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80°C. 2) Para avaliação dos adipócitos maduros e fração estromal vascular (FSV), as amostras de WAT foram processadas de acordo com protocolo de isolamento, descrito na seção 3.10. 3) Para análise histológica foram separados fragmentos de WAT de aproximadamente 30mg, seguido por fixação em 30ml de solução de formaldeído 3,7% em tampão fosfato (PBS) e posterior processo de impregnação em parafina, descrito detalhadamente adiante neste documento (seção 3.8).

Tabela 3 **Formulação das rações.**

	Fórmula	ND		HFD	
		g	kcal	G	kcal
Carboidrato	Amido de milho	510,7	2043	84,9	339,6
	Amido dextrinizado	130	520	116,5	466
Gordura	Sacarose/sucrose	80	320	201,4	805,6
	Óleo de soja	40	360	29,1	261,9
	Ácido graxo de soja	0	0	0	0
Proteína	Banha	0	0	206,8	1861
	Caseína	140	560	233,1	932,4
	L-cistina	1,8	7,2	3,5	14
Outros componentes	Celulose	50	0	58,3	0
	Bitartarato de colina	2,5	0	2,3	0
	BHT	0,014	0	0	0
	Mix mineral	35	0	11,7	0
	Mix vitamínico	10	40	11,7	46,8
	Fosfato de cálcio dibásico	0	0	15,1	0
	Carbonato de cálcio	0	0	6,4	0
	Citrato de potássio	0	0	19,2	0
	Total	1000	3850	1000	4728

Tabela 6 Teor nutricional das rações.

Teor nutricional (%)	ND		HFD	
	g	kcal	g	kcal
Carboidratos totais	72	75	40	34
Dos quais, sacarose	8	8	20	17
Gordura	4	9	24	45
Proteína	14	15	24	20
Outros componentes	10	1	12	1
Total	100	100	100	100

3.5 Western Blot

Amostra de 50-100mg de tecido adiposo foram colocados em tubo de polipropileno de 2 ml, macerados com homogeneizador de tecidos em tampão de lise RIPA (150mM de cloreto de sódio, 1% de Triton X-100, 0,1% SDS, 0,5% de deoxicolato de sódio, 50mM Tris, pH 8,0) (v/v) contendo inibidores de protease e fosfatase e em seguida, as amostras foram centrifugadas à 16000 g/40minutos/4°C. O lisado proteico foi transferido para novo tubo de polipropileno de 0,5 ml, descartando-se a fração lipídica e o *pellet* contendo restos celulares. A quantificação de proteínas do lisado foi realizada segundo o método de Lowry (LOWRY et al. 1951). A leitura da reação foi feita à 660 nm.

Ao lisado proteico (30µg) foi adicionado tampão Laemmli, seguido de aquecimento à 100°C por 5 minutos. As amostras e o padrão de peso molecular (Rainbow TM , catálogo RPN800E, Amersham ou SDS-6H, Sigma Aldrich) foram então aplicados em gel SDS-PAGE (10% ou 15% de bis/acrilamida, conforme a proteína a ser observada) e realizada eletroforese por 90 minutos em tampão de corrida³. Após separação, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose com poro de 0,45µm (Amersham), em sistema molhado por 2 horas/sistema ou semi-seco por 1h, em tampão de transferência⁴. O controle de transferência de proteínas foi feito através de coloração com solução vermelho de Ponceau (Ponceau S 0,1% em ácido acético 5%, (p/v)).

Após 60 minutos de bloqueio (Tris-HCl 10 mM, NaCl 0,15 M, 0,1% Tween® 20 e 5% de leite em pó desnatado), as membranas foram incubadas com anticorpos primário para as seguintes proteínas: perilipina: ADRP, TNF- α , ATGL, HSL, CD14, SREBP-1, PPAR- γ , iNOS, Arginase-1, β -actina, seguido por etapa de lavagem com solução TBST 0,1% (Tris-HCl 10 mM, NaCl 0,15 M, 0,1% Tween®). Em seguida, as membranas foram incubadas com respectivos anticorpos secundários conjugados à peroxidase/fluóforos à temperatura ambiente.

Após nova etapa de lavagem, a formação do complexo antígeno-anticorpo foi revelada por reação de quimiluminescência, utilizando o kit SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate® (Thermo Scientific) e exposição de filme de raio-X Amersham Hyperfilm ECL (24 × 30 cm) (GE Healthcare) por intervalos variados ou por leitura de fluorescência no aparelho *Odyssey Imaging System*, conforme instruções do fabricante.

Tabela 8 Lista de anticorpos

Proteína alvo	Fabricante	Diluição
Perilipina	Cell Signaling (9349S)	1:1000
ADRP	Santa Cruz (32888)	1:1000
PPARγ	Santa Cruz (7196)	1:1000
ATGL	Santa Cruz (365278)	1:500
HSL	Cell Signaling (4107)	1:1000
CD-14	Santa Cruz (9150)	1:1000
Arginase 1	Santa Cruz (271430)	1:1000
β-actina	Sigma Aldrich (5441)	1:10.000
TNF-α	Peprtech (500-P64)	1:500

3.6 Dosagem de adipocinas

3.6.1 Ensaio multiplex

Para detecção das adipocinas foram utilizados kits específicos (MILLIPLEX MAP Human Adipocyte Magnetic Bead Panel, catálogo HADCYMAG-61K, Millipore e BioPlex Pro®, Human Cytokine Standard 27-Plex) seguindo protocolo do fabricante. A placa de 96 poços foi preparada adicionando-se 200 μ l/poço de tampão de ensaio durante 10 minutos. Em cada poço foi adicionado 25 μ l da curva padrão e das amostras (em duplicata), e então foi adicionado o mix de microesferas conjugadas com os anticorpos monoclonais contra as citocinas em questão. A placa ficou sob agitação por 16 horas a 4°C. Em seguida, os poços foram lavados com tampão de lavagem, e 50 μ l do anticorpo de detecção biotilado foram adicionados. Após nova incubação por 60 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, foi feita adição de 50 μ l de estreptavidina conjugada ao fluoróforo. Novamente, a placa permaneceu ao abrigo da luz por 30 minutos à temperatura ambiente, antes dos poços serem lavados.

Foram adicionados 100 µl de tampão *Sheath Fluid* em cada poço e a placa ficou sob agitação por 5 minutos para manter as microesferas em suspensão. Em seguida, as amostras foram analisadas por citômetro dotado de dois feixes de lasers. As intensidades de fluorescência das amostras foram comparadas com a respectiva curva padrão e analisadas no sistema *Luminex 200™ System*, conforme instruções do fabricante.

3.6.2 ELISA

A dosagem de citocinas/adipocinas também foi mensurada por meio do ensaio de ELISA convencional (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) segundo informações do kit (RD System, catálogo DY279, DY398, DY406, DY498, DY417, DY1679). Placas de 96 poços de fundo plano (catálogo 675061, Greiner Bio-One Brasil) foram cobertas com anticorpo de captura por poço e incubadas por aproximadamente 16 h à 4°C. Após este período, as placas foram lavadas com solução de lavagem (PBS/Tween 20 0,05%) e incubadas durante 1 h, com a solução de bloqueio (PBS/BSA 1%) à temperatura ambiente.

A curva padrão foi diluída em solução diluente, conforme instruções do fabricante. A curva padrão e as amostras foram aplicadas nas placas (50 µl /poço), e incubadas por aproximadamente 16 h a 4°C. Após a lavagem das placas com solução de lavagem específica, o anticorpo de detecção foi adicionado por poço, também diluído em solução diluente. Após 1 h de incubação à temperatura ambiente, adicionou-se estreptavidina-peroxidase (diluição 1:200, RD). Após 30 minutos à temperatura ambiente, as placas foram lavadas com solução de lavagem e, em seguida, foi adicionada solução de TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina). A reação foi interrompida com solução de ácido sulfúrico (Próquimios) 2N (25 µl /poço) e a leitura feita no comprimento de onda de 450 nm em espectrofotômetro (*Spectra Max*).

3.7 PCR em tempo real

Fragmentos de tecido adiposo humano e murino (50 a 100mg) foram macerados com homogeneizador de tecido em 1 ml de Trizol® (catálogo15596018, ThermoFischer), seguidos de centrifugação à 12000 g x 10 min x 4°C e o sobrenadante foi transferido para novo tubo de polipropileno de 1,5 ml. Após adição de 0,2 ml de clorofórmio, as amostras foram centrifugadas à 12000 g x 15 min x 4°C e a fração aquosa transferida para novo tubo de polipropileno de 1,5 ml. Após adição de 0,5 ml de isopropanol, as amostras foram armazenadas à -80°C/16h para precipitação de RNA. Em seguida, as amostras foram centrifugadas à 12000 g x 20 min x 4°C e o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se 0,5 ml de etanol 75%, seguido de centrifugação à 10.000 g x 10 min x 4°C (este processo foi realizado três vezes). O *pellet* de RNA foi deixado à temperatura ambiente até evaporação total do etanol e depois ressuspensionado em 10 µl de água

DEPC. A quantificação do RNA total foi feita em espectrofotômetro *NanoDrop 2000*®, utilizando as razões A260/A280 e A260/A230 como critério de análise de qualidade da amostra.

Com intuito de eliminar contaminação de DNA genômico, as amostras foram tratadas com DNase, por meio do kit TURBO™ DNase (catálogo: AM2238, Ambion) de acordo com instruções do fabricante.

A síntese de DNA complementar foi feita a partir de 1 µg de RNA, com o kit *SuperScript III First-Strand Synthesis for RT-PCR* (Applied Biosystem) ou o kit *SuperScript II First-Strand Synthesis for RT-PCR* (Applied Biosystem), também de acordo com instruções do fabricante.

A análise da expressão gênica de amostras de tecido adiposo humano e murino foi realizada através da técnica de PCR em tempo real quantitativo (qPCR).

Como controle normalizador da reação foi utilizado o gene constitutivo β -actina. Foram utilizadas para estas reações sondas TaqMan® (Applied Biosystems) e o termociclador *Step One Plus Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). As reações foram feitas em duplicata para cada gene, utilizando 1 μ l de cada um dos diferentes cDNA, 0,5 μ l da sonda e 5 μ l de tampão universal *PCR Mastermix TaqMan®*, gerando um volume final de 10 μ l. As condições da reação foram: 60°C por 2 minutos, seguido de 95°C por 10 minutos e 40 ciclos: 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

A análise dos dados foi feita por meio do cálculo $2^{\Delta Ct}$, onde ΔCt é a diferença entre as médias das duplicatas de cada gene alvo e a média das duplicatas do controle endógeno (Livak e Schmittgen, 2001).

Abaixo estão listadas as sondas utilizadas:

ADIPOQ	Hs00605917_m1
FABP4	Hs01086177_m1
LEPR	Hs00174497_m1
PLIN1	Hs00160173_m1
PLIN2	Hs00605340_m1

3.8 Fotos macroscópicas e histologia

As imagens foram registradas em sala de cirurgia, com o auxílio de uma câmera digital com zoom. Utilizamos uma régua comum de 30cm como referência na imagem.

Para observação histológica os fragmentos de tecido adiposo foram fixados em solução de formaldeído 10% em PBS por 24h, seguidos por etapa de desidratação (Etanol 80% - 1h; Etanol 95% - 2h (3x); Etanol 100% - 18h; Etanol 100% - 30 min (3x); xilol I – 1h, xilol II – 1h) e impregnação de parafina (parafina 60°C – 30 min (6x)). As amostras foram inseridas em cassete, deixando cerca de 2 mm de parafina nas margens do bloco. O molde foi preenchido com parafina à 60°C e colocado sobre placa resfriada até endurecimento do molde. Os blocos de parafina contendo as amostras de tecido adiposo foram cortados em seções de 5 μ m, aderidos em lâmina de vidro e corados com mistura de hematoxilina e eosina.

Os cortes de parafina contendo os fragmentos de tecido adiposo foram desparafinizados e hidratados. Seguidos de coloração com Hematoxilina de Mayer durante 20 minutos e etapa de lavagem com água corrente durante 25 minutos. Em seguida, foi feita desidratação etanol

70%, coloração com Eosina-Floxina e etapa de lavagem com etanol 95%. Após lavagem, foi feita desidratação com etanol absoluto e clarificação com xilol.

As lâminas foram analisadas em lente de 20x (humanos) e 40x (murino) em microscópio óptico OLYMPUS (IX81) equipado com câmera digital e processados pelo programa *Cell^F(versão 2011)*. A análise do tamanho médio dos adipócitos foi feita de maneira indireta, quantificando o número de pixels de membrana celular corada e tecido associado. A representação é feita pelo percentual de área de pixels. Esta quantificação foi feita por macro, desenvolvida pelo grupo, no programa *FIJI (Image J2 – win64, 2017- NIH)*(Chen & Farese 2002).

3.9 Marcação de gota lipídica

3.9.1 Tecido adiposo branco

Fragmentos de tecido adiposo congelado (humano) ou frescos (murino) cortados com lâmina de bisturi manualmente, foram fixados em formaldeído 3,4% e após lavagens com tampão PBS, foi realizada a marcação de lipídios neutros através da sonda Bodipy 493/505®, na diluição de 1:500 em PBS. Os núcleos foram marcados com sonda DAPI. As imagens foram obtidas por microscopia confocal, equipado com câmera digital (Berry et al. 2014).

3.9.2 Avaliação da formação de gota lipídica em cultura de macrófagos

Após cultivo, os macrófagos murinos derivados de medula óssea (seção 3.12) foram lavados com PBS e fixados com solução de formaldeído 3,7% em PBS. Após fixação, as células foram coradas de acordo com os protocolos abaixo:

Oil red O (ORO): A solução estoque de Oil Red O (Sigma-Aldrich) foi preparada em isopropanol P.A na concentração de 0,3%. A solução de uso foi obtida através da diluição em água (1,5:1 (v/v)) e filtração em filtro de papel para evitar precipitados. Após filtragem adicionamos 300 µL da solução de uso de ORO e deixamos de 2-5 minutos. Lavamos rapidamente com isopropanol 30% e posteriormente com água destilada (5x). Montamos as lâminas com Vectashield® com DAPI.

Bodipy 493/503: 4,4-difluoro-1,3,5,7,8-pentametil-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indaceno ou BODIPY® 493/503 (Molecular Probes) foi diluído em DMSO na concentração de 1 mM (solução estoque). No momento da marcação preparamos a solução de uso diluindo a solução estoque na proporção de 1:5000 (200nM) em PBS. As células foram encubadas com a solução de uso de BODIPY por 15 minutos, protegidas da luz, posteriormente lavadas com PBS (Maya-Monteiro et al. 2008).

3.10 Fracionamento celular de tecido adiposo

Após dissecação, as amostras de tecido adiposo humano foram transferidas para tubo de polipropileno de 50ml contendo DMEM *high glucose*, 2% de Penicilina/Estreptomicina (P/S) (P433, Sigma Aldrich®) e 5ug/ml de ciprofloxacino e armazenadas em gelo durante transporte. Em cabine de segurança biológica, as amostras de tecido adiposo foram lavadas com tampão *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS^{-/-}). Após pesagem, as amostras de tecido adiposo foram cortadas em fragmentos bem pequenos, retirando-se vasos sanguíneos e material fibroso evidente, com auxílio de bisturi.

Após coleta dos depósitos de tecido adiposo murino, as amostras foram lavadas com tampão *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS^{-/-}), até retirada de material indesejado (pelos, sangue). Após pesagem, as amostras de tecido adiposo foram cortadas em fragmentos bem pequenos, retirando-se vasos sanguíneos e material fibroso evidente, com auxílio de bisturi.

3.10.1 Isolamento e cultivo de adipócitos maduros e fração estromal vascular (SVF)

Fragmentos de tecido adiposo (humano ou murino) foram submetidos à digestão enzimática com solução de colagenase I (1 mg/ml), durante 30-40 minutos/37°C, sob agitação orbital a cada 5 minutos. Após digestão, as amostras foram centrifugadas à 200 g por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, a fração sobrenadante enriquecida em adipócitos maduros foi transferida para novo tubo de propileno de 50 ml, contendo meio de cultura DMEM/F12 + 2% P/S + 5ug/ml Ciprofloxacino + 0,3UI/ml insulina e 1 mM de dexametasona em etanol (D4902, Sigma Aldrich), na proporção de 1:4 (v/v). O cultivo dos adipócitos maduros primários foi feito por um período de 24h, em tubo de polipropileno de 50ml, mantidos em estufa úmida à 37°C com 5% de CO₂.

Após retirada da fração de adipócitos maduros, o *pellet* contendo a SVF foi homogeneizado e em seguida filtrado através malha de nylon de 40 µm. Foi realizada nova centrifugação à 300 g/10min e as células foram então ressuspensas em meio de cultura (DMEM *low glucose* + 2% P/S+ 5 µg/ml Ciprofloxacino + 20% Soro fetal bovino - SFB) e distribuídas em garrafa de cultura de 25 cm², mantidas em estufa à 37°C com 5% de CO₂ (Carswell et al. 2012; Silva et al. 2017).

Após 24h de cultivo na garrafa de cultura de 25 cm², a fração aderente de células foi lavada com HBSS-/- (3x), retirando-se as células não aderentes. Em seguida, os cultivos foram mantidos a 37°C com 5% de CO₂ para expansão. Quando em 90% de confluência, as células foram dissociadas com solução de tripsina- EDTA 0,25% (25200056, Gibco) e foi feita expansão até a terceira passagem (1:1). Após expansão, as células foram plaqueadas em placa de 24 poços (1x10⁴ células/poço) para protocolo de diferenciação adipogênica.

3.11 Indução de diferenciação adipogênica *in vitro*

Após plaqueamento (seção 3.10.1) e 48h de espera em 100% de confluência, as células da SVF receberam meio de indução de diferenciação – dia 0 (MDI - DMEM high glucose, 20% de SFB, 0,5mM de Isobutilmetilxantina (IBMX - catálogo I5879 Sigma Aldrich), 1µM de dexametasona, 0,3UI/ml de insulina (Humulin R®, Lilly) e antibióticos.). Após 72h, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado meio de maturação – dia 3 (MM - DMEM high glucose, 20% de SFB, 0,3UI/ml de insulina e antibióticos), seguido de troca de 50% de MM a cada dois dias. O processo de diferenciação adipogênica foi mantido até o 10-14º dia após meio de indução.

3.12 Diferenciação de macrófagos a partir de medula óssea murina

Camundongos C57BL/6J foram eutanasiados e tiveram os ossos das patas traseiras removidos (fêmures e tíbias), epífises cortadas e as medulas ósseas removidas por lavagem com 5ml de meio de cultura BMM (*Bone Marrow Macrophage*)⁹. Após a lavagem dos ossos, a solução obtida é homogeneizada e são plaqueados 1 ml de solução homogênea de células + 10 ml de meio BMM por placa de petri. As placas foram incubadas em estufa com 5% de CO₂ à 37°C. No terceiro dia de cultivo, as placas receberam adição de 10 mL de meio BMM. Após mais 3 dias de incubação, os sobrenadantes são descartados e os macrófagos já diferenciados foram removidos das placas por lavagem com PBS 1x gelado e uso do Cell Scraper, seguido de plaqueamento com 0,5x10⁶ células por poço em placa de 24 poços em meio específico (RPMI 1640 com 2% de SFB, 1% de L-glutamina, 1% de P/S). As células plaqueadas foram mantidas em repouso na estufa por 24 horas antes do ensaio.

⁹ BMM: 60% RPMI 1640 (GIBCO), 20% de SFB (GIBCO), 18% de sobrenadante de célula L929 (rico em M-CSF, *Macrophage Colony Stimulation Factor*), 1% de L-glutamina (GIBCO) e 1% de P/S.

Os macrófagos de medula foram estimulados com 50% de meio condicionado de cultura de 24h de adipócitos maduros primários ou com 50% de meio condicionado de cultura de fração estromal vascular (terceira passagem). Após 24h de estímulo, foi recolhido o sobrenadante de

cultura e as células foram lisadas para posterior análise por *Western blot* ou microscopia de fluorescência.

3.13 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas através do programa GraphPad Prism 5.0 (*GraphPad Software, La Jolla, EUA*). As análises para verificação de normalidade foram realizadas através do teste de Shapiro-Wilk. Para verificação de significância estatística dos experimentos comparativos de plasma de grupo controle e pacientes obesos, assim como entre camundongos ND e HFD foram feitas por teste Mann-Whitney bicaudal (distribuição não normal) ou teste t de Student bicaudal (distribuição normal). Para análise de tamanho dos adipócitos, expressão de proteínas e expressão gênica de gota lipídica e lipólise, quantificação local e secreção de mediadores inflamatórios em WAT humano e murino, adipócitos maduros primários, adipócitos diferenciados *in vitro* e macrófagos foi utilizado teste de Análise de Variância-Univariada não paramétrico (*One way ANOVA* de Kruskal-Wallis) seguida de pós-teste de Dunns. Para todas as análises, foram considerados significativos somente aqueles resultados que apresentaram $p < 0,05$ no teste (e pós-teste), com intervalo de confiança de 95%. Dados foram mostrados como média \pm desvio padrão, com exceção dos dados de citocinas plasmáticas em humanos que foram mostrados como mediana, média e intervalo interquartil.

4 RESULTADOS

Como descrito na seção 2, o principal objetivo deste projeto foi a caracterização de diferentes depósitos de tecido adiposo branco no contexto de obesidade. Para isto foram realizadas análises em amostras humanas, provenientes de pacientes obesos e voluntários saudáveis, e murinas obtidas através de modelo experimental de obesidade induzida por dieta (DIO). Com propósito de maior clareza na descrição dos dados, os resultados a seguir serão representados em dois blocos distintos: Parte I – Pacientes obesos e Parte II – Modelo experimental de obesidade em camundongos.

Parte I

4.1 Dados clínicos - pacientes obesos e voluntários

Os pacientes analisados neste estudo são provenientes de dois programas de assistência a indivíduos obesos: pacientes integrantes do Programa Multidisciplinar de Atendimento ao Obeso Mórbido, conduzido no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho – HUCFF/UFRJ e o segundo grupo é constituído de pacientes acompanhados pelo Serviço de Endocrinologia do Hospital dos Servidores do Estado do Rio de Janeiro – HSE-RJ. No programa do HUCFF, os pacientes são acompanhados previamente por uma equipe multidisciplinar composta por médicos (clínicos, cardiologistas, endocrinologistas, fisiatras), fisioterapeutas, nutricionistas, profissionais de educação física, psicólogos. Esses profissionais acompanham os pacientes selecionados durante as fases pré e pós-operatória, avaliando o perfil de cada paciente e sua evolução clínica. Já os pacientes do HSE-RJ são acompanhados por um período mais curto antes da liberação para a cirurgia e seguido por um acompanhamento mais prolongado pós-cirúrgico. Após verificarmos que não houve diferenças entre os grupos de pacientes dos dois hospitais, em relação às análises realizadas, decidimos considerar em nossos resultados, um só grupo de pacientes.

Os candidatos ao estudo foram selecionados a partir dos seguintes critérios estabelecidos: $35 \leq \text{IMC} \leq 70$; ausência de doença infecciosa aguda ou crônica e/ou inflamatória; idade entre 18 e 65 anos e indivíduos que não tenham sido submetidos a outras técnicas de cirurgia bariátrica anteriormente. Para fins de controle, indivíduos hígidos cadastrados no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho – UFRJ, foram convidados a participar do estudo. Foram incluídos indivíduos com índice de massa corporal dentro da normalidade (≤ 20 e $\geq 24,9$) e que não apresentavam quaisquer outras enfermidades. Neste tópico, encontram-se algumas informações clínicas pertinentes a este estudo, obtidas de voluntários saudáveis (tabela 9) e de pacientes com obesidade mórbida, obtidos durante a fase pré-operatória (tabela 10). Nas tabelas

9 e 10, os parâmetros hipertensão, diabetes e dislipidemia estão representados em números absolutos e o percentual do dado entre parênteses. Os dados de idade e IMC estão representados por mediana e média, respectivamente e entre parênteses o intervalo dos dados.

Tabela 9 **Informações clínicas dos voluntários sadios**

Informações clínicas	Mulher	Homem
Número de indivíduos	18	4
Idade	36 (22-49)	37 (33-46)
Índice de massa corporal (IMC)	22,44 (20,07-24,97)	21,99 (19,88-24,89)
Hipertensão		
Sim	1 (5,55%)	0
Não	17 (94,44%)	4 (100%)
Diabetes Mellitus tipo II		
Sim	0	0
Não	18 (100%)	4 (100%)
Intolerância à glicose	0	
Dislipidemia		
Sim		
Não		

Os dados descritos foram obtidos através da análise do prontuário de registro hospitalar de cada voluntário. Os dados em branco são em decorrência da ausência de informação no prontuário.

Tabela 10 **Informações clínicas dos pacientes obesos mórbidos.**

Informações clínicas	Mulher	Homem
Número de indivíduos	38	5
Idade	41 (19-61)	38 (31-46)
Índice de massa corporal (IMC)	48,92 (35,29-69,46)	48,75 (42,66-63,67)
Hipertensão		
Sim	24 (63%)	2 (40%)
Não	10 (26,3%)	1 (20%)
Diabetes Mellitus tipo II		
Sim	11 (28,9%)	
Não	20 (52,6%)	2 (40%)
Intolerância à glicose	3 (7,89%)	1 (20%)
Dislipidemia		
Sim	13 (34,2%)	
Não	20 (52,63%)	1 (20%)

Os dados descritos foram obtidos através da análise do prontuário de registro hospitalar de cada paciente. Os dados em branco ou a discrepância entre o percentual de cada manifestação clínica e o total de pacientes são em decorrência da ausência de informação no prontuário.

4.2 Avaliação do perfil inflamatório plasmático

Nas últimas décadas, diversos estudos têm reportado que indivíduos obesos apresentam níveis plasmáticos elevados de citocinas pró-inflamatórias como consequência do aumento exacerbado de tecido adiposo branco, elevando a obesidade a uma doença que cursa com um quadro de moderada inflamação crônica (Dandona et al. 2004). Assim, decidimos avaliar o quadro inflamatório dos indivíduos obesos mórbidos alvo deste estudo.

Adiponectina, leptina e resistina, assim como outros mediadores inflamatórios clássicos (MCP-1/CCL2, TNF- α , IL-1 β , TGF- β , IL-6, IL-8, IL-2, e IL-4) foram utilizados para caracterização do perfil inflamatório dos pacientes incluídos neste estudo. Na análise comparativa entre os pacientes obesos mórbidos e o grupo controle, indivíduos hígidos com IMC considerado normal, observamos diferenças nas dosagens de leptina, resistina, MCP-1/CCL2, PAI-1, TNF- α e IL-1 β . Tal como descrito amplamente na literatura, os pacientes obesos apresentaram maior concentração plasmática de leptina quando comparados aos voluntários sadios (figura 9B). Entretanto os níveis plasmáticos de resistina, PAI-1, MCP-1/CCL2, TNF- α , IL-1 β e TGF- β dos pacientes obesos foram inferiores aos observados no grupo controle (figura 9C, D, E, F, H, J). Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada na análise de adiponectina, IL-6, IL-8, IL-2, e IL-4 (figura 9A,G, I, L, M).

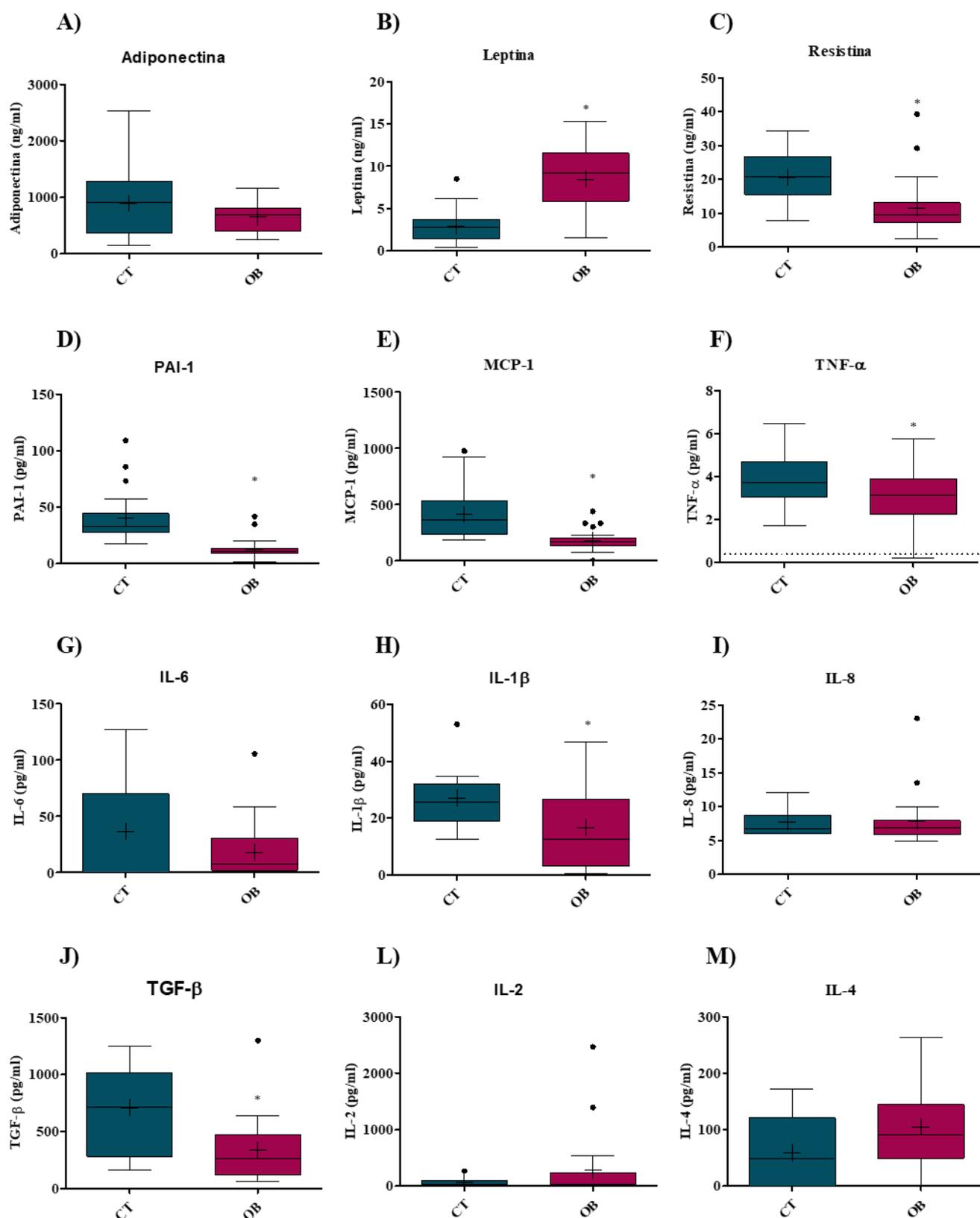


Figura 9 **Avaliação do perfil inflamatório dos pacientes com obesidade mórbida.** CT- Grupo controle (N=7 para IL-8, TGF- β , IL-4, IL-6, IL-1 β e n=22 para resistina, leptina, adiponectina, MCP-1/CCL2, PAI-1 e TNF- α) e OB –grupo de obesidade mórbida (n=21-23 para IL-8, TGF- β , IL-4, IL-6, IL-1 β e n=23-28 para resistina, leptina, adiponectina, MCP-1/CCL2, PAI-1 e TNF- α). A quantificação das adipocinas foi realizada por ensaio Multiplex (A-H, L e M) e por ELISA (I e J). Gráficos representados por mediana e intervalos interquartis. + representa a média dos valores. Os círculos preenchidos representam os outliers (regra de Tukey) e entende-se * por $p < 0,05$.

4.3 Aspecto macroscópico e análise histológica de tecido adiposo branco em indivíduos obesos

A organização estrutural dos tecidos é importante na determinação de sua função. Assim, a análise macroscópica dos distintos depósitos de tecido adiposo abdominais no grande obeso foi ponto de partida deste estudo.

Na figura 10A, observamos que o tecido adiposo subcutâneo apresenta coloração amarelada, com formação de lóbulos de tamanho pequeno a médio, entremeados com tecido conjuntivo. Esta característica é semelhante ao tecido adiposo visceral (omento), não obstante este último apresente maior quantidade de tecido conjuntivo entremeado entre os lóbulos gordurosos e intensa vascularização. O tecido adiposo pré-peritoneal é o que apresenta aspecto mais distinto, no qual se observa coloração mais clara, com formação de lóbulos gordurosos de tamanho médio a grande, sendo coberto por uma espessa camada de tecido conjuntivo e presença de vasos sanguíneos de calibre mais grosso.

A capacidade de hipertrofia e hiperplasia do tecido adiposo branco tem sido relacionada com inflamação e com as chances de desenvolvimento de diabetes *mellitus* tipo II em indivíduos obesos mórbidos (Fang et al. 2015). Assim a medida do tamanho do adipócito é uma informação importante para avaliação da disfunção tecidual. Na avaliação de hipertrofia em amostras de tecido adiposo branco coradas com H&E (figura 10B) observa-se uma maior hipertrofia do tecido adiposo pré-peritoneal quando comparado com os outros dois depósitos de tecido adiposo abdominal. No entanto, com o método utilizado para quantificação do aumento do tamanho dos adipócitos, descrito na seção 3.8, não foi possível observar diferenças entre os diferentes depósitos de tecido adiposo (figura 10C).

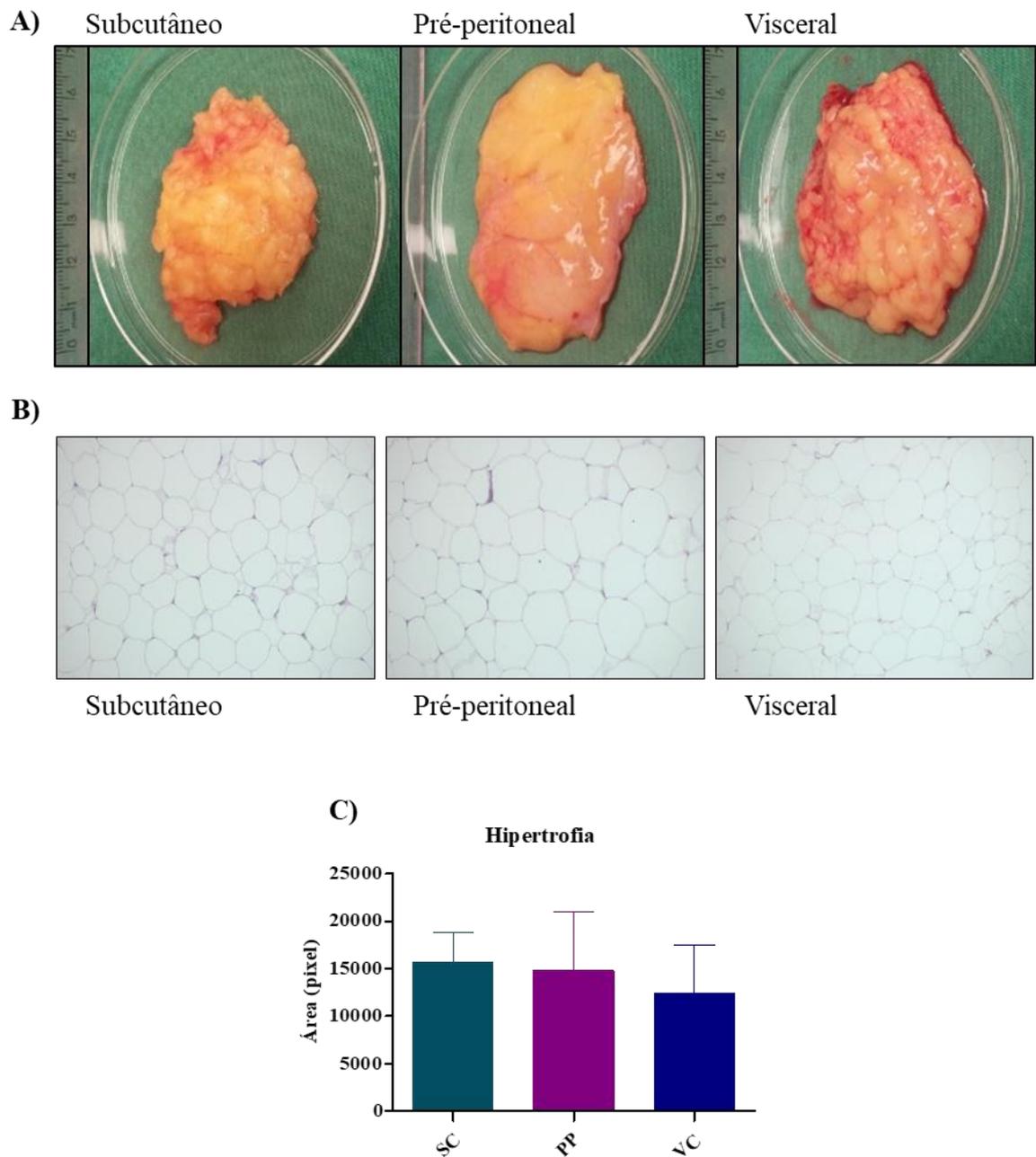


Figura 10 **Aspecto macroscópico e hipertrofia de tecido adiposo humano.** A) Imagens de três diferentes depósitos de tecido adiposo subcutâneo (SC), pré-peritoneal (PP) e visceral (VC) foram tiradas durante momento cirúrgico. As fotos foram tiradas com câmera digital com zoom e foi utilizado uma régua comum de 30cm como referência de tamanho. B) Amostras de tecido adiposo subcutâneo (SC), pré-peritoneal (PP) e visceral (VC) foram coradas com hematoxilina-eosina. As imagens foram obtidas em campo claro por microscopia ótica com mesmo aumento (20x). Todas as modificações de tamanho de imagem para montagem da figura foram feitas de forma acoplada. Em C observa-se gráfico da quantificação do tamanho do adipócito avaliado através do software *Image J*. Foram obtidas cinco imagens de cada amostra para análise do tamanho do adipócito (n=10).

4.4 Avaliação de proteínas de gota lipídica em tecido adiposo de pacientes obesos mórbidos

O processo de hipertrofia do adipócito é consequência direta do crescimento do tamanho da gota lipídica. As proteínas da família das perilipinas (*PAT Family*) são encontradas ubiquamente nestas organelas, alternando entre si, majoritariamente, de acordo com o tamanho da gota lipídica. Gotas lipídicas maiores apresentam maior quantidade de perilipina, enquanto gotas lipídicas de tamanho menor apresentam majoritariamente a proteína PLIN2. A partir da descoberta da perilipina, a primeira proteína de gota lipídica descrita, estabeleceu-se a ideia de que estas proteínas estruturais de gota lipídica seriam reguladoras essenciais do metabolismo lipídico (Greenberg et al. 1991). Assim, uma etapa importante para a caracterização dos depósitos de tecido adiposo humano, é a análise do tamanho da gota lipídica assim como a análise das proteínas estruturais de gota lipídica, relacionadas ao metabolismo lipídico.

Na visualização do tamanho de gota lipídica em tecidos adiposos humano subcutâneo, pré-peritoneal e visceral marcadas com sonda BODIPY® 493/505 (vermelha), observamos que dentro de uma mesma amostra ocorre uma variação importante de tamanho de gota lipídica, porém a maioria das gotas lipídicas exibem tamanho superior a 100 μm (figura 11A).

Na figura 11B-C, observa-se a comparação da expressão das proteínas estruturais de gota lipídica em tecido adiposo de pacientes com obesidade mórbida: perilipina encontra-se igualmente expressa nos três diferentes depósitos de tecido adiposo abdominal, enquanto o omento apresenta maior quantidade de ADRP, quando comparado aos depósitos subcutâneo e pré-peritoneal. Por meio de PCR em tempo real, também verificamos semelhante expressão dos genes *PLIN1* e *PLIN2* correspondentes à proteína perilipina e ADRP respectivamente, nos tecidos adiposos subcutâneo, pré-peritoneal e visceral (Figura 11D).

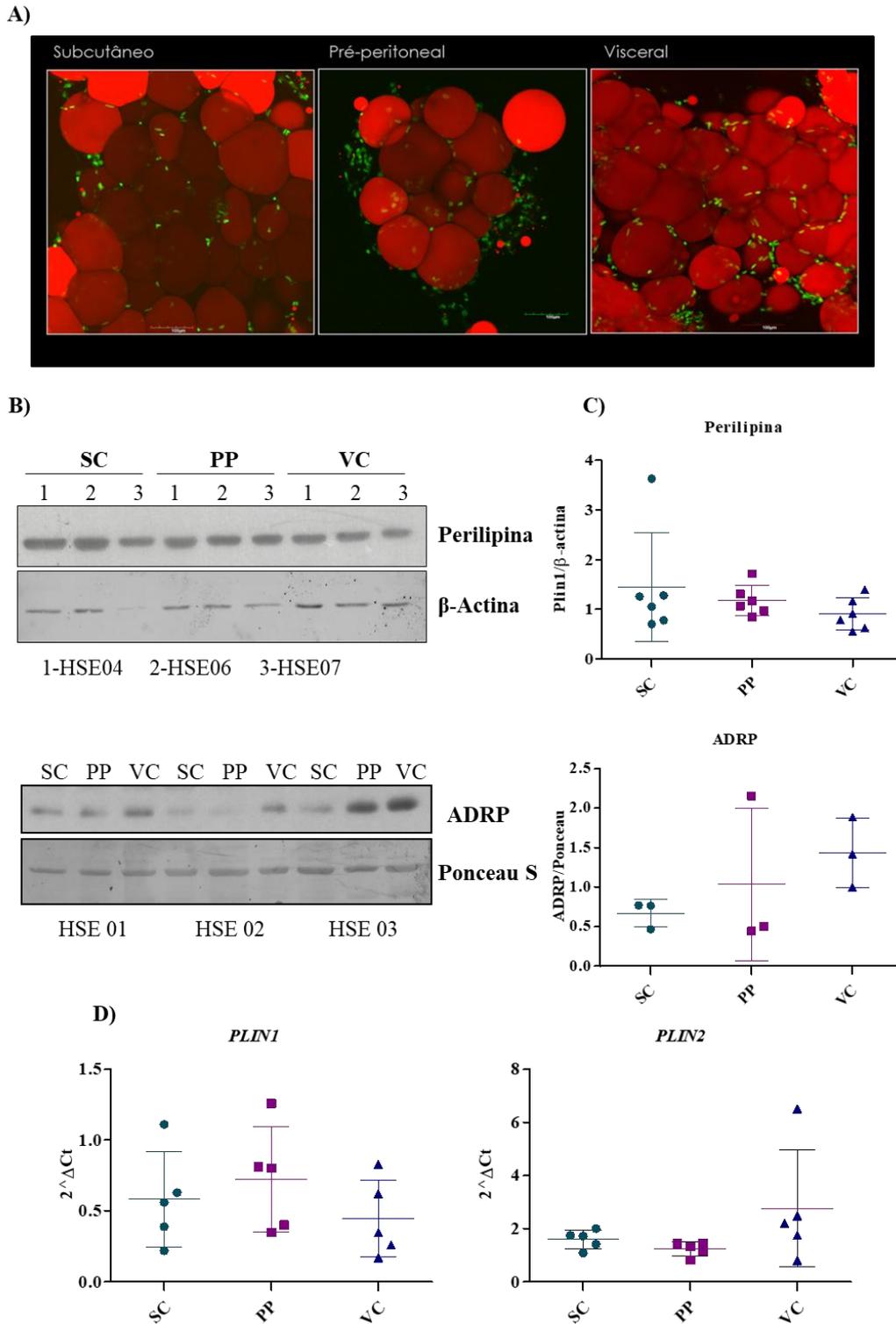


Figura 11 Avaliação do tamanho de gota lipídica e proteínas relacionados em tecido adiposo humano. EM A, fragmentos congelados de tecido adiposo humano foram marcados com sonda lipídica Bodipy® 493/505 (vermelho) e o núcleo das células marcadas com DAPI (verde). As imagens foram capturadas por microscopia confocal e 20x de magnificação. n= 1 paciente obeso. Em B, amostras de três depósitos de tecido adiposo subcutâneo (SC), pré-peritoneal (PP) e visceral (VC) de paciente obeso (n=3) foram avaliadas através de *Western blot* para a presença de perilipina e ADRP. (C) Gráficos da análise densitométrica de perilipina (n=6) e ADRP (n=3), avaliados pelo programa *Image J*. Em D, observa-se a análise de expressão gênica de perilipina (*PLIN1*) e ADRP (*PLIN2*) em pacientes obesos (n=5, que compreendem HSE01, HSE02, HSE03, HSE04 e HSE06). Os resultados foram normalizados pela expressão de β -actina e estão representadas como expressão relativa de RNAm.

4.5 Comparação da expressão de proteínas relacionadas ao metabolismo lipídico em diferentes depósitos de tecido adiposo

Dentro de um quadro de obesidade, observa-se um influxo muito grande de ácidos graxos para corrente sanguínea e conseqüentemente depósito destas moléculas em órgãos não especializados, levando ao mau funcionamento destes tecidos. Este influxo é causado por um aumento do processo lipolítico em adipócitos no tecido adiposo. O processo de lipólise é extremamente coordenado e envolve a participação de diversas proteínas, dentre elas estão as lipases (HSL e ATGL) e FABP4 (Birnbbaum 2003; Tansey et al. 2004a; Bernlohr 2016). Assim, a comparação da capacidade lipolítica entre diferentes depósitos de tecido adiposo e conseqüente contribuição para o exacerbado de ácidos graxos circulantes é um ponto importante para este estudo.

Na figura 12A-B encontra-se a análise de HSL e ATGL por *Western blot*. Não observamos diferenças estaticamente significativas entre os três depósitos de tecido adiposo abdominal (SC, PP e VC) em relação à lipase HSL. Entretanto, na avaliação de ATGL, observamos significativo aumento da expressão desta proteína no tecido adiposo pré-peritoneal. Em relação à expressão gênica de *FABP4* avaliada por PCR em tempo real (figura 12D) não foi possível observar diferença entre os diferentes depósitos, embora note-se uma tendência de maior expressão deste gene no tecido adiposo visceral.

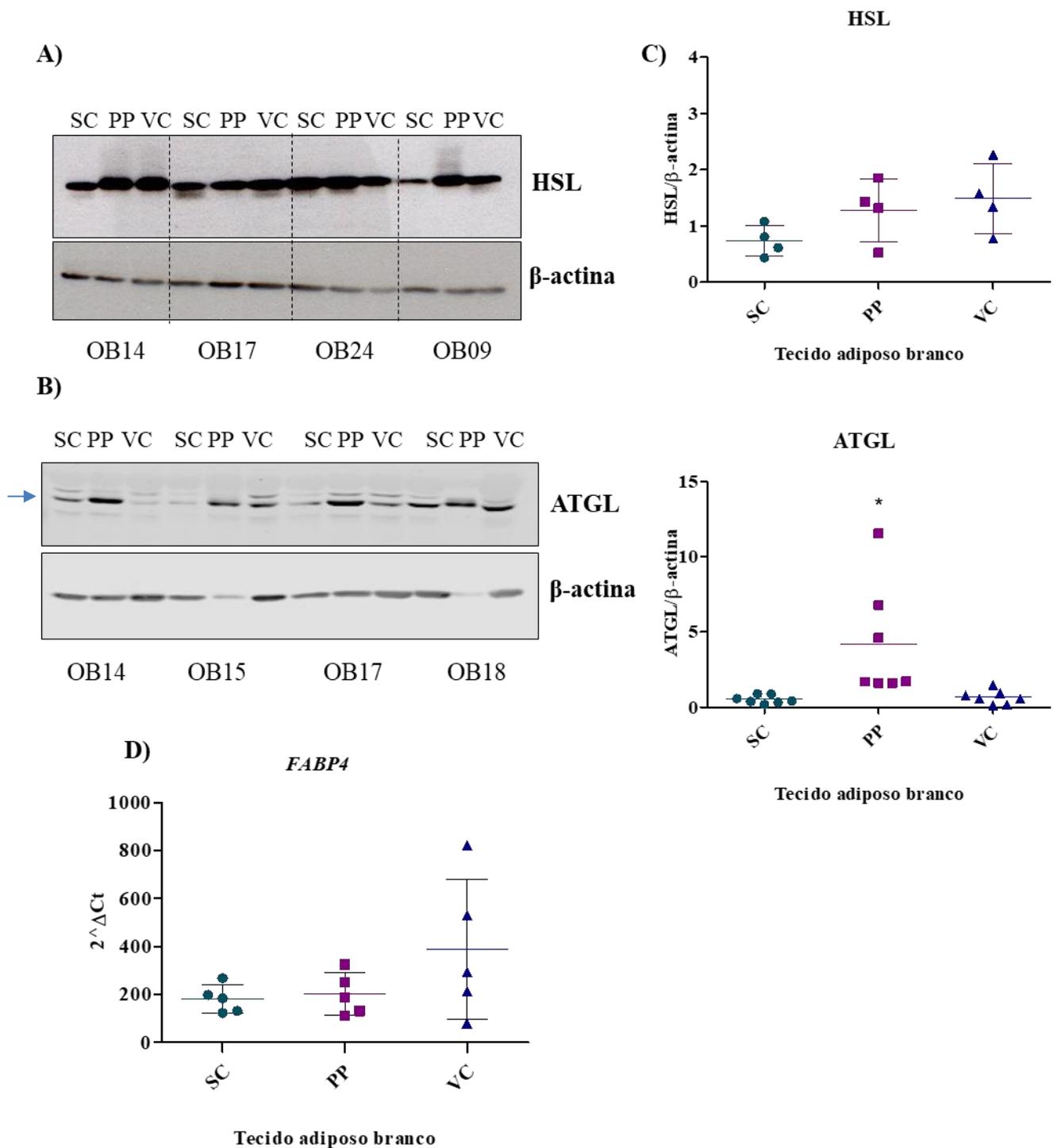


Figura 12 **Comparação do metabolismo lipídico em diferentes depósitos de tecido adiposo humano.** Em A, amostras de três depósitos de tecido adiposo subcutâneo (SC), pré-peritoneal (PP) e visceral (VC) de paciente obeso foram avaliadas através de *Western blot* para a presença de HSL (n=3). Em B, observa-se *Western blot* representativo de experimento com 4 pacientes para proteína ATGL. Em C, gráficos da análise densitométrica de HSL e ATGL, avaliados pelo programa *Image J*. Em D, gráfico relativo à expressão gênica de FABP4. Os resultados foram normalizados pela expressão de β-actina e estão representadas como expressão relativa de RNAm. * p< 0,05.

4.6 Inflamação em diferentes depósitos de tecido adiposo humano

PPAR γ é essencial para desenvolvimento e manutenção do tecido adiposo (Brun et al. 1996) e representa uma conexão importante entre o metabolismo lipídico, resistência à insulina e o sistema imune (Ahmadian et al. 2013). Tendo em vista a importância desta proteína no desenvolvimento e manutenção do tecido adiposo assim como no processo inflamatório e o processo inflamatório crônico na obesidade mórbida, fomos investigar se haveria diferenças na expressão desta proteína nos diferentes depósitos de tecido adiposo humano. Observamos, por *Western Blot* (figura 13), que há uma variação do padrão da presença de PPAR γ tanto entre os tecidos quanto entre os pacientes.

Assim, com o objetivo de avaliar a contribuição de cada WAT para a inflamação crônica presente em indivíduos obesos, fomos avaliar a presença de TNF- α em lisado de três depósitos de tecido adiposo abdominal. Tanto no ensaio de *Western blot* quanto no ensaio de *Luminex* foi possível observar uma variabilidade importante no que concerne a presença desta citocina classicamente pró-inflamatória. Na figura 14A, estão representados 3 pacientes obesos não-diabéticos (NDM) e uma paciente diabética (DM). Observa-se que a paciente com diabetes apresentou importante expressão de TNF- α em todos os depósitos de tecido adiposo. Esta observação está em concordância com o que é descrito na literatura, uma vez que já está bem estabelecida a relação direta entre elevados níveis plasmáticos dessa citocina e diabetes *mellitus* tipo II (Miyazaki et al. 2003). Entretanto é possível notar expressão superior desta proteína também em uma paciente não-diabética.

Considerando a possibilidade de que a técnica de *Western blot* não fosse a mais adequada para avaliação de TNF- α neste tipo de amostra, avaliamos por *Luminex* em lisado de tecido adiposo de oito pacientes não diabéticos (figura 14B). Neste ensaio obtivemos a quantificação TNF- α em apenas 9 amostras não pareadas, ou seja, não foi possível quantificar esta citocina nos três depósitos de tecido adiposo da cada paciente.

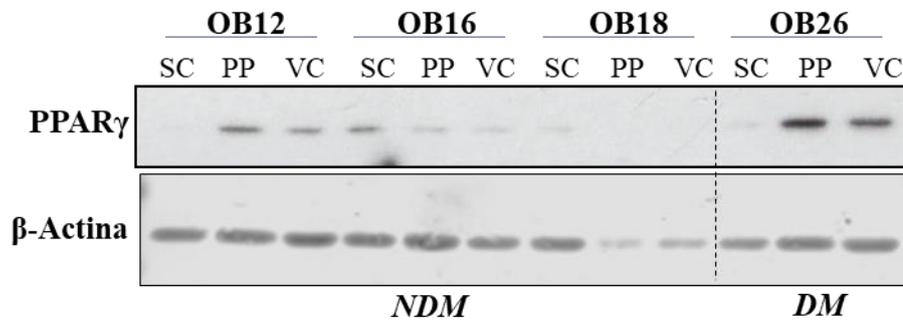


Figura 13 **Avaliação de PPAR γ em tecido adiposo.** Amostras de três depósitos de tecido adiposo subcutâneo (SC), pré-peritoneal (PP) e visceral (VC) de paciente obeso não diabéticos – NDM (n=3) e um paciente obeso diabético – DM (n=1) foram avaliadas através de *Western blot* para a presença de PPAR γ .

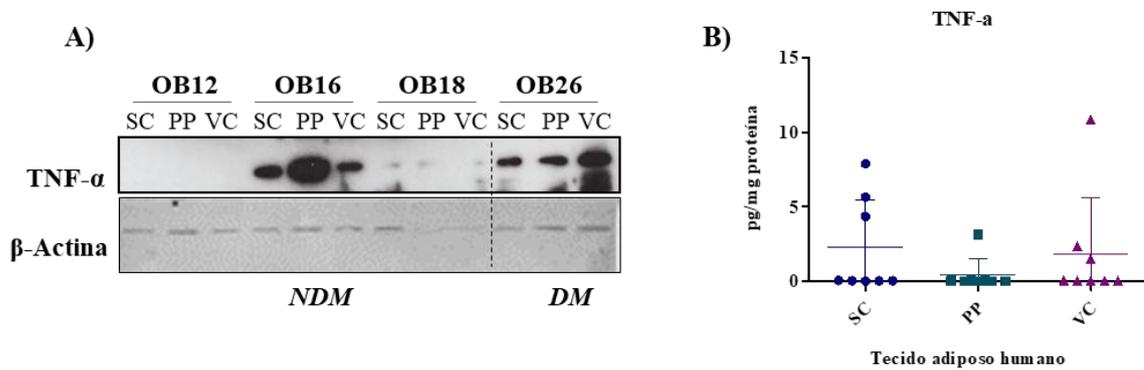


Figura 14 **Avaliação de TNF- α em tecido adiposo.** Amostras de três depósitos de tecido adiposo subcutâneo (SC), pré-peritoneal (PP) e visceral (VC) de paciente obeso não diabéticos – NDM (n=3) e diabético – DM (n=1) foram avaliadas através de *Western blot* para a presença de TNF- α (A). Em B observa-se dosagem de TNF- α em lisado proteico de tecido adiposo branco, avaliado por técnica de *Luminex*. Este ensaio foi realizado sem distinção entre a presença ou não de diabetes *Mellitus*. Os resultados são normalizados pelo total de proteínas e representados em pg/mg

A leptina, uma das principais adipocinas secretadas por adipócitos, exerce múltiplas funções regulatórias no organismo, além de ser uma das principais citocinas a fazer a ligação direta entre tecido adiposo e sistema imune. Na figura 15A-C, observa-se a comparação entre três depósitos de tecido adiposo abdominal de pacientes obesos em relação à leptina e seu receptor. Podemos observar que, não há diferença significativa na expressão do receptor de leptina (*LEPR*) quando comparamos todos os pacientes avaliados neste ensaio. No entanto, o tecido adiposo pré-peritoneal apresenta como um grupo distinto dos outros tecidos, com maior variabilidade entre amostras, alcançando 0,5 vezes maior expressão de mRNA (figura. 15A). Em relação ao conteúdo de leptina, o tecido adiposo visceral apresenta menor concentração de leptina quando comparado ao tecido subcutâneo e pré-peritoneal (figura 15B). Resultados preliminares de cultura de explante de tecido humano indicam que o tecido adiposo subcutâneo secreta maior quantidade de leptina quando comparado com os outros depósitos de tecido adiposo, mesmo após 72h em cultura (figura 15C).

A adiponectina é a mais abundante citocina secretada pelo tecido adiposo. Sua produção está inversamente associada à expansão do tecido adiposo, sendo comumente observado quadro de hipoadiponectinemia em pacientes obesos mórbidos (Trujillo & Scherer 2005). A expressão gênica para adiponectina foi semelhante nos três tecidos avaliados (figura 15D). Não obstante tenhamos observado maior expressão de adiponectina no depósito visceral na análise do lisado proteico por *Western blot* (figura 15E). O tecido subcutâneo apresentou uma variação importante entre as diferentes amostras e essa variação foi independente da presença de resistência à insulina (RI). Quando observamos o resultado do tecido pré-peritoneal verificamos que este tecido apresentou consistentemente uma menor quantidade de adiponectina do que o omento. O conteúdo de adiponectina pode variar no tecido de acordo com a taxa que este tecido está secretando por isso realizamos um experimento de cultura de explante do tecido ex-vivo.

Ao avaliarmos a secreção de adiponectina em cultura de explante de tecido adiposo, não observamos efeito tão pronunciado entre as diferentes amostras quanto o que foi visto em relação à leptina. Ao avaliarmos a secreção de adiponectina em cultura de explante de tecido adiposo, observamos que não há diferença muito expressiva o que contrasta com o resultado o que foi visto em relação à leptina. Ainda assim podemos ressaltar que o tecido subcutâneo, além de apresentar uma significativa capacidade de secreção de leptina, mantém capacidade de secreção de adiponectina.

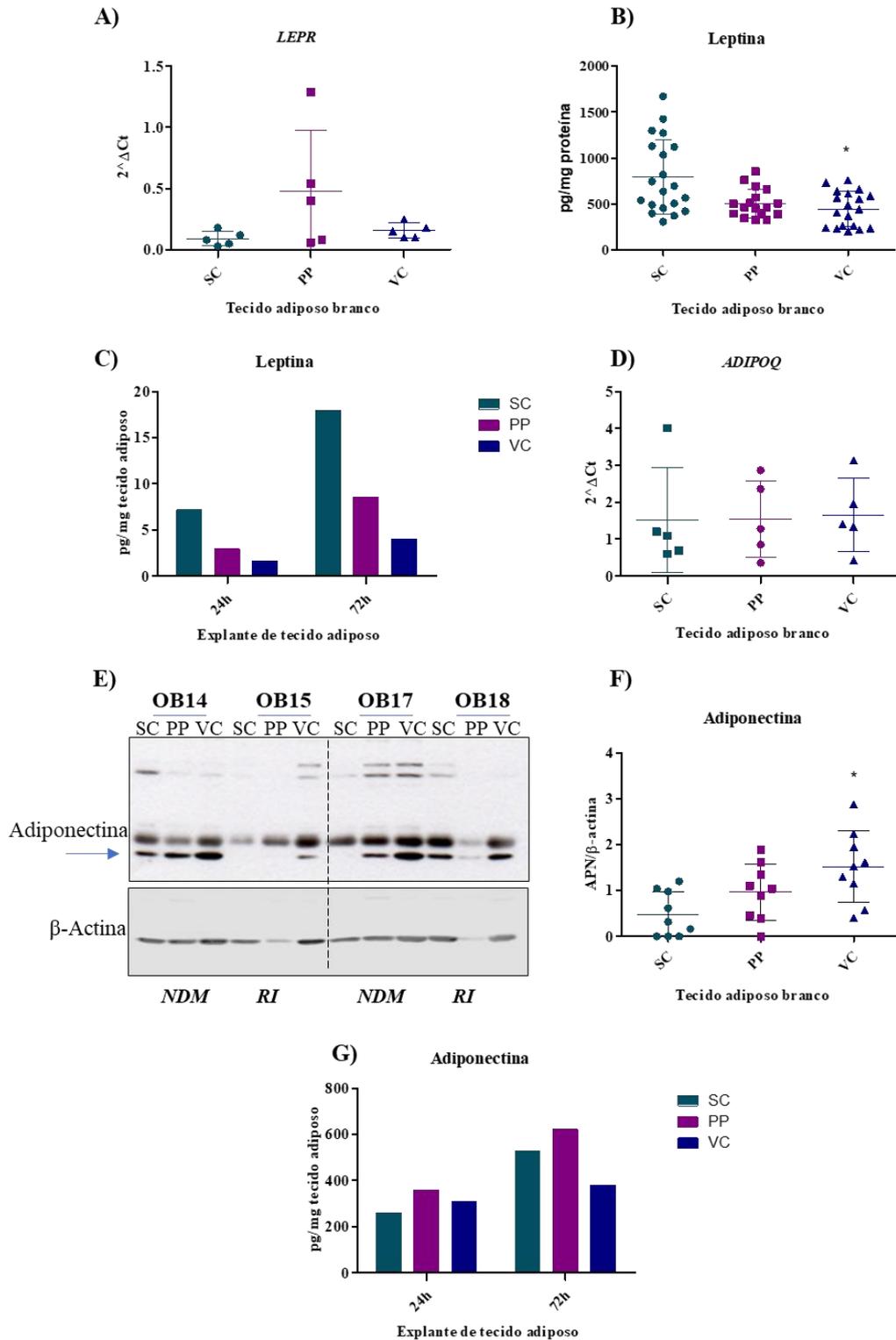


Figura 15 **Avaliação de leptina e adiponectina em tecido adiposo abdominal.** A expressão gênica do receptor de leptina – LEPR (A) e ADIPOQ (D) e do foram analisadas em pacientes obesos não diabéticos (n=5). Os resultados foram normalizados pela expressão de β -actina e estão representadas como expressão relativa de RNAm. Em E, tecido adiposo subcutâneo (SC), pré-peritoneal (PP) e visceral (VC) de paciente obeso não diabéticos (NDM, n=2) e resistente à insulina (RI, n=2) foram avaliadas através de *Western blot* para a presença de adiponectina. Em F, observamos gráfico da análise densitométrica de adiponectina, avaliados pelo programa *Image J* (NDM, n=7 e RI, n=2). Em C e G, sobrenadantes da cultura de 24h e 72h de explante de tecido adiposo: subcutâneo (SC), pré-peritoneal (PP) e visceral (VC) foram avaliadas por Luminex para análise de adipocinas (n=1). Amostras de três depósitos de tecido adiposo foram avaliadas por ensaio imunoenzimático (ELISA) para análise de leptina (SC, PP e VC - n=13, 17 e 17, respectivamente). * para $p < 0,05$.

O quadro de inflamação crônica observado na obesidade está associado ao aumento do infiltrado de leucócitos. Macrófagos são o tipo de célula imune majoritária neste tecido e parecem exercer papel importante na disfunção do tecido adiposo e no desenvolvimento de resistência à insulina (Kanda et al. 2006; Suganami & Ogawa 2010).

Na figura 16 analisamos a presença de MCP-1/CCL2 e GM-CSF, importantes mediadores inflamatórios para recrutamento de macrófagos e sua maturação. Na avaliação do conteúdo de MCP-1/CCL2 no lisado proteico de tecido adiposo, o tecido visceral apresentou menor concentração de MCP-1/CCL2 quando comparado aos outros dois depósitos (figura 16A). Entretanto, resultados preliminares obtidos na avaliação do sobrenadante de cultura de explante de tecido adiposo mostram o tecido adiposo visceral secretando maior quantidade desta quimiocina (figura 16B). Observamos que o tecido adiposo subcutâneo também possui maior quantidade da citocina GM-CSF quando comparado ao tecido pré-peritoneal e visceral (figura 16C). Embora tenhamos observado diferenças em relação à MCP-1/CCL2 e GM-CSF entre os diferentes depósitos de tecido adiposo humano, ao compararmos o conteúdo de monócitos através de CD14, não observamos diferença na expressão desta proteína entre as amostras de tecido adiposo abdominal de pacientes obesos mórbidos (figura 16D).

A modulação da inflamação presente no obeso mórbido envolve a participação de diversos mediadores inflamatórios. Citocinas tais como IL-6 e IL-10 apresentam níveis alterados no indivíduo com obesidade mórbida (Jonas et al. 2015). Tendo em vista os resultados surpreendentes da análise de citocinas plasmáticas dos pacientes incluídos neste estudo e as diferenças observadas em relação à adipocinas tais como leptina, adiponectina e MCP-1/CCL2, fomos investigar se o conteúdo de outros mediadores inflamatórios se correlacionava com o perfil plasmático destes pacientes e se havia contribuição discrepante entre os tecidos adiposos abdominais.

Para IL-6, IFN- α 2, IL-8, IL-10 e IL1-Ra, os três depósitos de tecido adiposo abdominal mostraram níveis semelhantes (figura 17A, D, F e G). Já em relação à IFN- γ , tanto o tecido pré-peritoneal quanto o visceral mostraram menor concentração desta citocina quando comparados ao tecido subcutâneo (figura 17 C).

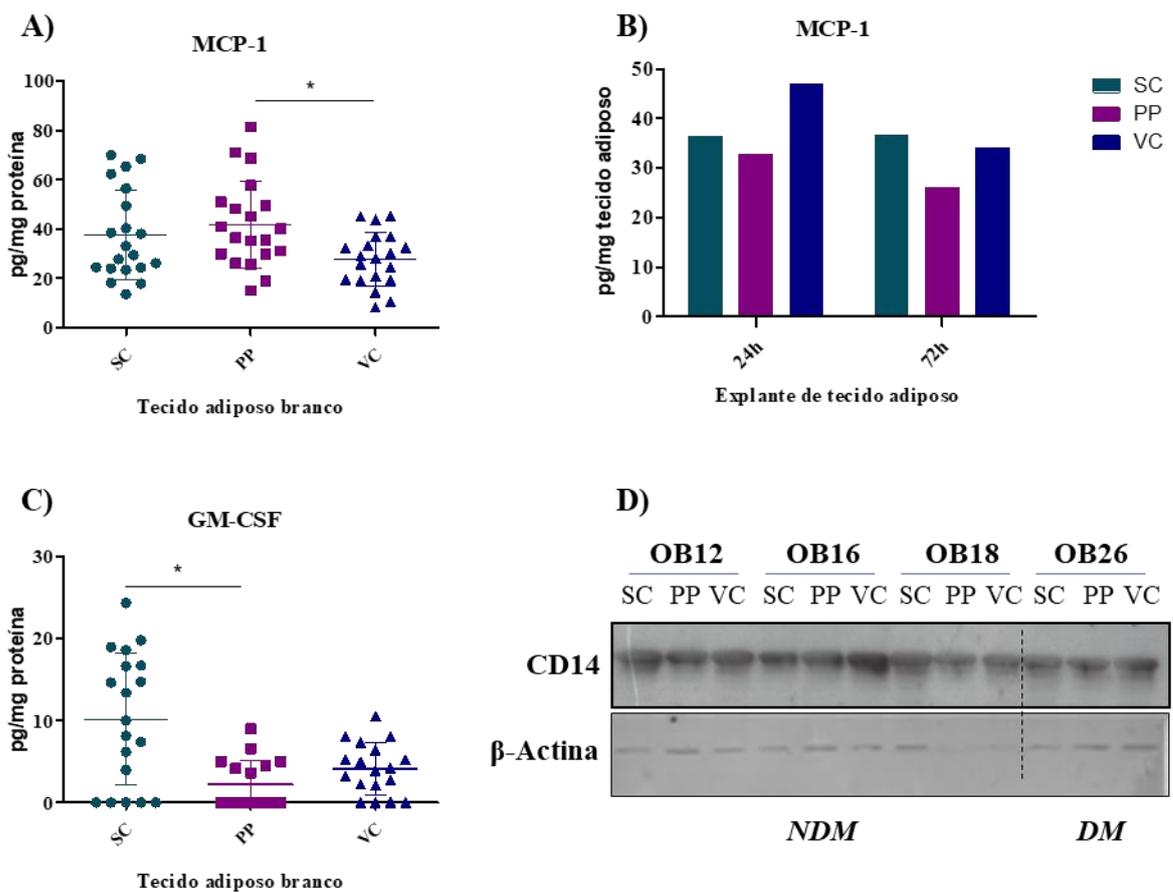


Figura 16 **Comparação de MCP-1/CCL2 e GM-CSF em tecido adiposo branco.** (A) Amostras de três depósitos de tecido adiposo foram avaliadas por ensaio imunoenzimático (ELISA) para análise de MCP-1/CCL2 (n=20). Em B, análise de sobrenadantes da cultura de 24h e 72h de explante de tecido adiposo avaliados por Luminex para análise de MCP-1/CCL2 (n=1). Em C, amostras de três depósitos de tecido adiposo foram avaliadas por ensaio de Luminex (n=20). Em D, tecido adiposo subcutâneo (SC), pré-peritoneal (PP) e visceral (VC) de paciente obeso não diabéticos (NDM, n=3) e diabético (DM, n=1) foram avaliadas através de *Western blot* para a presença de CD14. * para $p < 0,05$.

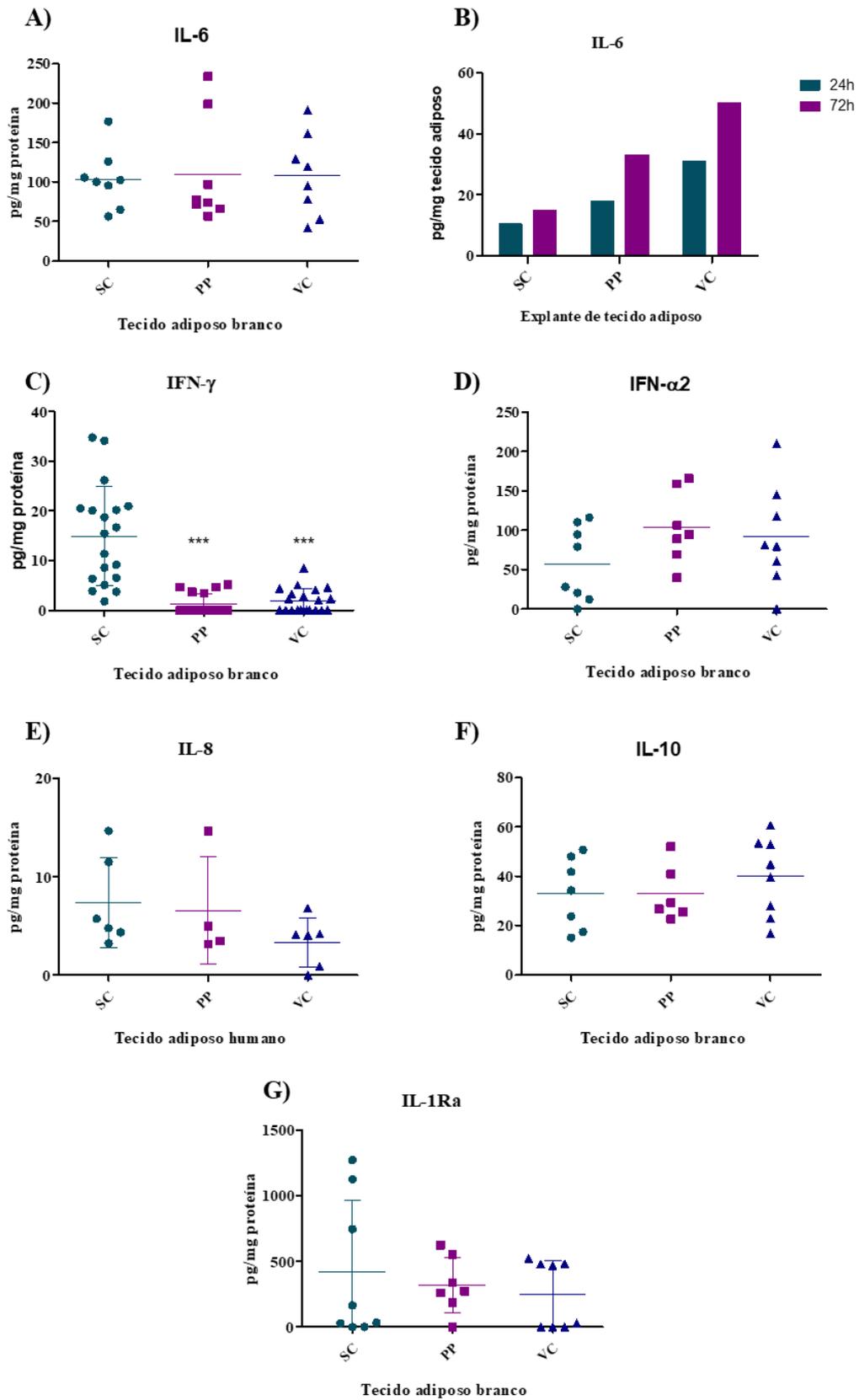


Figura 17 **Análise de lisado proteico de três diferentes depósitos de tecido adiposo branco.** Amostras de três depósitos de tecido adiposo foram avaliadas por ensaio imunoenzimático (ELISA) para análise de IL-6 e IL-10 (A e F, respectivamente) e Luminex para IL-8, IFN- γ , IFN α 2, IL1-Ra (n=8) (C, D, E e G). Em B, análise de sobrenadantes da cultura de 24h e 72h de explante de tecido adiposo avaliados por Luminex para análise de IL-6 (n=1)

4.7 Caracterização do modelo de obesidade experimental induzida por dieta.

Existem vários modelos experimentais para o estudo da obesidade, variando entre modelos por alterações genéticas, obesidade induzida por diferentes dietas, indução de obesidade farmacológica e cirúrgica (Lutz & Woods 2012).

Os modelos de camundongos com alterações genéticas são bastante úteis e largamente utilizados, no entanto, diferem significativamente da obesidade em humanos. Assim neste trabalho optamos por utilizar modelo de obesidade induzida por dieta com elevado conteúdo de lipídios em camundongos C57B/16 (DIO), que levam a mutações poligênicas mais comumente encontrada em humanos com obesidade (Lutz & Woods 2012).

A primeira etapa desta sequência de resultados é a caracterização e avaliação das alterações fenotípicas esperadas após indução de obesidade nos camundongos submetidos à dieta hiperlipídica. Na figura 18 estão descritos alguns parâmetros para validação do modelo: ganho de peso, glicemia, resistência à insulina e lipídemia. Em A, pode-se observar que no início da dieta não há diferença de peso entre camundongos dos dois grupos (figura 18A) e que com o decorrer do tempo de tratamento, há maior ganho de peso no grupo HFD ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo que recebeu dieta normolipídica (figura 18B). Não foi observado diferença nos níveis séricos de triglicérides, colesterol e na glicemia após jejum de quatro horas entre os grupos ND e HFD (figura 18E, F e G), entretanto no teste de tolerância à glicose (figura 18E), o grupo HFD apresentou pico glicêmico superior ao grupo ND, mantendo nível de glicose alto após 30 minutos da ingestão de glicose, caracterizando quadro de intolerância à glicose. O gráfico 18C representa a ingesta calórica dos grupos controle e do grupo de camundongos alimentados dieta hiperlipídica, no qual se observa uma maior ingestão calórica diária pelo grupo DIO.

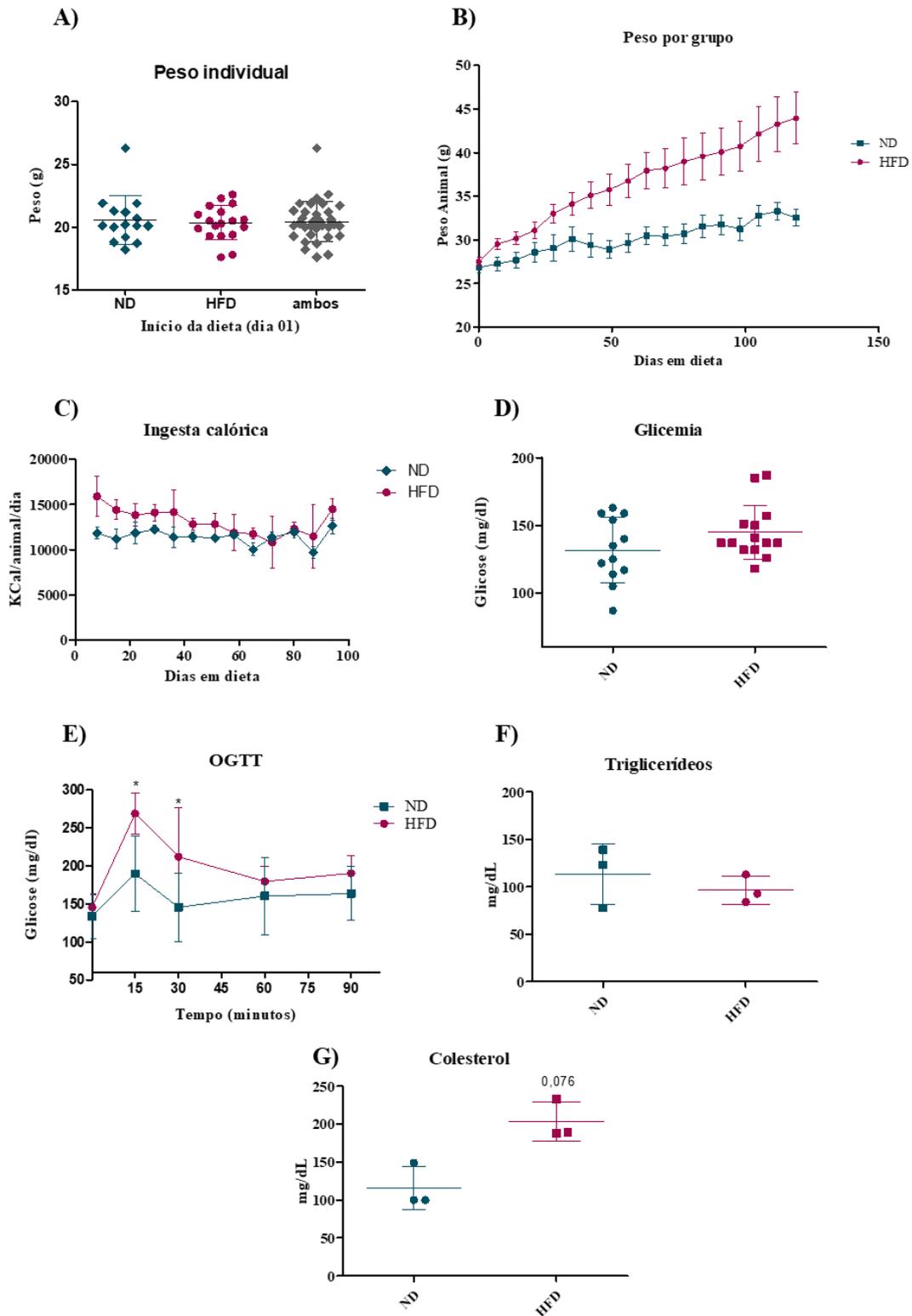


Figura 18 **Caracterização do modelo de obesidade induzida por dieta hipercalórica.** Foram comparados os grupos alimentados com dieta hipercalórica (HFD) versus dieta normolipídica (ND) em relação ao peso corporal no dia 01 da dieta (A) e no decorrer da dieta (B) e ingesta calórica diária média (C). Dados representativos de experimentos independentes, com n=5 a 15 por grupo. Em D, observa-se medida glicêmica dos grupos ND e HFD em jejum de 4h. Em E observa-se teste de tolerância à glicose comparativo entre os grupos HFD versus ND e em D, glicemia após jejum de 4 horas. Em F e G, observa-se dosagem de triglicerídeos e colesterol por ensaio colorimétrico. * para $p < 0,05$.

4.8 Avaliação do perfil de citocinas em camundongos submetidos à dieta hiperlipídica

A leptina é um hormônio com papel fundamental na regulação do balanço energético, atuando no hipotálamo e suprimindo a ingestão. Indivíduos obesos comumente apresentam resistência hipotalâmica à leptina, devido ao aumento excessivo dos níveis circulantes desta adipocina em consequência da expansão do tecido adiposo. Assim, uma das características importantes para validação do modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica é a quantificação dos níveis séricos de leptina. Na figura 19A, observamos que os camundongos HFD apresentaram leptinemia superior ao grupo de camundongos controle.

A correlação dos níveis elevados de MCP-1/CCL2 e obesidade induzida por dieta vem sendo reportada em diversos estudos, entretanto, neste estudo não foi possível observar diferença nos níveis séricos desta quimiocina quando comparamos camundongos sob dieta normolipídica e camundongos que receberam HFD (figura 19B).

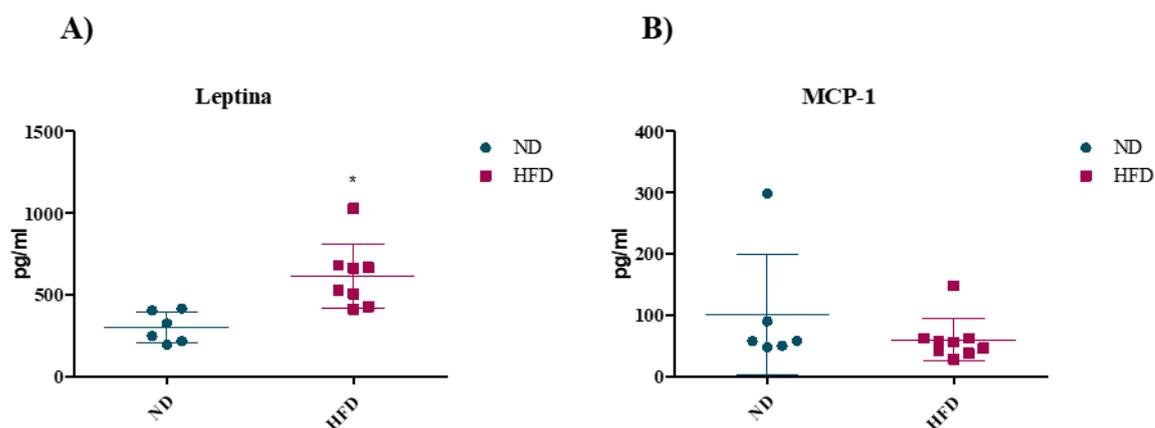


Figura 19 Avaliação do perfil inflamatório de camundongos C57B/16 sob dieta HFD. ND- Grupo controle e HFD –grupo de experimental de obesidade. A quantificação das adipocinas foi realizada por ELISA. Gráficos representados por mediana e desvio-padrão. Para * $p < 0,05$.

4.9 Avaliação da expansão dos diferentes depósitos de tecido adiposo.

A obesidade é definida pelo aumento exacerbado de tecido adiposo branco. Na figura 20 A, podemos observar a diferença de tamanho entre o camundongo controle e o camundongo que recebeu dieta enriquecida em lipídios. Esta diferença é atribuída ao aumento de tamanho dos principais depósitos de tecido adiposo branco do camundongo submetido à dieta *high-fat*, como observado nas imagens B e C, onde estão evidenciados os depósitos de tecido adiposo subcutâneo inguinal e o depósito perigonadal/epididimal, respectivamente (figura 20B-C).

Tal como demonstrado em pacientes obesos neste estudo, os depósitos de tecido adiposo branco murino também apresentam diferenças em relação à coloração e tamanho. Na figura 21 demonstramos o importante aumento de tamanho dos diferentes depósitos de tecido adiposo branco subcutâneo e visceral (epididimal, mesentérico e retroperitoneal), após dieta hiperlipídica. Pudemos também observar diferenças no tamanho do tecido adiposo dentro de um mesmo grupo. Assim, fomos avaliar a hipertrofia dos diferentes depósitos de tecido adiposo em camundongos ND e HFD.

Na figura 22 pode-se observar claramente a diferença do tamanho dos adipócitos entre os quatro depósitos de tecido adiposo de camundongo com ingestão de dieta normolipídica (ND). Em camundongos sob dieta hiperlipídica (HFD) esta discrepância continua sendo verificada, ainda que de forma mais sutil. No grupo ND, os tecidos adiposos subcutâneo e retroperitoneal embora possuam variabilidade considerável do tamanho dos adipócitos maduros, em sua grande maioria, estas células não estão muito hipertrofiadas. Há também grande presença de células adiposas em diferenciação (multiloculares). O tecido mesentérico (VC) apresenta uma maior uniformidade de tamanho de adipócito maduro e com matriz extracelular espessa separando estas células. O tecido epididimal é o depósito de tecido adiposo que aparenta ter um menor número de células em diferenciação e que apresenta adipócitos maiores.

Em camundongos HFD, ocorre uma hipertrofia importante em todos os quatro tecidos adiposos exibidos, além de ser possível observar uma “padronização” no tamanho dos adipócitos dentro de um mesmo depósito de tecido adiposo. Com intuito de quantificar estas diferenças observadas tanto entre tecidos quanto entre dieta normal versus dieta hiperlipídica, foi feita uma análise no programa *Image J* baseada no número de pixels contados através da marcação de membrana celular. A quantificação do tamanho médio da célula adiposa se dá de maneira indireta, entendendo-se que quanto maior o número de pixels marcados, menor o tamanho do adipócito. Na figura 22B mostramos a quantificação do tamanho médio dessas células, no gráfico representadas por área (pixels).

Em camundongos ND, o tamanho médio dos adipócitos não variou entre tecido SC e VC. Este primeiro, no entanto, dispõe de adipócitos menores quando comparado ao tecido retroperitoneal. Como observado na imagem em H&E, o tecido epididimal dispõe de células de maior tamanho. No camundongo HFD, todos os depósitos tiveram aumento significativo no tamanho de células adiposas e o depósito de tecido epididimal é o que apresentou maior hipertrofia em consequência da dieta (figura 22B).

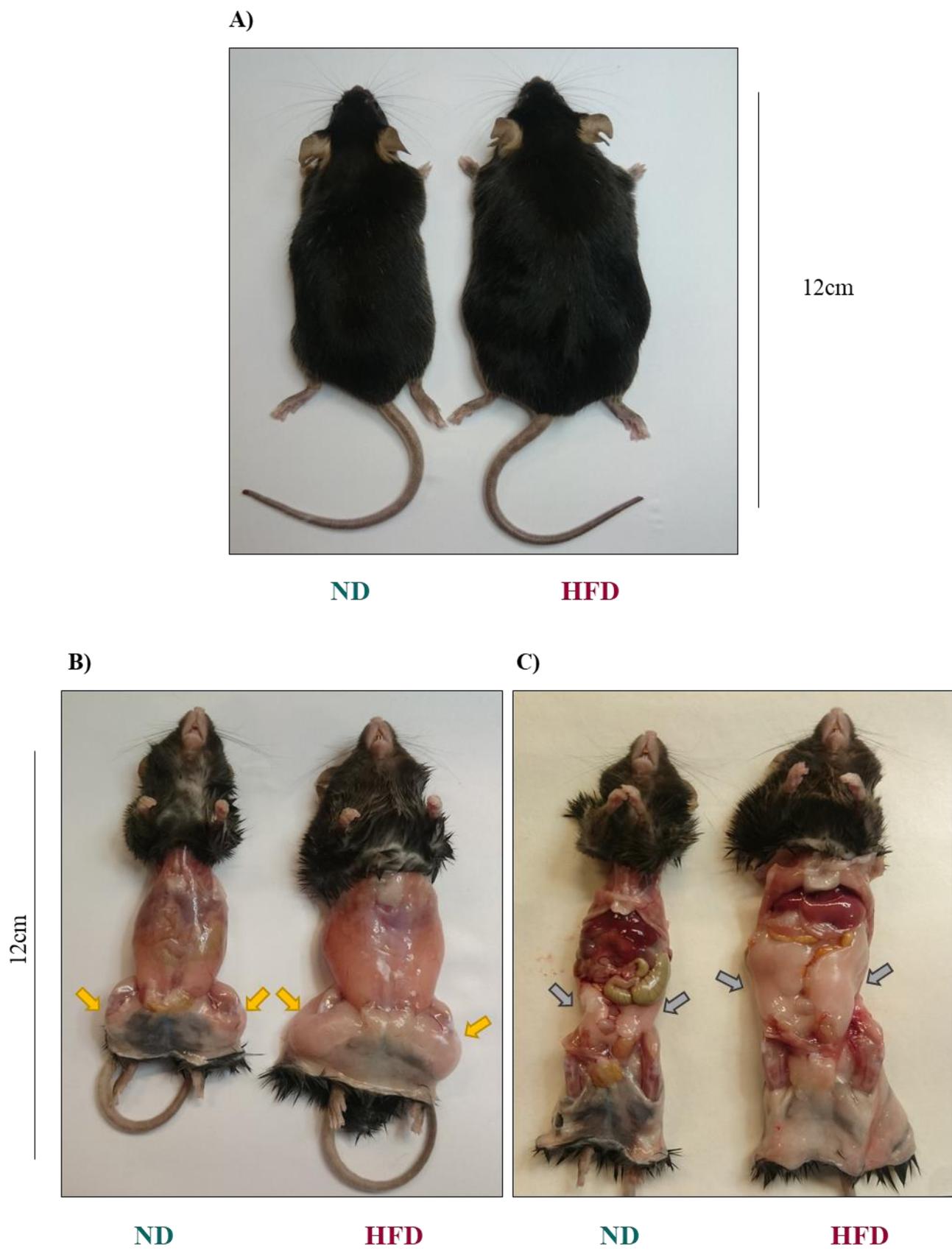


Figura 20 Foto representativa de aumento de peso induzido por dieta hipercalórica. Camundongos C57BL/6J machos submetidos à dieta controle (ND) e dieta hipercalórica (HFD). Em B e C, as setas amarelo e cinza indicam o tecido adiposo subcutâneo inguinal e epididimal, respectivamente

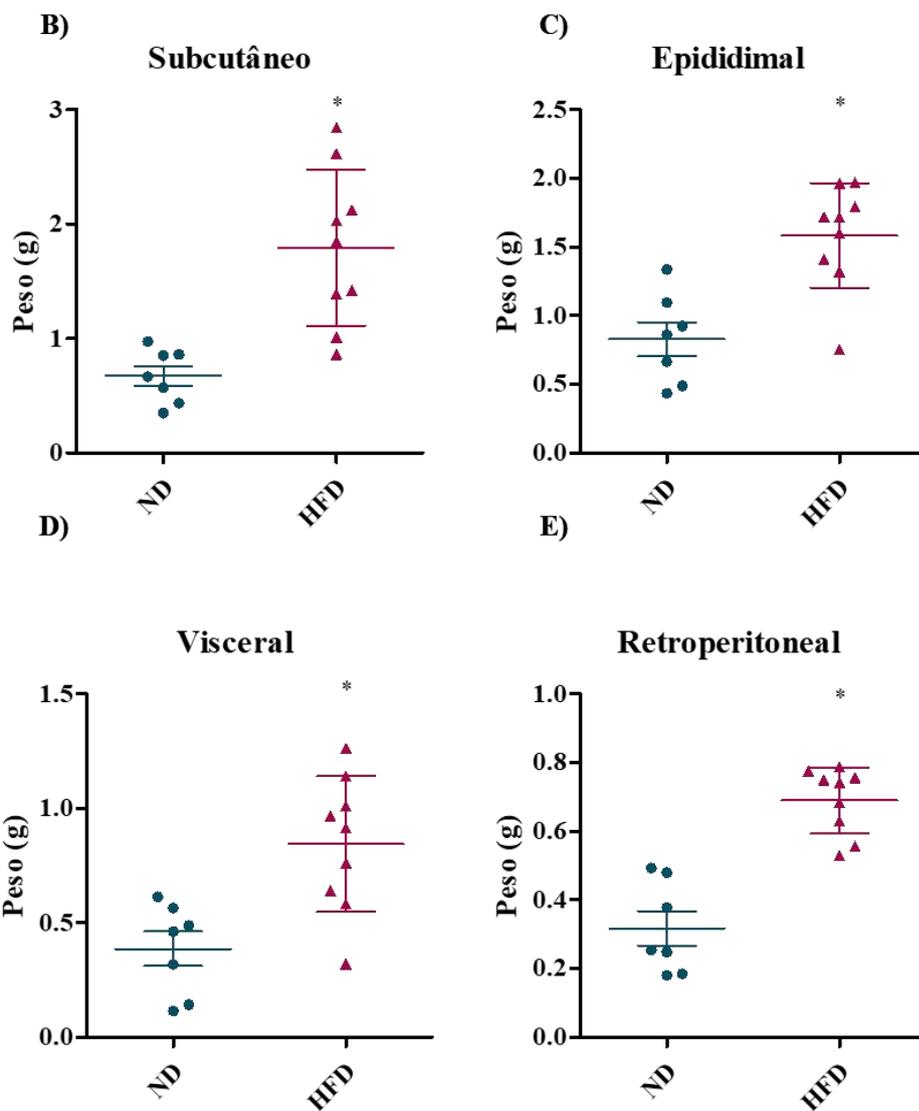
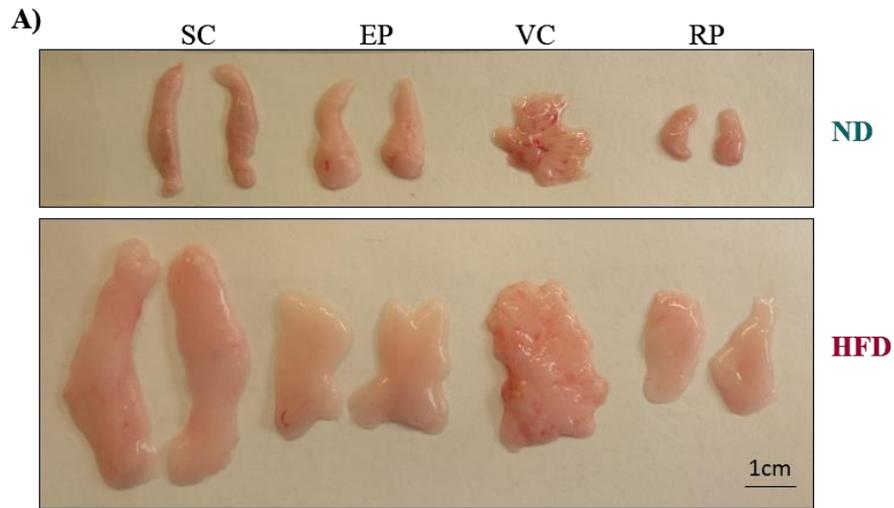


Figura 21 **Medidas de peso de diferentes depósitos de tecido adiposo branco.** Em A, observa-se diferentes depósitos de tecido adiposo branco de camundongos C57BL/6J machos submetidos à dieta controle (ND) e dieta hipercalórica (HFD). Imagens obtidas através de câmera fotográfica digital com zoom e tamanho da imagem medido através de régua de 30cm. Em B, C, D e E, encontram-se os pesos de tecido adiposo subcutâneo inguinal, epididimal, visceral e retroperitoneal respectivamente. * $p < 0,05$, teste Mann-Whitney.

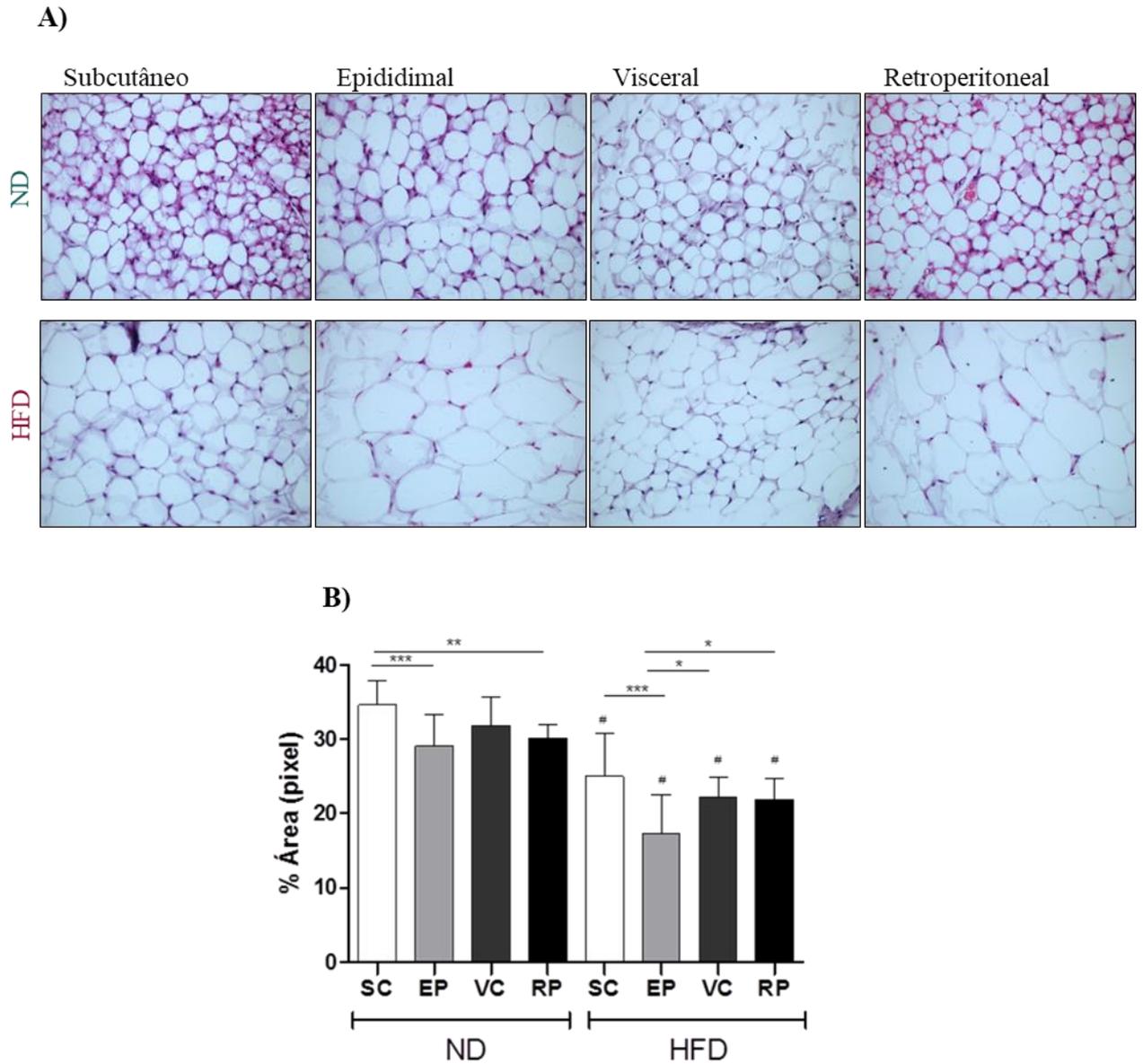


Figura 22 **Avaliação da hipertrofia de tecido adiposo.** A) Amostras de tecido adiposo subcutâneo (SC), epididimal (EP), visceral (VC) e retroperitoneal (RP) foram coradas com solução de hematoxilina-eosina. As imagens foram obtidas em microscopia convencional com mesmo aumento (40x). Todas as modificações de tamanho de imagem para montagem da figura foram feitas de forma acoplada. B) Quantificação do tamanho médio de adipócitos. Uma sequência de 5 imagens de cada amostra de tecido adiposo subcutâneo (SC), epididimal (EP), visceral (VC) e retroperitoneal (RP) de camundongos C57BL/6J sob dieta normal (ND) e dieta hiperlipídica (HFD) foi avaliada por programa *Image J* (NIH) (n=3). O tamanho médio dos adipócitos é expresso inversamente ao percentual da área de pixels.

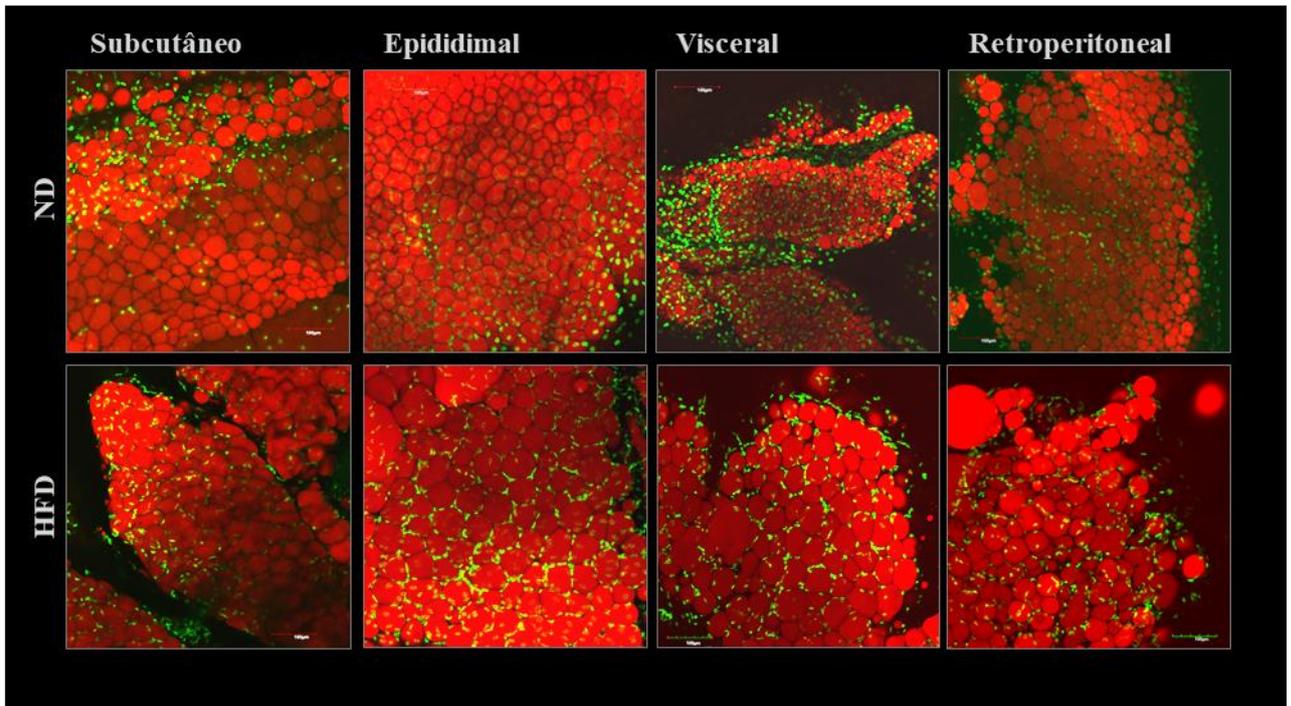
4.10 Avaliação da gota lipídica e proteínas relacionadas em tecido adiposo branco de camundongo ND x HFD

Assim como mostrado no primeiro bloco de resultados, a avaliação do tamanho de gota lipídica, assim como proteínas relacionadas ao metabolismo lipídico são importantes estratégias para avaliar a função do tecido adiposo. Deste modo, avaliar a diferença entre o tamanho dos adipócitos entre quatro depósitos de tecido adiposo de camundongo C57BL/6J e entre camundongos controle (ND) e o grupo experimental de obesidade (HFD).

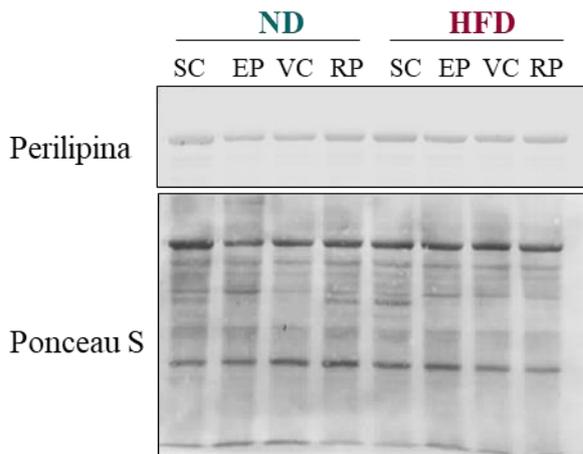
Na figura 23A, nota-se uma distinção bem mais marcante entre o tamanho das gotas lipídicas intra e intergrupo, sendo bem mais intensa, neste tipo de análise, a hipertrofia do tecido adiposo mesentérico.

Na figura 23B-C observamos a comparação da expressão de perilipina, importante proteína de gota lipídica associada à organização estrutural desta organela e metabolismo lipídico e ATGL que é a lipase da etapa limitante do processo de lipólise, respectivamente. Tal como em humanos, não há diferença da expressão de perilipina nos diferentes depósitos de tecido adiposo avaliados e este perfil se mantém mesmo após indução de obesidade mediada por dieta. Entretanto, ao contrário do observado nos tecidos adiposos em humanos, não observamos diferenças na expressão de ATGL nos depósitos de tecido adiposo branco do grupo controle e o mesmo quadro se mantém nos tecidos adiposos de oriundos de camundongos obesos.

A)



B)



C)

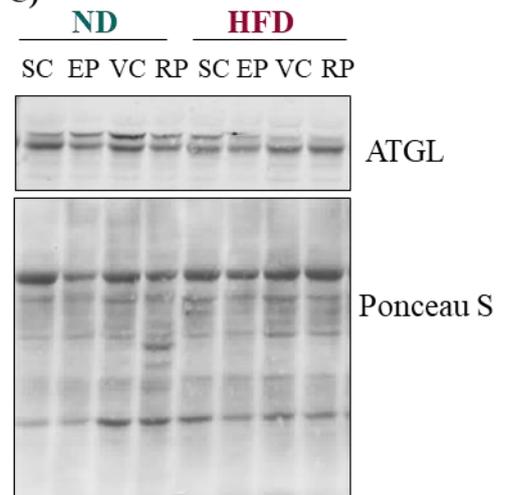


Figura 23 **Avaliação do tamanho de gota lipídica em tecido adiposo murino.** A) Fragmentos de tecido adiposo de camundongos sob dieta normolipídica (ND) e dieta hiperlipídica (HFD) foram marcados com sonda lipídica Bodipy® 493/50 (vermelho) e o núcleo das células marcado com DAPI (verde). As imagens foram capturadas por microscopia confocal e 20x de magnificação. Lisados proteicos de tecido adiposo branco subcutâneo (SC), epididimal (EP), visceral (VC) e retroperitoneal (RP) de camundongo sob dieta normal (ND) e dieta hiperlipídica (HFD) foram submetidos a análise por *Western blot* para perilipina (imagem representativa de 3 experimentos) (B) e ATGL(C). Ponceau S foi utilizado como controle de carregamento.

4.11 Inflamação em diferentes depósitos de tecido adiposo branco em camundongos ND *versus* HFD

Como descrito anteriormente, PPAR γ é um fator de transcrição extremamente importante na adipogênese assim como na manutenção da célula adiposa madura, além de ser ponto chave na regulação da produção/inibição de diversas citocinas. Na figura 24, verifica-se a diminuição do nível de PPAR γ 1 nos depósitos de tecido adiposo de camundongos HFD. Além deste fato curioso, podemos observar que mesmo nos camundongos sob ingesta de dieta normal, ocorre variação desta isoforma em relação aos distintos depósitos de tecido adiposo, embora mais discreta do que a observada nos camundongos HFD. Em relação à expressão da isoforma PPAR γ 2, não observamos diferenças significativas entre os diferentes depósitos de tecido adiposo branco, embora note-se uma maior variabilidade nos tecidos de camundongos obesos.

O papel do PPAR γ na regulação da resposta inflamatória através da supressão de NF- κ B já é bem descrito na literatura. Através desta via, ocorre diminuição de TNF- α mediada por PPAR γ . Então, com a finalidade de observar se isso era observado nas amostras de tecido adiposo de camundongo *high fat diet* que têm diminuição desta proteína, realizamos ensaio de imunodeteção para TNF- α . Foi possível observar tal fenômeno em apenas um de dois experimentos realizados com camundongos ND *versus* HFD, na análise desta citocina por *Western blot*. A primeira imagem na figura 25 é referente também à imagem da análise de PPAR γ por *Western blot*, sendo assim, foi possível verificar esta correlação entre PPAR γ e TNF α . Porém, de forma interessante, este fenômeno não foi verdade para a amostra de tecido adiposo subcutâneo do animal HFD. Na quantificação de TNF- α por ELISA, em outro conjunto de amostras, não observamos diferença nos níveis desta citocina quando comparamos os grupos ND e HFD.

Conforme descrito na seção 4.6 deste trabalho, leptina, adiponectina e MCP-1/CCL2 são importantes adipocinas secretadas pelo tecido adiposo e que apresentam níveis elevados em quadro de obesidade. Na análise destas citocinas em WAT de camundongos ND *versus* HFD (figura 26), não observamos diferenças entre os distintos depósitos gordurosos, entretanto, nota-se tendência para maior presença de leptina em todos os depósitos de tecido adiposo branco nos camundongos HFD, exceto o tecido visceral (figura 26A). O mesmo se observa na análise de MCP-1/CCL2, onde os depósitos EP e RP de camundongos obesos parecem apresentar tendência para níveis superiores aos depósitos oriundos de camundongos ND (figura 26D).

A leptina sintetizada por adipócitos sinaliza autocrinamente nestas células através de receptores LEPR. Então com o objetivo de avaliar se o aumento excessivo de leptina circulante na obesidade, leva também a um prejuízo na sinalização deste hormônio no tecido adiposo,

avaliamos em camundongo submetidos à dieta hiperlipídica a expressão desta proteína nos quatros depósitos de tecido adiposo em estudo. Resultados preliminares da análise de receptor de leptina mostram que ocorre supressão total de LEPR nos tecidos SC, EP e VC, o que não foi observado no tecido adiposo retroperitoneal figura (26B).

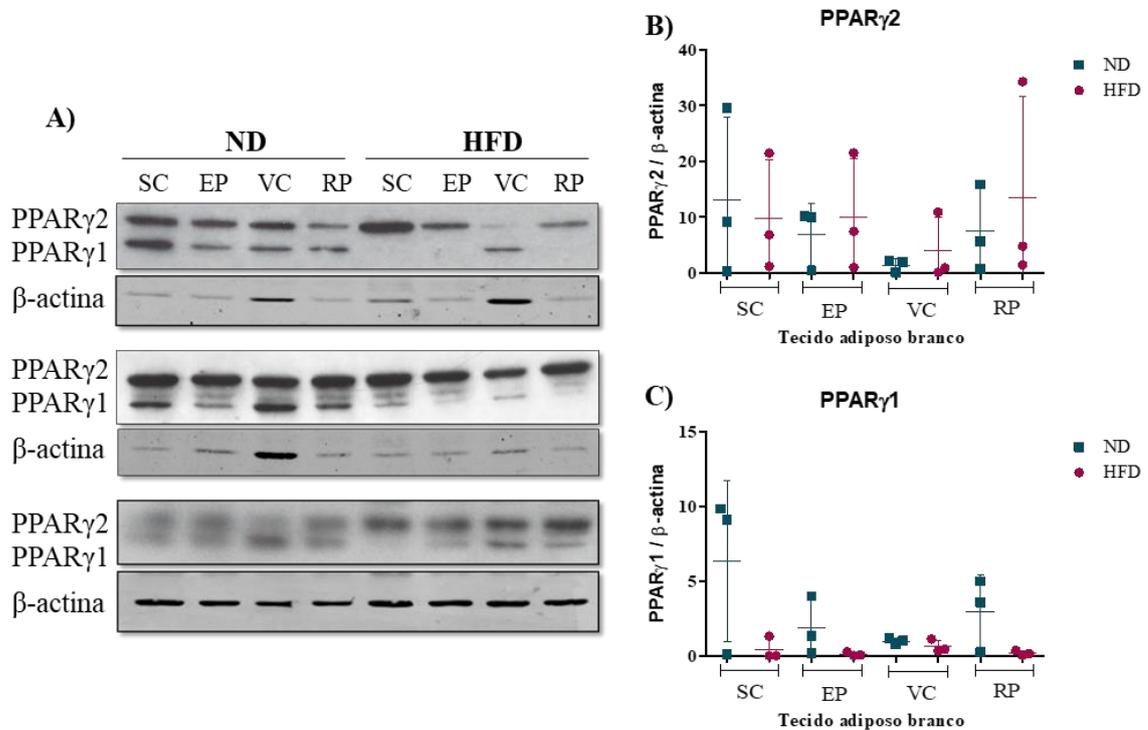


Figura 24 **Comparação da expressão de PPAR γ em diferentes depósitos de tecido adiposo.** Lisados proteicos de tecido adiposo branco subcutâneo (SC), epididimal (EP), visceral (VC) e retroperitoneal (RP) de camundongo sob dieta normal (ND) e dieta hiperlipídica (HFD) foram submetidos a análise por *Western blot* para PPAR γ . (A) Comparação de PPAR γ 2 (58kDa) e PPAR γ 1 (55kDa) em amostras de tecido adiposo de camundongo ND versus HFD. Gráficos da análise densitométrica das duas isoformas de PPAR γ (B e C). β -actina foi utilizada como controle de carregamento de proteínas (n=3).

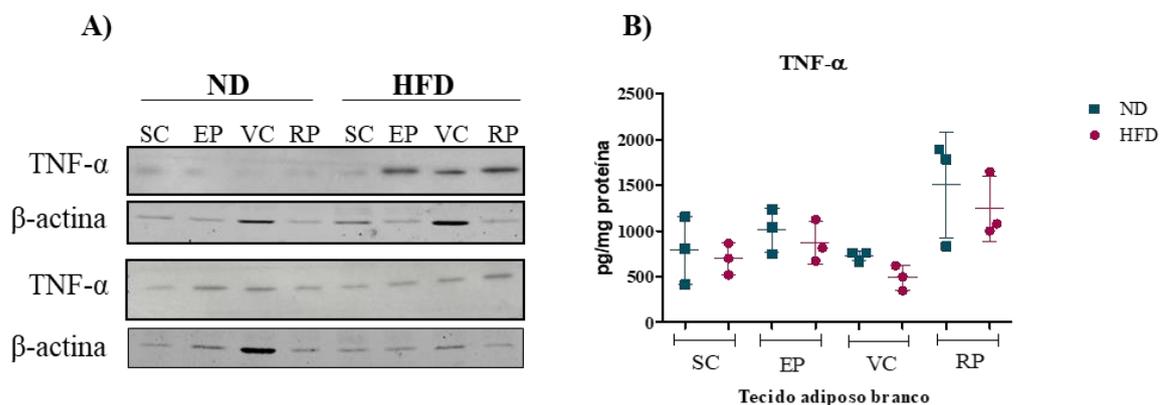


Figura 25 **Comparação da expressão de TNF- α em diferentes depósitos de tecido adiposo.** Lisados proteicos de tecido adiposo branco subcutâneo (SC), epididimal (EP), visceral (VC) e retroperitoneal (RP) de camundongo sob dieta normal (ND) e dieta hiperlipídica (HFD) foram submetidos a análise por *Western blot* (A) (n=2) e ensaio imunoenzimático (B, n=3) para TNF- α .

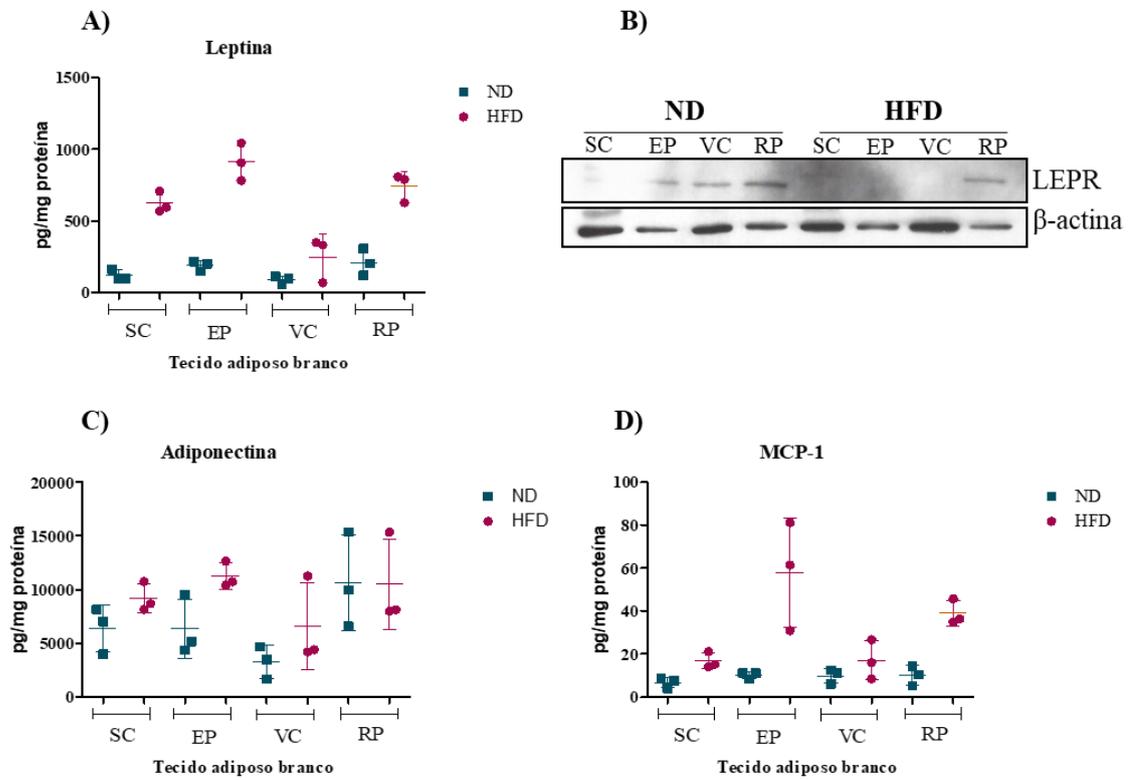


Figura 26 **Quantificação de adipocinas em lisado de tecido adiposo.** Lisados proteicos de tecido adiposo branco subcutâneo (SC), epididimal (EP), visceral (VC) e retroperitoneal (RP) de camundongo sob dieta normal (ND) e dieta hiperlipídica (HFD) foram submetidos à análise por ELISA para avaliação de leptina, adiponectina e MCP-1/CCL2 (A, C e D) (n=3). Em B, observa-se avaliação do receptor de leptina em amostras de tecido adiposo branco de camundongos ND *versus* HFD (n=1).

4.12 Comparação da contribuição de adipócitos e da fração estromal vascular para o quadro inflamatório crônico presente na obesidade

A diferença na secreção de leptina entre tecido adiposo subcutâneo e o omento em humanos já foi largamente descrita na literatura (Van Harmelen et al. 1998; Gottschling-zeller et al. 1999; Tchkonina et al. 2013). Entretanto, a comparação dos diferentes depósitos de tecido adiposo branco em camundongos, assim como a avaliação da contribuição de cada fração do deste órgão ainda precisa ser mais bem estudada. Para isso, avaliamos a secreção de leptina em sobrenadante de cultura de adipócitos maduros primários e sobrenadante de adipócitos diferenciados *in vitro*. Na figura 27A, ao compararmos a secreção de leptina entre os tecidos do grupo ND, observamos que o depósito SC difere apenas do tecido VC ($p < 0,05$). Já no grupo HFD, ocorre mudança deste perfil, onde o adipócito do tecido EP secreta maior quantidade deste hormônio quando comparado ao tecido visceral ($p < 0,05$). Avaliamos também se adipócitos de cada depósito de tecido adiposo branco variava na condição de dieta normolipídica e *high-fat diet*. Verificamos que os adipócitos dos depósitos epididimal e retroperitoneal apresentam maior secreção de leptina quando o camundongo está sob dieta hiperlipídica ($p < 0,05$) (figura 27A).

Avaliamos também se o mesmo perfil descrito acima se repetia quando pré-adipócitos da fração estromal vascular fossem colocados em diferenciação *in vitro*. Podemos observar no gráfico C da figura 27, que não há diferença significativa na secreção deste hormônio em células oriundas de diferentes depósitos de tecido adiposo de camundongos submetidos às dietas normolipídica ou hiperlipídica. Adipócitos diferenciados *in vitro* de tecido adiposo SC e RP apresentam secreção de adiponectina em níveis semelhantes, enquanto as células derivadas de tecido adiposo VC apresentam discreta produção desta adipocina (figura 27D). De maneira interessante, adipócitos diferenciados *in vitro* de tecido adiposo EP de camundongo controle não produzem adiponectina em níveis detectáveis no ensaio utilizado (figura 27D).

No intuito de investigar se a diferença observada no gráfico A era em decorrência da quantidade de leptina produzida ou apenas da diferença no processo secretório dos adipócitos, avaliamos os lisados proteicos dos adipócitos maduros primários. Na figura 27B, apenas o tecido adiposo subcutâneo apresenta uma possível diferença na quantidade de leptina retida nos adipócitos ($p < 0,057$). Todas as outras células oriundas de tecido EP, VC e RP não diferem neste parâmetro.

Na avaliação do sobrenadante da fração estromal vascular enriquecida em pré-adipócitos os níveis de leptina ficaram abaixo do nível de detecção.

O aumento de MCP-1/CCL2 plasmático em consequência de dieta hiperlipídica já foi reportado em diversos estudos (Kanda et al. 2006), entretanto a maior parte destes estudos são realizados em modelos *in vitro* de obesidade, com células 3t3-L1 (Fasshauer et al. 2004). Desta forma, a investigação da contribuição de cada fração do tecido adiposo torna-se essencial para o quadro caracterização do quadro inflamatório em relação à esta adipocina.

Fomos investigar a contribuição de adipócitos maduros primários, fração estromal vascular enriquecida em pré-adipócitos e em adipócitos diferenciados *in vitro*, na secreção de MCP-1/CCL2. Na figura 28A, comparamos a secreção de MCP-1/CCL2 entre de adipócitos oriundos de depósitos de tecido adiposo de camundongos sob dieta normolipídica, de depósitos de tecido adiposo de camundongos HFD e entre os dois grupos. Em adipócitos maduros de camundongos ND, observamos que os adipócitos oriundos do tecido adiposo EP secretam maior quantidade de MCP-1/CCL2 quando comparados ao tecido visceral. Não observamos diferenças no sobrenadante dos adipócitos de camundongos HFD. Na comparação intergrupos, adipócitos de tecido adiposo epididimal de camundongos HFD secretam maior quantidade de MCP-1/CCL2 em comparação à dieta normolipídica.

A contribuição da fração estromal vascular enriquecida em pré-adipócitos foi avaliada na figura 28C, embora não tenhamos observado diferença entre os depósitos de camundongo ND, de camundongos HFD, a fração estromal vascular do tecido adiposo epididimal de camundongos sob dieta *high-fat* apresenta maior secreção de MCP-1/CCL2 do que a FSV do tecido epididimal de camundongos ND ($p < 0,057$).

Na diferenciação de adipócitos *in vitro* (figura 28B) as células de tecido adiposo subcutâneo HFD secretaram maior quantidade de MCP-1/CCL2 quando comparados à células do tecido adiposo retroperitoneal HFD ($p < 0,05$). Nenhuma diferença foi observada em relação à secreção desta quimiocina entre os dois grupos dieta

Na avaliação de TNF- α em adipócitos maduros oriundos de tecido adiposo ND e HFD, não observamos diferenças estatisticamente significativas entre os grupos e intragrupos. Em sobrenadantes de cultura de FSV enriquecida em pré-adipócitos e de adipócitos diferenciados *in vitro*, TNF- α ficou abaixo do nível de detecção do ensaio (figura 29A). Em relação à interleucina-6, adipócitos diferenciados *in vitro* oriundos de tecido adiposo retroperitoneal de grupo controle de camundongo C57B/16 secretam menor quantidade desta citocina quando comparado ao SC, EP e VC (figura 29B).

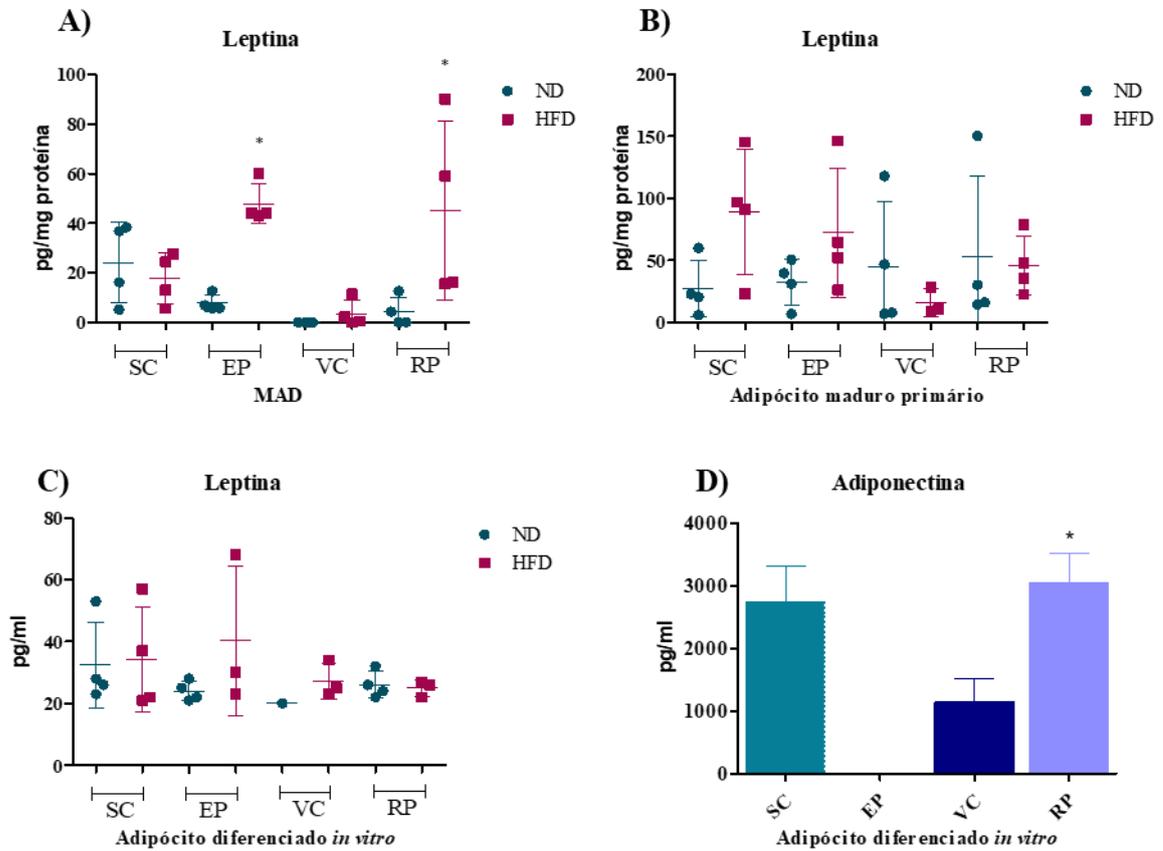


Figura 27 **Leptina em adipócitos e fração estromal vascular.** Sobrenadante de cultura de 24h de adipócitos maduros primários - MAD (A), sobrenadantes de cultura de 10 dias de adipócitos diferenciados *in vitro* (B) e lisado proteico de adipócitos maduros primários (C) de tecido de adiposo subcutâneo (SC), epididimal (EP), visceral (VC) e retroperitoneal (RP) de camundongos C57B/16 sob dieta ND x HFD (n=4). Em D, observa-se avaliação de adiponectina em cultura de 14 dias de diferenciação *in vitro* de células derivadas de camundongo controle por meio de ELISA (n=1 com triplicata técnica). * para $p < 0,05$.

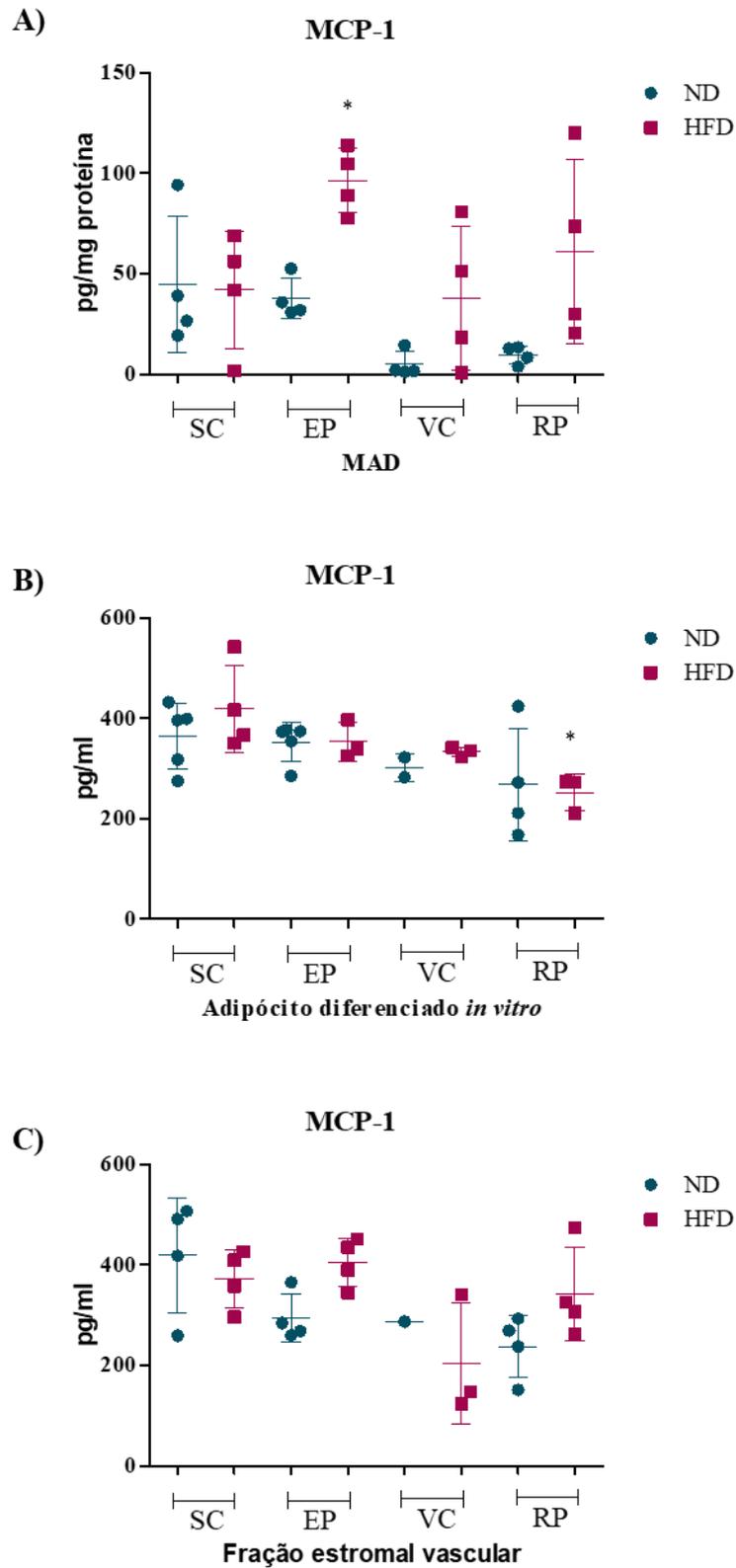


Figura 28 **MCP-1/CCL2 em adipócitos e fração estromal vascular.** Sobrenadante de cultura de 24h de adipócitos maduros primários - MAD (A), sobrenadantes de cultura de 10 dias de adipócitos diferenciados *in vitro* (B) e sobrenadantes de cultura da fração estromal vascular enriquecida em pré-adipócitos (C) de tecido de adiposo subcutâneo (SC), epididimal (EP), visceral (VC) e retroperitoneal (RP) de camundongos C57B/16 sob dieta ND x HFD (n=4). * para $p < 0,05$.

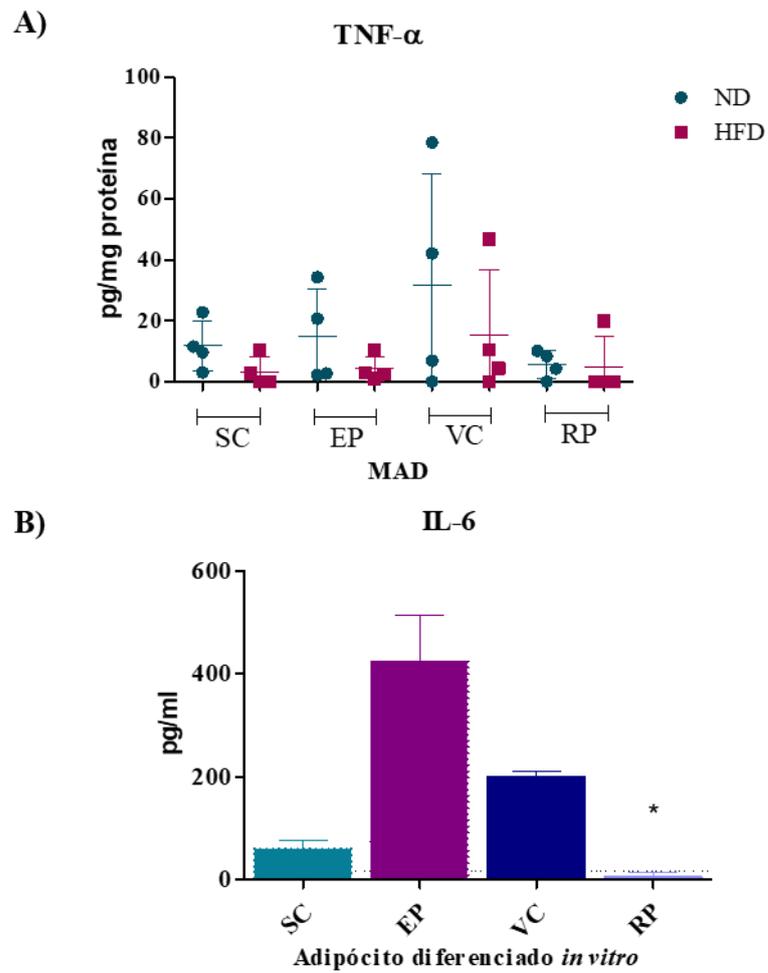


Figura 29 **Citocinas em adipócitos primários e diferenciados *in vitro***. Sobrenadante de cultura de 24h de adipócitos maduros primários – MAD de tecido de adiposo subcutâneo (SC), epididimal (EP), visceral (VC) e retroperitoneal (RP) de camundongos C57B/16 sob dieta ND x HFD (n=4) e sobrenadantes de cultura de adipócitos diferenciados *in vitro* (B) de camundongos ND (n=1). * para p<0,05.

4.13 Análise da modulação de macrófagos por adipócitos e pré-adipócitos de distintos depósitos de tecido adiposo de camundongos ND *versus* HFD

Corpúsculos lipídicos (CL) ou gotas lipídicas são organelas presentes em praticamente todo tipo de célula (Murphy 2001). No estado de repouso, estas organelas estão presentes em pequeno número em células do sistema imune. Entretanto, diferentes tipos de estímulos e patologias levam a um rápido aumento no número e tamanho de corpúsculos lipídicos em leucócitos. Assim, o aumento de CL em leucócitos está frequentemente associado a processos infecciosos e inflamatórios e consequentemente, à ativação destas células (Bozza et al. 2009). No quadro de obesidade, o tecido adiposo branco apresenta um infiltrado leucocitário importante e macrófagos constituem a maioria destas células, apresentando majoritariamente um perfil inflamatório (Curat et al. 2006; Yu et al. 2006; Prieur et al. 2011).

Com o intuito de avaliar se haveria diferentes níveis de ativação destas células mediado por adipócitos oriundos de diferentes depósitos de tecido adiposo, macrófagos derivados de medula óssea foram estimulados com meio condicionado de adipócitos de camundongo C57B/16 sob dieta normolipídica. Na figura 30A, observamos aumento de corpúsculos lipídicos marcados com *Oil Red O* em macrófagos estimulados com meio condicionado de adipócitos isolados do tecido adiposo visceral quando comparados ao estímulo com MAD de tecido subcutâneo e epididimal, embora este aumento não tenha sido significativo após a quantificação de pixels por meio do software *Image J* (figura 30B).

Fomos então observar se este padrão se mantinha ao analisarmos a formação de corpúsculos lipídicos por meio da expressão da proteína ADRP em macrófagos estimulados com MAD de camundongos ND e HFD. Na figura 30C, está representado *Western blot* para proteína ADRP (n=4). Embora haja uma variabilidade importante nos diferentes ensaios, o MAD de tecido SC de camundongo ND parece tender à uma maior expressão de ADRP do que o MAD de tecido SC de camundongo HFD, assim como em comparação com os outros tecidos.

A modulação de macrófagos para um perfil mais pró-inflamatório (M1) ou anti-inflamatório (M2), através dos meios condicionados de adipócitos maduros oriundos de diferentes depósitos de tecido adiposo também nos despertou interesse. Assim, fomos investigar esta modulação através da expressão de arginase (perfil M2) e iNOS (perfil M1). Na figura 30D e 30F, podemos observar que não há diferença da expressão de arginase nos macrófagos estimulados com MAD de camundongos ND X HFD. Não foi possível detectar expressão de iNOS neste ensaio. Ao estimularmos macrófagos derivados de medula com o meio condicionado de adipócitos maduros de diferentes depósitos de tecido adiposo de camundongos controle e camundongos sob dieta hiperlipídica, observamos aumento da secreção de MCP-

1/CCL2 apenas na comparação entre o estímulo com MAD de tecido adiposo epididimal ND e HFD (figura 31A). Não observamos diferenças no perfil de secreção de TNF- α de macrófagos estimulados com diferentes MAD de camundongos ND e/ou HFD (figura 31B). Na comparação entre a modulação de macrófagos pela fração estromal vascular enriquecida de pré-adipócitos de diferentes depósitos de tecido adiposo de camundongos controle, pudemos verificar que o meio condicionado de FSV de tecido adiposo VC induz uma maior secreção de MCP-1/CCL2 por macrófagos quando comparados as células dos outros tecidos (figura 31C).

Em quadro de obesidade, assim como outras citocinas, os níveis de interleucina 6 também estão aumentados. Estudos realizados com explante de tecido humano demonstraram que o tecido visceral secreta maior quantidade de IL-6 (Fain et al. 2004). Embora adipócitos maduros sejam capazes de secretar IL-6, eles não são os únicos tipos celulares no tecido adiposo que contribuem para o aumento dos níveis desta citocina no quadro de obesidade. A fração estromal vascular do tecido adiposo é constituída por uma variedade de células tais como fibroblastos, pré-adipócitos, células tronco-mesenquimais e leucócitos. Na avaliação da modulação de macrófagos por meio condicionado de FSV enriquecida em pré-adipócitos, observamos que o meio de células derivadas do tecido adiposo epididimal induziu um grande aumento na secreção de IL-6 por macrófagos quando comparados ao tecido SC e também quando comparamos com os outros depósitos de tecido adiposo viscerais (intraperitoneais) (figura 31D).

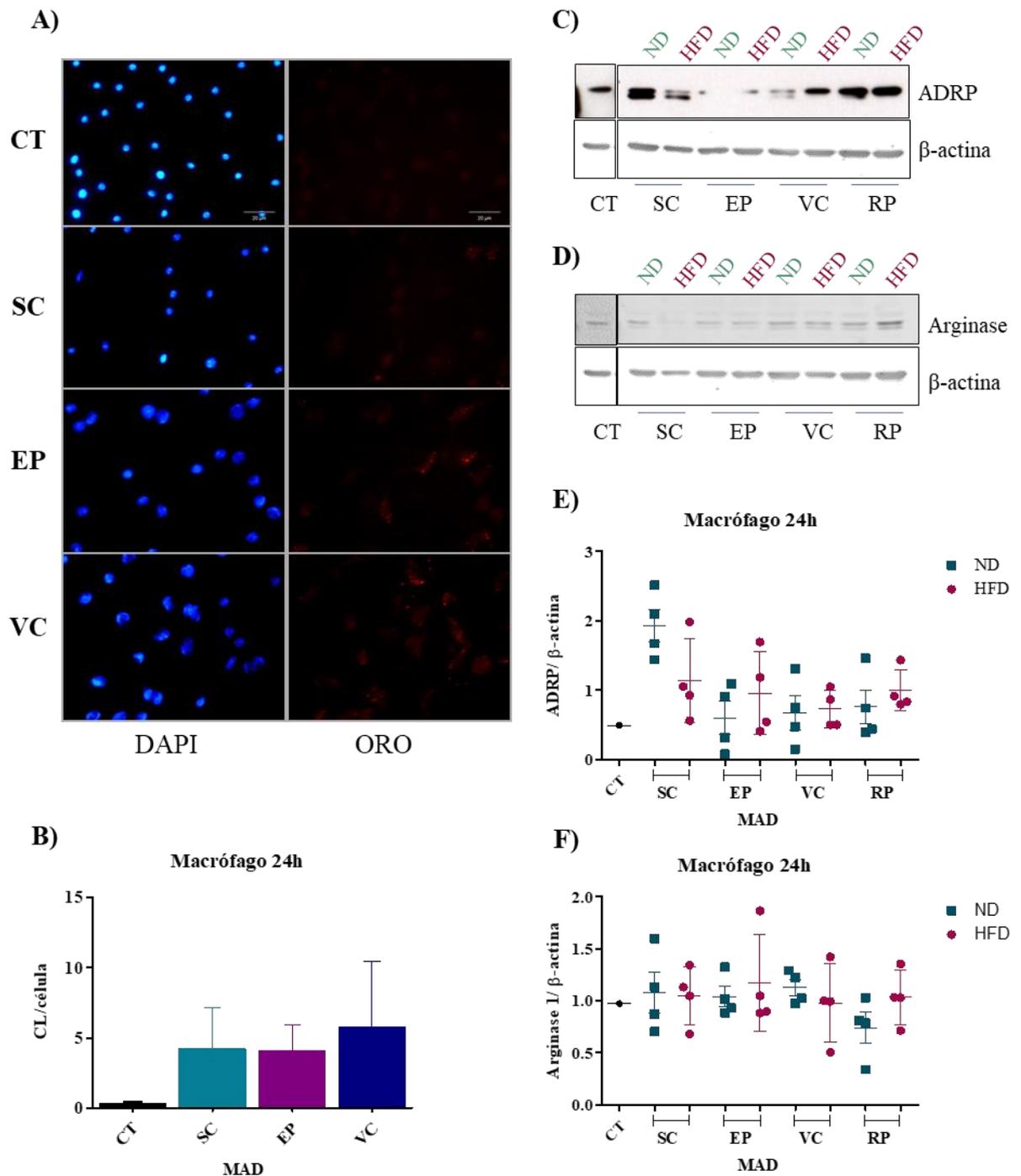


Figura 30 **Formação de corpúsculos lipídicos por meio condicionado de adipócitos.** A) Macrófagos estimulados com meio condicionado de adipócitos maduros primários de tecido adiposo subcutâneo (SC), epididimal (EP) e visceral (VC) de camundongo C57B/16 ND. CT entende-se por macrófagos que receberam apenas o meio de cultivo de adipócitos maduros. Nas imagens, o núcleo foi marcado com DAPI (azul) e os corpúsculos lipídicos (CL) foram marcados com Oil Red O (ORO) em vermelho. Em B observa-se quantificação de CL pelo software *Image J* (n=1, com triplicata técnica). Em C e D observa-se *Western blot* para ADRP e Arginase de cultura de macrófagos de medula estimulados com meio condicionado de adipócitos maduros de diferentes depósitos de tecido adiposo de camundongo ND x HFD (imagens representativas, n=4).

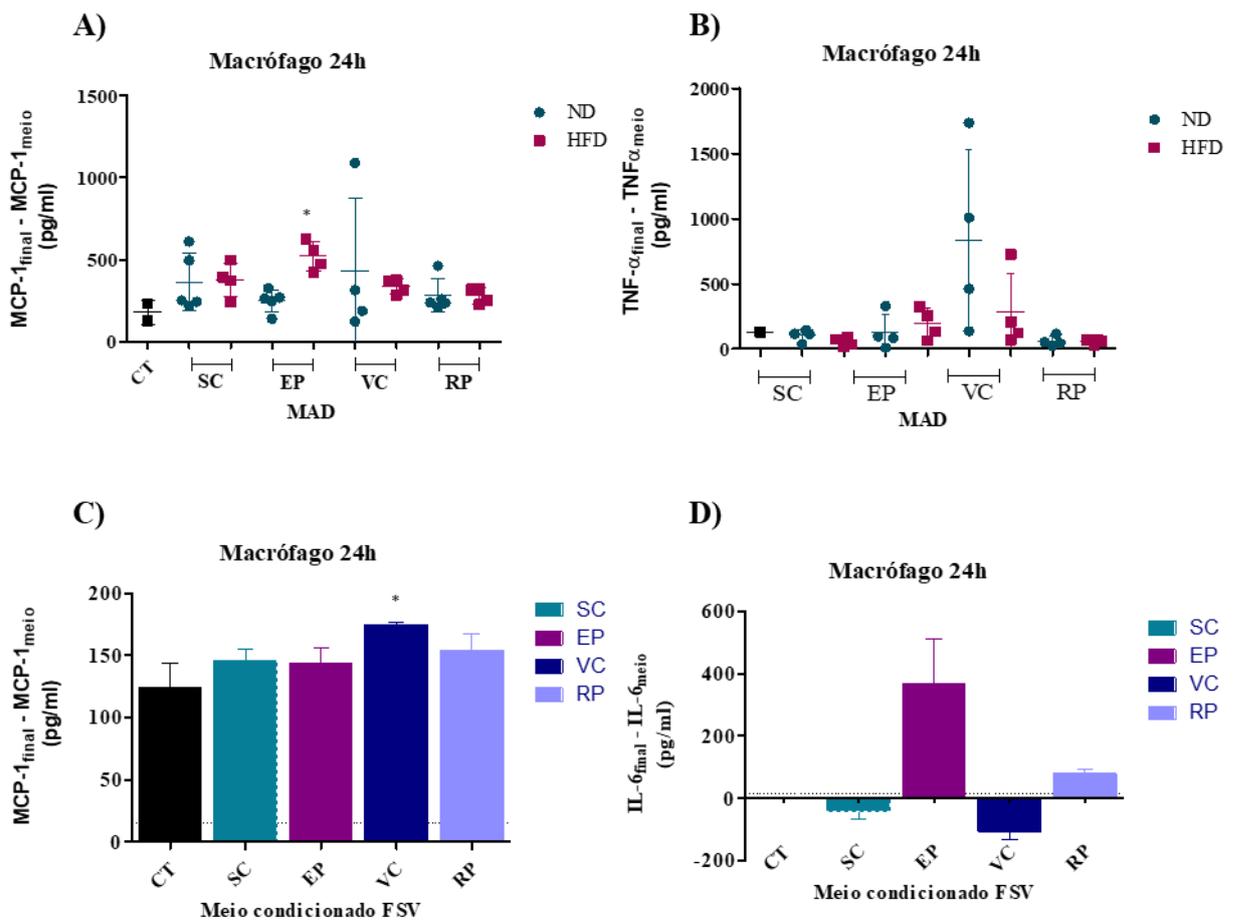


Figura 31 **Perfil de secreção de citocinas por macrófagos estimulados com MAD e meio condicionado de FSV.** Observa-se em A e B a avaliação do sobrenadante da cultura de 24h de macrófagos estimulados com meio condicionado de adipócitos maduros oriundos de tecido adiposo subcutâneo (SC), epididimal (EP), visceral (VC) e retroperitoneal (RP) de camundongos ND e HFD por meio de ensaio imunoenzimático para MCP-1/CCL2 e TNF- α (n=4). Em C e D, estão representados gráficos da análise do sobrenadante da cultura de 24h de macrófagos estimulados com meio condicionado da fração estromal vascular (FSV) de tecido adiposo SC, EP, VC e RP de camundongos controle (n=1, com triplicata técnica). * para p<0,05.

4.14 Avaliação da capacidade adipogênica de pré-adipócitos derivados de diferentes depósitos de tecido adiposo em camundongos ND x HFD

A hipertrofia do tecido adiposo e o processo de disfunção tecidual estão intimamente ligados e diretamente relacionados ao desenvolvimento de síndrome metabólica na obesidade.

Sabe-se que o processo de hipertrofia e hiperplasia de tecido adiposo branco ocorre após desafio com dieta *high-fat*, contribuindo para a expansão deste órgão (Sambasivarao 2013). Entretanto este processo não ocorre de maneira semelhante para todos os depósitos de tecido adiposo. A maior parte dos estudos em adipogênese estabelece comparações entre o tecido adiposo subcutâneo inguinal e tecido adiposo epididimal, este último utilizado como representante de tecido adiposo visceral. Porém, no decorrer do desenvolvimento do quadro de obesidade há expansão de outros depósitos de tecido adiposo que contribuem também para as alterações metabólicas presentes em obesos, conforme exemplificado nos resultados acima.

Assim, fomos investigar a capacidade adipogênica entre o tecido adiposo subcutâneo e três diferentes depósitos de tecido adiposo intraperitoneal (EP, VC e RP) tanto em camundongos controle quanto em camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica.

Pudemos verificar como demonstrado na figura 32 que as células derivadas de tecido adiposo de camundongo sob dieta normolipídica tem maior capacidade adipogênica do que as células derivadas de tecido adiposo de camundongos obesos. Na figura 32A, observamos um grande acúmulo de gotas lipídicas nas células derivadas de tecido adiposo SC ND quando comparados ao tecido adiposo SC HFD, ou comparado com os outros depósitos de tecido adiposo. O tecido retroperitoneal apresenta-se em segundo lugar na capacidade adipogênica e também foi possível observar diferenças entre camundongos ND x HFD. As células derivadas de tecido adiposo EP ND apresentam discreto acúmulo de lipídios, enquanto o mesmo não pode ser observado nas células de tecido adiposo EP HFD. Nenhum potencial adipogênico pode ser observado nos pré-adipócitos derivados tanto de tecido adiposo de camundongo ND quanto de camundongos obesos. Na avaliação da expressão de perilipina, demonstrado na figura 32B, o mesmo perfil pode ser observado.

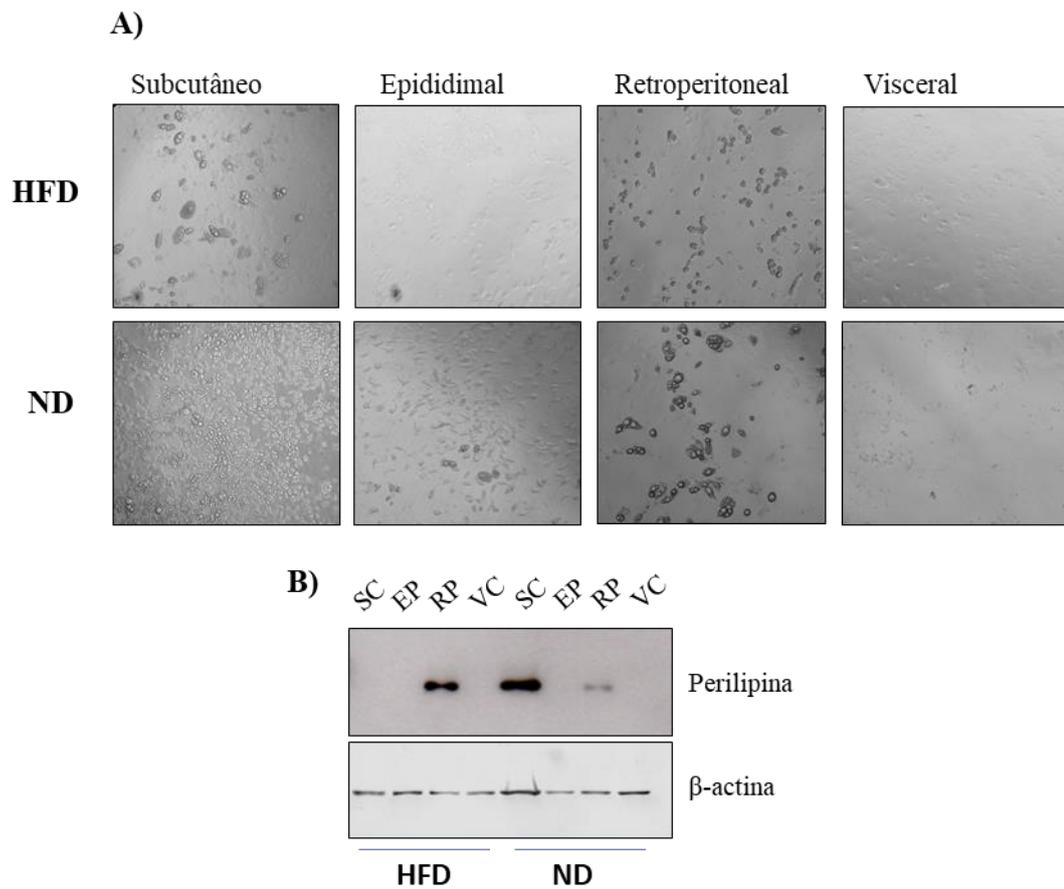


Figura 32 **Avaliação do potencial adipogênico.** Em A, células provenientes de diferentes depósitos de tecido adiposo branco – subcutâneo (SC), epididimal (EP), visceral (VC) e retroperitoneal (RP) de camundongos ND e HFD foram induzidas à diferenciação adipogênica. Imagens obtidas através de câmera digital com objetiva de 10x de magnificação em microscópio óptico no 10 dia após indução adipogênica. Em B observa-se *Western blot* para perilipina na cultura de adipócitos diferenciados *in vitro*.

4.15 Quadro de resumo de resultados

Tabela 11 Comparação das características de tecido adiposo humano e murino

Variável	Humano	Camundongo obeso
<i>Tamanho do adipócito</i>	Igual	Maior em EP
<i>Proteínas de gota lipídica</i>	Perilipina e PLIN1 mRNA igualmente expressos em SC, PP e VC.	Igual em perilipina
<i>Lipases envolvidas no processo de lipólise</i>	HSL igualmente expressos em SC, PP e VC.	Igualmente expresso em todos os WAT
	Maior expressão de ATGL no PP	Igualmente expresso em todos os WAT
<i>Adipocinas em WAT</i>	Leptina maior em SC vs. VC	Leptina igual em todos os tecidos
	Adiponectina maior em VC	Adiponectina igual em todos os tecidos
	MCP-1/CCL2 maior em PP vs. VC	MCP-1/CCL2 igual em todos os tecidos
	TNF- α igual em todos os tecidos	TNF- α igual em todos os tecidos

Tabela 12 Comparação das características de tecido adiposo de camundongo ND versus HFD

Variável	Camundongo ND	Camundongo HFD
<i>Peso do tecido (g)</i>	SC=EP.>VC > RP	SC=EP.>VC = RP
<i>Tamanho do adipócito</i>	Menor em SC	Maior em EP
	EP=VC=RP	SC=VC=RP
<i>Proteínas de gota lipídica</i>	Igual em perilipina	Igual em perilipina
<i>Lipases envolvidas no processo de lipólise</i>	Igual em ATGL	Igual em ATGL
<i>Adipocinas em WAT</i>	Leptina igual em todos os tecidos	Maior que ND.
		Leptina igual em todos os tecidos
	Adiponectina igual em todos os tecidos	ND = HFD
		Adiponectina igual em todos os tecidos
	MCP-1/CCL2 igual em todos os tecidos	Maior que ND.
		MCP-1/CCL2 igual em todos os tecidos
TNF- α igual em todos os tecidos	ND = HFD	
	TNF- α igual em todos os tecidos	

Tabela 13 Comparação entre adipócitos e FSV em camundongos ND *versus* HFD

Variável	Camundongo ND	Camundongo HFD
<i>Adipócitos maduros</i>		Maior que ND em EP e RP
	Leptina maior em SC vs. VC	Leptina maior em EP vs. VC
		Maior que ND em EP e RP
	MCP-1/CCL2 maior em EP vs. VC	MCP-1/CCL2 maior em EP vs. VC
		ND = HFD
	TNF- α igual em todos os tecidos	TNF- α igual em todos os tecidos
Modulação de Macrófagos		
<i>ADRP</i>	Inconclusivo	Inconclusivo
<i>Perfil M1 (iNOS)</i>	Sem marcação	Sem marcação
<i>Perfil M2 (arginase 1)</i>	Igual em todos os tecidos	Igual ao ND
<i>MCP-1/CCL2</i>	Igual em todos os tecidos	Maior em EP (MAD)
<i>TNF-α</i>	Igual em todos os tecidos	Igual em todos os tecidos
<i>Adipócitos diferenciados in vitro</i>		Maior que ND
	Adiponectina igual em todos os tecidos	Adiponectina maior em RP vs. VC
		ND = HFD
	Leptina igual em todos os tecidos	Leptina igual em todos os tecidos
		Maior que ND
	MCP-1/CCL2 igual em todos os tecidos	MCP-1/CCL2 igual em todos os tecidos
<i>Adipocinas -FSV</i>	Adiponectina maior em RP	
	MCP-1/CCL2 igual em todos os tecidos	ND = HFD MCP-1/CCL2 igual em todos os tecidos
	IL-6 menor em RP	
<i>Capacidade adipogênica</i>		Menor que ND
	SC > RP > EP = VC	SC > RP > EP = VC

5 DISCUSSÃO

Obesidade é uma doença com grande impacto no sistema público de saúde. Ainda que o número de indivíduos obesos tenha aumentado de maneira preocupante nas últimas décadas, pode-se dizer que esta doença ainda tem sido tratada negligentemente. Obesidade é uma doença de caráter complexo, com dimensões sociais e psicológicas sérias e que atinge virtualmente todas as idades e grupos socioeconômicos, abrangendo países desenvolvidos e em desenvolvimento (WHO 2008).

O crescimento do número de indivíduos obesos deve-se ao aumento da ingesta calórica e redução do gasto energético. Este conseqüente aumento da massa de tecido adiposo tem sido correlacionado com o desenvolvimento de diversas outras co-morbidades, principalmente diabetes *Mellitus* tipo II, doenças cardiovasculares e câncer, aumentando o risco de morte prematura e maior mortalidade por todas as causas. Esta associação deve-se ao fato de que indivíduos obesos comumente apresentam de um quadro moderado de inflamação crônica e que esta inflamação leva a um crescente infiltrado de macrófagos e outras células do sistema imune no tecido adiposo. Assim como as células do sistema imune, os adipócitos e pré-adipócitos são capazes de secretar uma variedade de moléculas pró e anti-inflamatórias que atuam de forma parácrina e sistêmica, contribuindo para as alterações clínicas presentes no obeso (Harford et al. 2011).

Entretanto, observa-se que nem todos os indivíduos obesos estão com o risco aumentado de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Wildman et al. 2008). Essa observação levou ao surgimento do termo “obesidade saudável” ou MHO, do inglês *metabolically healthy obesity*. O termo obesidade saudável descreveria um fenótipo onde o indivíduo obeso não apresenta anormalidades metabólicas, como por exemplo resistência à insulina, dislipidemia, hipertensão e/ou um perfil inflamatório desfavorável (Phillips 2013).

Embora a menção a existência de fenótipos metabólicos saudáveis ou não-saudáveis em indivíduos obesos tenha sido feita desde da década de 90 (Ruderman et al. 1998), ainda não há o estabelecimento de quais critérios levados em consideração para definição do fenótipo MHO. Diversos estudos vêm sendo realizados para avaliação do fenótipo MHO, entretanto diferenças no desenho do estudo como tamanho da coorte, idade, etnia, assim como a adoção de discrepante de critérios de inclusão ou corte (resistência à insulina, pressão sanguínea e glicemia, mediadores inflamatórios, cintura pélvica e IMC) tem sido um dificultador na comparação entre estes estudos (Phillips 2013).

A avaliação de mediadores inflamatórios tem despertado interesse no que consta a definição de MHO. Marques-Vidal e colaboradores mostraram em recente estudo que pacientes obesos com o perfil metabolicamente saudável apresentavam níveis plasmáticos baixos de

interleucina-6 e TNF- α , assim como uma diminuição de na dosagem de proteína C reativa quando comparados à indivíduos com o perfil metabólico alterado (Marques-Vidal et al. 2012).

O grupo de pacientes avaliados neste estudo foram selecionados por critérios que incluíam IMC acima de 35 (obesidade grau II), não obstante a maior parte dos indivíduos possuíam obesidade mórbida (tabela 6). De maneira surpreendente, ao avaliarmos o perfil inflamatório destes pacientes, observamos que em relação a mediadores inflamatórios comumente descritos na literatura como elevados em indivíduos obesos (TNF- α , IL-6, MCP1, PAI-1, resistina, entre outros), pudemos verificar que estes apresentavam níveis iguais ao até mesmo inferiores ao grupo controle (figura 9). Embora este perfil inflamatório reduzido, assim como o fato de a maior parte dos pacientes estudados não apresentarem resistência à insulina e diabetes (tabela 4-1 e figura 9), possa levar a uma inferência para um perfil semelhante à MHO, vários fatores devem ser levados em consideração antes da conclusão deste diagnóstico.

Fatores como genética e determinantes ambientais como dieta e exercício devem ser considerados antes do estabelecimento do fenótipo MHO. Grande parte dos estudos de grande coorte que reportam o quadro inflamatório na obesidade ocorrem em populações relativamente mais homogêneas. Embora, estes estudos tenham trazido avanços impressionantes na compreensão das alterações que ocorrem durante o desenvolvimento da obesidade, é possível que nem todos os achados possam ser transpostos para a população brasileira, uma vez que a nossa herança genética é resultado de um grande processo histórico de miscigenação.

A população brasileira vem cada vez mais adotando um estilo de vida americanizado, principalmente no que concerne à ingestão de *fast food*, alimentos industrializados com alto teor de gordura e açúcar. Todavia, ainda possuímos uma importante diversidade cultural que usa a culinária como forma de expressão e possibilita a ingestão de uma variedade de alimentos ricos em nutrientes e que podem contribuir para modulação do metabolismo e microbiota, direcionando para um perfil menos inflamado (Vigitel 2017)(Cani & Everard 2016; Cândido et al. 2017).

Além dos fatores herança genética, alimentação e prática de exercício, o tempo de processamento das amostras de sangue deve ser considerado para a explicação do perfil de inflamação sistêmica encontrado nestes pacientes. Não obstante a obtenção do plasma dos pacientes obesos tenha sido através do mesmo protocolo realizado para o sangue dos voluntários hígidos, o tempo entre a coleta do sangue e o processamento e congelamento do plasma variou entre os dois grupos. A coleta de sangue dos indivíduos obesos foi feita durante momento cirúrgico, sendo processada somente após o término da cirurgia. Embora as amostras de sangue tenham sido armazenadas em gelo, o intervalo de até quase 2,5h pode ter sido

suficiente para a degradação de algumas citocinas mais lábeis (por exemplo TNF- α) em comparação ao tempo de processamento das amostras do grupo controle, que ocorrem em um intervalo de cerca de meia hora. Ademais, alguns fatores comportamentais como consumo de tabaco, estresse e distúrbios de sono e/ou o uso de medicamentos podem ter influência direta no perfil de citocinas circulantes. No entanto, durante a condução deste estudo, várias destas informações estavam inacessíveis ou ausentes.

Tendo em vista o acima exposto, ainda que tenha sido observado um perfil inflamatório reduzido nos indivíduos obesos mórbidos participantes deste estudo, há muitos vieses a se considerar antes da afirmação do fenótipo de “obesidade saudável”.

Embora muito possa ser considerado em relação aos fatores que determinem o perfil metabólico do grande obeso, acreditamos que um melhor entendimento das alterações moleculares do tecido adiposo em decorrência do desenvolvimento de obesidade seja a melhor abordagem para uma maior compreensão da fisiopatologia desta doença, de determinantes para o desenvolvimento de perfil metabólico saudável ou não e para o desenvolvimento de terapias mais eficientes.

A obesidade é determinada pelo aumento do tecido adiposo branco em decorrência do desbalanço entre a ingesta calórica e gasto de energia. A capacidade do tecido adiposo de sofrer alterações morfológicas, expansão e armazenamento de energia na forma de lipídios é uma evolução estratégica para garantir a sobrevivência durante períodos de falta de comida (Haczeyni et al. 2017). O tecido adiposo é um órgão de composição complexa que constitui-se principalmente de adipócitos maduros (uniloculares) e da fração estromal vascular (células epiteliais, células tronco-mesenquimais, pré-adipócitos, macrófagos e outras células imunes). O tecido adiposo é atualmente considerado o maior órgão endócrino em mamíferos, produzindo uma variedade de hormônios, esteroides, citocinas/adipocinas, tornando assim o adipócito como um importante determinante para o ambiente metabólico local e sistêmico (O’Connell et al. 2010).

Em 1987 Markan e Barton publicaram um trabalho descrevendo características anatômicas das duas camadas de tecido adiposo subcutâneo humano. Neste trabalho eles observaram que o WAT subcutâneo superficial possuía uma organização estrutural diferente da fração do WAT SC profundo (Markman & Barton 1987). Esta observação implica que diferenças na organização tecidual e distribuição anatômica podem ser importantes determinantes da função e/ou adaptação do tecido adiposo em resposta a alterações na demanda energética. A expansão do tecido adiposo ocorre em dois processos distintos e interligados: hipertrofia (aumento do volume celular) e hiperplasia (aumento do número de células). Na

presença de excesso de energia, célula adiposas maduros iniciam o processo de hipertrofia, aumentando o processo de lipogênese. Se o organismo não entra em equilíbrio energético, a hipertrofia é seguida pelo processo de hiperplasia, embora os mecanismos que regem estes processos ainda não estejam totalmente esclarecidos.

A associação da hipertrofia do adipócito e disfunção tecidual vêm sendo reportada em diversos estudos, nos quais demonstra-se que o tamanho do adipócito é diretamente relacionado ao metabolismo lipídico e glicolítico mediado por insulina, assim como mudança para um perfil de citocinas mais pró-inflamatório em adipócitos maiores (Salans & Dougherty 1971; Smith 1971; McLaughlin et al. 2016).

Como descrito por Tchoukalova e colaboradores, os diferentes depósitos de tecido adiposo variam em relação ao tamanho da célula adiposa e essa variação de tamanho parece estar diretamente relacionada às variações metabólicas entre os tecidos. Neste estudo os autores verificaram que existiam diferenças entre o tamanho do adipócito de tecido visceral e subcutâneo e ainda que este último apresenta também diferenças entre os depósitos gordurosos na região abdominal (maior hipertrofia) e tecido adiposo subcutâneo localizado na região gluteofemoral, deixando uma associação importante entre a localização anatômica do depósito de WAT e a propensão no desenvolvimento de doenças metabólicas em decorrência da disfunção tecidual (Tchoukalova et al. 2008). Em outro estudo, O'Connell e colaboradores avaliaram o tecido adiposo subcutâneo abdominal e visceral de indivíduos obesos com presença ou ausência de desordens metabólicas. Durante este estudo, os autores observaram relação direta entre o tamanho do adipócito do omento e os graus de resistência à insulina e de esteatose hepática. O tamanho do adipócito oriundo do tecido adiposo subcutâneo também correlacionou-se com o grau de deposição de gordura no fígado, no qual os adipócitos maiores apresentavam maior atividade lipolítica o que poderia contribuir para o maior influxo de ácidos graxos livres e deposição ectópica desse lipídios, porém não se observou correlação com os distúrbios metabólicos da obesidade (O'Connell et al. 2010; Bremer & Jialal 2013).

Levando em conta estas observações, a medida do tamanho do adipócito é importante na determinação da contribuição dos três depósitos de tecido adiposo abdominal (SC, PP e VC) para as alterações metabólicas nos indivíduos obesos considerados neste estudo. Na visualização do tamanho do adipócito na imagem de tecido corado em H&E leva-nos a crer que o tecido adiposo pré-peritoneal apresenta adipócitos mais hipertrofiados do que os tecidos subcutâneo e visceral, entretanto na análise por software *Image J* nenhuma diferença pode ser notada (figura 10B-C). Embora este modo de avaliação seja interessante para avaliar a área ocupada por adipócitos, com esta análise específica, não é possível quantificar o tamanho das

células adiposas em micrômetros. A avaliação por meio de software foi escolhida para diminuir o viés humano na medida manual do tamanho das células, entretanto o método utilizado não parece ser o mais adequado para esta análise. Diversos estudos vem sendo conduzidos para estabelecer um método eficiente para medida do tamanho do adipócito, no entanto não existe um consenso sobre qual método deve ser utilizado (Björnheden et al. 2004; Galarraga et al. 2012).

O aumento do tamanho da célula adiposa é proporcional ao aumento da gota lipídica. A representação desta organela como um depósito de lipídio intracelular inerte já não existe mais. A gota lipídica ou corpúsculo lipídico está envolvida em diversos processos metabólicos e regulação de sinalização intracelular, além da proteção dos adipócitos contra lipotoxicidade. Estas organelas estão presente virtualmente em quase todas as células e apresentam importante papel na resposta à estímulos inflamatórios em leucócitos (Bozza et al. 2009). Diversas proteínas associadas a gota lipídica (proteínas da família PAT) são importantes para estrutura, função e regulação da gota lipídica. A expressão de ADRP é regulada positivamente na durante a o processo de formação de gota lipídica e é induzida quando adipócitos são expostos à elevados níveis de ácidos graxos livres. A perilipina, é a mais abundante proteína na gota lipídica de adipócitos totalmente diferenciados e exerce importante função no processo de lipólise (Leff & Granneman 2010), entretanto a abundância desta proteína não está relacionada ao tamanho da célula adiposa, tal como observado na análise do conteúdo proteico e expressão gênica nas figura 11 e 23. Estas características das proteínas de gota lipídica explicam os resultados obtidos na comparação entre o tamanho de gota lipídica e proteínas relacionadas nos diferentes depósitos de tecido adiposo humano e murino (figura 11 e 23).

Observamos maior expressão de ADRP em tecido adiposo visceral humano do que no depósito subcutâneo e pré-peritoneal (figura 11). Tal fato pode ser em decorrência de um processo de adipogênese ou ao aumento de CL em células da fração estromal vascular. Ainda que o processo de hiperplasia em tecido adiposo ocorra em todos os depósitos de tecido adiposo branco, Drolet e colaboradores demonstraram que o processo de hiperplasia é maior no tecido subcutâneo (Drolet et al. 2008). Deixando a hipótese de incremento de corpúsculos lipídicos em células da FSV, principalmente leucócitos, mais plausível. Macrófagos são o tipo majoritário de células imunes em tecido adiposo branco. Estas células apresentam um aumento do número de CL quando em presença de estímulos infecciosos ou inflamatórios, como no quadro de obesidade (Priour et al. 2011; Boutens & Stienstra 2016). O aumento de infiltrado leucocitário em tecido adiposo de obesos já foi mostrado em diversos estudos (Kranendonk et al. 2015). Em um estudo recente feito pelo nosso grupo demonstramos que o tecido adiposo visceral (omento) continha um maior número de macrófagos quando comparados ao tecido

subcutâneo e ao tecido pré-peritoneal (Silva et al. 2017). Desta forma, acreditamos que o maior conteúdo de ADRP observado neste ensaio seja resultado desta observação.

O aumento o volume abdominal está relacionado com o desenvolvimento doenças cardiovasculares e diabetes *Mellitus* tipo II. Como já descrito anteriormente, o aumento da circunferência pélvica é resultado da expansão de distintos depósitos de tecido adiposo, sendo três destes depósitos levados em consideração neste estudo: o tecido adiposo subcutâneo, pré-peritoneal e visceral (omento). Triacilgliceróis (TAG) são a forma mais eficiente de armazenamento de energia do organismo, localizados dentro de gotas lipídicas em adipócitos. A mobilização de ácidos graxos da gota lipídica e sua consequente liberação (lipólise) é um processo extremamente regulado, com participação coordenada entre as proteínas estruturais de gota lipídica e enzimas responsáveis pela hidrólise dos TAG. Dentre essas enzimas, a proteína HSL (*hormone sensitive lipase*) e a desnutrina (ATGL, *adipocyte triglyceride lipase*) participam da etapa limitante do processo de lipólise (Birnbaum 2003; Tansey et al. 2004b). FABP4 (*fatty acid binding protein 4*) ou aP2 é outra proteína importante na regulação do metabolismo lipídico. Assim como a perilipina, FABP4 se liga à HSL durante a hidrólise de triacilgliceróis, facilitando a transporte de ácidos graxos e consequentemente, facilitando o processo de lipólise (Jenkins-Kruchten et al. 2003; Bernlohr 2016).

O aumento do influxo de ácidos graxos livres causado pela intensa atividade lipolítica do tecido adiposo branco do grande obesos tem sido associado como uma das causas do desenvolvimento de resistência à insulina e acúmulo ectópico de lipídios. Sabe-se que o omento apresenta maior capacidade lipolítica induzida por estímulos adrenérgicos comparado ao tecido subcutâneo abdominal (Bolinder et al. 1983; Hellmer & Marcus 1992; Hoffstedt et al. 1997), ainda, Lönnqvist e colaboradores verificaram que o tecido subcutâneo respondia mais efetivamente ao efeito antilipolítico da insulina (Lönnqvist et al. 1997). A capacidade lipolítica entre o tecido adiposo subcutâneo e visceral já foi alvo de diversos estudos, entretanto muito pouco se sabe a respeito da contribuição do tecido adiposo pré-peritoneal neste quesito. Em um estudo não muito convencional, Enevoldsen e colaboradores mediram *in vivo* a atividade lipolítica dos depósitos de tecido abdominais subcutâneo superficial, subcutâneo profundo e pré-peritoneal. Neste trabalho foi observado que o tecido SC superficial apresentava atividade lipolítica em resposta à estímulo adrenérgico superior aos dois outros depósitos gordurosos (Enevoldsen et al. 2001).

Para comparação do potencial lipolítico entre os diferentes depósitos de tecido adiposo abdominal alvos deste trabalho avaliamos a expressão das duas principais lipases do processo de lipólise. Na avaliação da proteína HSL, não observamos diferenças entre os tecidos SC, PP

e VC (figura 12A). Parte de resultado vai de acordo com o trabalho de Ray e colaboradores, o qual demonstrou que não havia diferença no conteúdo de HSL entre os depósitos SC e VC de mulheres obesas, embora o tecido SC tenha apresentado maior expressão de mRNA (Ray et al. 2009). Em relação à ATGL, o tecido adiposo pré-peritoneal apresentou maior expressão desta lipase. Este resultado é interessante, uma vez que uma alta taxa de lipólise deste depósito de tecido adiposo pode ser importante para aumento do influxo de ácidos graxos livres e aumento do processo de lipotoxicidade. Na análise de ATGL em WAT de camundongos controle ou submetidos à dieta hiperlipídica não encontramos perfil que se assemelhasse ao observado em humanos (figura 23C). De maneira interessante, não encontramos nenhuma referência na literatura que mostrasse a comparação entre os depósitos de tecido adiposo branco murino em relação à essas duas lipases.

O PPAR γ é altamente expresso no tecido adiposo e possui papel fundamental na adipogênese, na sensibilização à insulina, metabolismo lipídico e inflamação. Mais especificamente, as isoformas PPAR γ 2 e PPAR γ 1 são altamente expressas em adipócitos e macrófagos, respectivamente. Embora PPAR seja expresso tanto no tecido adiposo subcutâneo quanto no visceral, sua atividade é tecido-específica. Em humanos, no depósito de WAT subcutâneo, a ativação de PPAR γ leva ao recrutamento e diferenciação de novos adipócitos e aumento da capacidade anabólica através do aumento da captura de ácidos graxos e enzimas envolvidas na lipogênese. Em contraste, a ativação de PPAR γ leva à diminuição do tamanho do adipócito no tecido visceral por indução de β -oxidação e lipólise através de PGC-1 e não por aumento de novas células adiposas (Leff & Granneman 2010).

Embora as duas isoformas de PPAR γ presentes no tecido adiposo exerçam funções similares, a isoforma PPAR γ 2 é a mais potente indutora da diferenciação adipogênica. Estudos conduzidos em *in vitro* em células 3T3-L1 demonstraram que a expressão ectópica de PPAR γ 2, mas não PPAR γ 1, era capaz de restaurar a capacidade adipogênica (Ren et al. 2002). Assim, embora as duas isoformas sejam capazes de induzir adipogênese, PPAR γ 2 é a mais potente. PPAR γ , além de ser indispensável para a adipogênese, desempenha importante papel na captura de ácidos graxos livre e no armazenamento de TAG em tecido adiposo (Christodoulides & Vidal-Puig 2010). Medina-Gómez e colaboradores, demonstraram que a deleção de PPAR γ 2 em camundongos Ob/Ob levava à diminuição do tecido adiposo, ao desenvolvimento de severa resistência à insulina e dislipidemia, evidenciando a importância de PPAR γ no metabolismo lipídico e na prevenção contra lipotoxicidade (Medina-Gomez et al. 2007).

A comparação da expressão de PPAR γ em tecido adiposo humano tem sido controversa. Vidal-Puig e colaboradores observaram aumento da expressão gênica de PPAR γ no tecido adiposo subcutâneo de mulheres obesas quando comparadas à mulheres com IMC dentro da normalidade (Vidal-Puig et al. 1997). Em outro estudo, Yanase e colaboradores observaram

que a isoforma PPAR γ 1 era predominantemente mais expressa que a isoforma PPAR γ 2 em tecido adiposo subcutâneo e visceral de indivíduos obesos (Yanase et al. 1997). Em nosso estudo, na avaliação de PPAR γ em diferentes depósitos de tecido adiposo humano, observamos uma grande variação do conteúdo desta proteína, independente do IMC e idade (figura 14). Embora nesta análise os tecidos PP e VC do paciente com diabetes parecem expressar uma maior quantidade de PPAR γ , acreditamos que outros fatores, tais como citocinas (discutido adiante) assim como variabilidade genética, possam estar envolvidos na alteração do perfil desta proteína. No entanto, no modelo experimental de obesidade, isento das variações genéticas e de idade observamos um padrão de expressão de PPAR γ nos diferentes depósitos de tecido adiposo branco (figura 24).

Ao avaliarmos PPAR γ nos tecidos subcutâneos, epididimal, visceral e retroperitoneal de camundongos C57BL/6J sob dieta normal e hiperlipídica, não observamos importante variação na isoforma PPAR γ 2 nem entre tecidos adiposos pareados de um mesmo grupo nem intergrupos (figura 24). Esses resultados vão de encontro ao observado no trabalho de Vidal-Puig que observou apenas modesta alteração na expressão gênica de PPAR γ 2 em camundongos expostos à dieta hiperlipídica (Vidal-Puig et al. 1996).

O PPAR γ também possui importante papel na alteração da secreção de adipocinas pelo tecido adiposo no quadro de obesidade e resistência à insulina. A ativação de PPAR em macrófagos, em particular PPAR γ 1, inibe a expressão de diversos genes pró—inflamatórios, colocando o PPAR γ como um regulador negativo da ativação de macrófagos (Sharma & Staels 2007). A expansão do tecido adiposo induzida por dieta hiperlipídica é acompanhado pelo aumento do infiltrado de macrófagos e o estabelecimento de inflamação tecidual (van der Heijden et al. 2015). Cortez e colaboradores demonstraram em camundongos, um aumento da secreção de TNF- α , IL-6 , IL-1 e NF κ B mediado por high fat diet (Cortez et al. 2013). Este estudo vai de encontro ao que observamos na figura 25, onde ocorre inibição importante de PPAR γ 1 em todos os depósitos de tecido adiposo dos camundongos obesos (HFD).

A obesidade é uma condição pró-inflamatória em que adipócitos hipertrofiados, pré-adipócitos e células imunes contribuem para o aumento dos níveis circulantes de citocinas pró-inflamatórias. O estabelecimento de um perfil mais ou menos pró-inflamatório vai definir o fenótipo do indivíduo obeso, tornando o tecido local chave da definição da inflamação sistêmica (Makki et al. 2013). Como demonstrado no primeiro conjunto de resultados desse trabalho, os pacientes obesos apresentaram um perfil semelhante ao MHO. Para compreender como este quadro foi estabelecido e qual era a contribuição de cada depósito de tecido adiposo abdominal para este perfil inflamatório, avaliamos a produção de diversas adipocinas em tecido adiposo

subcutâneo, pré-peritoneal e visceral. Na análise da produção de leptina, observamos que o depósito visceral produz menor quantidade deste hormônio quando comparado ao WAT SC (figura 15B-C). Tal observação já foi descrita na literatura em diversos trabalhos (Van Harmelen et al. 1998; Gottschling-zeller et al. 1999). Surpreendentemente, a produção de leptina pelo tecido adiposo pré-peritoneal não difere do tecido subcutâneo, colocando o WAT pré-peritoneal como um segundo depósito de tecido adiposo importante para o quadro de hiperleptinemia e resistência hipotalâmica à leptina presente no grande obeso. Além da ação central da leptina na inibição da ingestão, esta adipocina atua modulando o sistema imune, através da ativação de monócitos e neutrófilos, promoção da resposta de linfócito T, age como quimioatraente para macrófagos e indução a produção de mediadores pró-inflamatórios tais como TNF- α , IL-6, LTB₄, IL-1 e IFN γ (Maya-Monteiro & Bozza 2008).

A adiponectina é outra adipocina importante na regulação da sensibilidade à insulina e modulação do sistema imune. Além de induzir a diferenciação de adipócitos ao ativar fatores adipogênicos tais como C/EBP α , PPAR γ e SREBP-1, esta adipocina tem caráter anti-inflamatório, antagonizando a ação de TNF- α e induzindo a secreção de IL-10 e IL-1Ra em leucócitos (Wolf et al. 2004; Whitehead et al. 2006). Ainda existe controvérsia em relação à expressão de adiponectina nos depósitos de tecido adiposo humano na obesidade. Fisher e colaboradores demonstrou que o depósito subcutâneo abdominal e gluteofemoral apresentava maior expressão de mRNA desta adipocina quando comparado ao omento (Fisher et al. 2002). Em um outro estudo, Degawa-Yamauchi e colaboradores observaram uma correlação negativa entre o IMC e a expressão de adiponectina em WAT subcutâneo, entretanto nenhuma correlação entre adiponectina mRNA e IMC foi observado no omento (Degawa-Yamauchi et al. 2005). Em contraste, Motoshima e colaboradores demonstraram que adipócitos isolados de tecido adiposo visceral (omento) de pacientes obesos secretava maior quantidade de adiponectina quando comparado aos adipócitos oriundos do tecido adiposo subcutâneo (Motoshima et al. 2002). Este último estudo está em concordância com o que observamos ao comparar o conteúdo de adiponectina em WAT subcutâneo, pré-peritoneal e visceral de pacientes obesos, no qual o tecido visceral apresentou maior expressão desta proteína (figura 15E-F).

MCP ou *monocyte chemoattractant protein-1* é uma proteína chave na regulação e migração de monócitos/macrófagos. Desde a descoberta que indivíduos obesos apresentam níveis plasmáticos elevados de MCP-1/CCL2 e o aumento expressivo de trabalhos mostrando que o quadro de obesidade resultava em aumento do infiltrado leucocitário no tecido adiposo, esta proteína tem despertado interesse na comunidade científica (Panee 2013). O recrutamento exacerbado de macrófagos para o tecido adiposo com participação importante de MCP-1/CCL2 e GM-CSF, especialmente no omento já foi reportado em diversos estudos (Harman-Boehm et

al. 2007; Huber et al. 2008). Essa mesma observação foi vista vários modelos de obesidade (induzida por dieta, em camundongos ob/ob e/ou db/db e adipócitos diferenciados *in vitro*) (Fasshauer et al. 2004; Chen et al. 2005; Kanda et al. 2006). Todavia, ao avaliarmos o conteúdo de MCP-1/CCL2 nos depósitos abdominais de tecido adiposo humano, verificamos que o WAT VC apresentava menor quantidade desta proteína, quando comparado aos depósitos SC e PP (figura 16A). O papel de GM-CSF na inflamação do tecido adiposo foi demonstrado em dois estudos nos quais camundongos *Csf2*^{-/-} foram submetidos à dieta hiperlipídica (Kim et al. 2008; Pamir et al. 2015). Embora, em relação à esta citocina também importante para ativação e migração de macrófagos, o tecido adiposo SC apresentou maiores níveis de GM-CSF do que o tecido PP e visceral (figura 16C). Curiosamente, na análise do conteúdo de monócitos através de CD14, não observamos diferença entre os três tecidos (figura 16D).

Apesar de macrófagos constituírem a população de leucócitos mais abundante no tecido adiposo, com o advento da obesidade ocorre numeroso aumento de outras células imunes neste local, tais como neutrófilos, linfócitos, células dendríticas e células NK. Estas células também contribuem para o aumento de diversos mediadores pró-inflamatórios (Ferrante 2013). Interleucina-6 e TNF- α são as citocinas mais amplamente estudadas na obesidade. Dados na literatura mostram que estas duas citocinas, em indivíduos, são secretadas em maior quantidade no tecido adiposo visceral (omento) do que no WAT subcutâneo (Fried et al. 1998; Fain et al. 2004; Trujillo et al. 2004; Good et al. 2006; Cao et al. 2008). Além destas duas adipocinas, IL-1 β , IL-1Ra, IL-10, IFN- γ vêm sendo reportadas como importantes na inflamação local e sistêmica no quadro de obesidade (Wolf et al. 2004; Juge-Aubry et al. 2005; O'Rourke et al. 2009; Cortez et al. 2013). A relação de gordura abdominal, inflamação e desenvolvimento de diabetes e doenças cardiovasculares na obesidade tem sido comumente associadas à predominância de gordura visceral, entretanto, na comparação entre os depósitos de tecido adiposo que contribuem para o volume abdominal não observamos diferença na produção de TNF- α (figura 14), IL-6, INF α , IL-10 e IL-1Ra (figura 17A, D, F e G, respectivamente). Outro resultado surpreendente foi o nível elevado da produção de IFN- γ pelo tecido adiposo subcutâneo quando comparado aos WAT PP e VC (figura 17C). Este resultado vai de encontro ao que foi relatado na literatura, onde o omento possuía maior número de células NK e era o maior responsável pela produção de IFN- γ no quadro de obesidade (O'Rourke et al. 2009; Wentworth et al. 2017).

Ainda que as células imunes presentes no tecido adiposo sejam as maiores produtoras destas citocinas, sabe-se que adipócitos e células não-imunes da fração estromal vascular são capazes de secretar estes mediadores inflamatórios e que podem contribuir para a modulação do quadro inflamatório na obesidade. Em recente estudo nosso grupo mostrou que células

tronco-mesenquimais dos depósitos de tecido abdominal aqui estudado, eram capazes de secretar diversas adipocinas e que este perfil variava entre os diferentes depósitos gordurosos. Observamos que as células tronco-mesenquimais do tecido adiposo visceral apresentam um perfil mais pró-inflamatório do que as células tronco-mesenquimais de tecido SC e PP. Além disso, vimos que adipócitos diferenciados *in vitro* do tecido adiposo pré-peritoneal secretam menos citocinas pró-inflamatórias e mais adiponectina do que as células derivadas do omento e subcutâneo (Silva et al. 2017). Entretanto, nada foi explorado em relação à contribuição das células adiposas maduras.

O uso de modelos experimentais de obesidade tem sido uma ferramenta bastante útil para ajudar a compreender as alterações do tecido adiposo no quadro de obesidade, além de superar as limitações técnicas envolvidas no estudo em humanos. Parte dos resultados obtidos na avaliação de camundongos obesos já foi discutido anteriormente, sendo assim, abordaremos adiante a caracterização do modelo e o perfil inflamatório dos diferentes depósitos de tecido adiposo em camundongos obesos.

Existem diversos tipos de dietas descritas na literatura para indução de obesidade em camundongos: dietas ricas em proteínas, carboidratos, lipídios ou ambos carboidratos e lipídios, sendo esta última comumente chamada de *western diet*. Dependendo do tipo de intervenção nutricional, os animais desenvolverão um fenótipo específico (Gajda et al. 2007). Dieta rica em carboidratos simples induz obesidade associada a diabetes moderada, enquanto dieta hiperlipídica induz acúmulo lipídico no tecido adiposo e resistência hipotalâmica à leptina (Lin et al. 2000). No presente estudo optamos por utilizar modelo experimental induzido por dieta hiperlipídica, pois este modelo é o que mais se assemelha ao fenótipo observado nos pacientes incluídos neste estudo. Após período de dieta os camundongos submetidos à dieta hiperlipídica apresentaram aumento de peso substancial em relação ao grupo controle (figura 18A e B). Não observamos triglicerídeos e colesterol (figura 18F e G), estes dois últimos possivelmente pelo n amostral avaliado. Apesar de não ter sido observada alteração na glicemia após jejum de 4h, no teste de tolerância à glicose os camundongos HFD apresentam quadro semelhante ao de resistência à insulina (figura 18E).

Embora diversos estudos utilizando modelo de obesidade induzida por dieta tenham retratado aumento plasmático de leptina (Lin et al. 2000; Sáinz et al. 2015) e MCP-1/CCL2 (Chen et al. 2005), neste trabalho observamos apenas o quadro de hiperleptinemia (figura 19A) em consequência da expansão do tecido adiposo branco (figura 20 e 21).

Em estudo bastante elegante Sackmann-Sala e colaboradores avaliaram o peso e tamanho de adipócitos dos diferentes depósitos de tecido adiposo branco de camundongos C57BL/6J,

no qual o tecido adiposo EP apresentava maior peso e maior tamanho do adipócito quando comparado aos outros depósitos de tecido gorduroso (Sackmann-Sala et al. 2008). Nossos dados mostraram resultados ligeiramente diferentes. Observamos em camundongos ND não apresentavam diferenças no peso dos depósitos SC e EP, enquanto os outros depósitos viscerais (mesentérico e retroperitoneal) tem menor peso. No entanto, em relação ao tamanho dos adipócitos, o tecido epididimal apresenta adipócitos mais hipertrofiados do que os depósitos SC, VC e RP. O tamanho dos adipócitos do WAT SC é semelhante ao VC e menor do que o tecido RP (figura 22). Quando estes animais são submetidos à dieta hiperlipídica observamos mudança no padrão de peso dos tecidos e tamanho dos adipócitos. O tecido adiposo subcutâneo é o que apresentou maior crescimento em gramas, apresentando após dieta peso diferente dos depósitos VC e RP, entretanto este depósito de tecido adiposo continuou apresentando adipócitos de menor tamanho. Isto implica em aumento do tamanho do tecido principalmente pelo processo de hiperplasia, o que entra em concordância com dados da literatura, nos quais o WAT subcutâneo é o tecido com maior número de células tronco-mesenquimais (Silva et al. 2017) e com o resultado descrito na figura 32. Embora todos os tecidos tenham apresentado aumento importante do tamanho da célula adiposa após dieta hiperlipídica, o tecido adiposo EP continua sendo o tecido com adipócitos mais hipertrofiados (figura 22).

Como já detalhado anteriormente, a hipertrofia do tecido adiposo branco na obesidade é acompanhada do aumento da secreção de citocinas neste local. Couillard e colaboradores relataram em estudos com tecido adiposo humano que o quadro de hiperleptinemia está mais associado à hipertrofia do adipócito do que hiperplasia (Couillard et al. 2000). Obtivemos resultados semelhantes na análise de camundongos HFD, onde observamos que adipócitos maduros primários oriundos do WAT EP (mais hipertrofiado) apresentaram maior secreção desta adipocina (figura 27A). O mesmo foi visto em relação ao depósito RP, que sob dieta hiperlipídica também apresentou grande hipertrofia. Não observamos diferenças significativas na análise do lisado do tecido adiposo inteiro, possivelmente pelo tamanho da amostra (figura 26A). Adipócitos primários de tecido adiposo EP secretam também mais MCP-1/CCL2 quando comparado as células derivadas dos outros depósitos de WAT (figura 28A). Tal resultado confere aos adipócitos EP um caráter mais pró-inflamatório. Surpreendentemente, adipócitos diferenciados *in vitro* derivados do tecido adiposo retroperitoneal apresentaram um perfil mais anti-inflamatório uma vez que observamos menor secreção de IL-6 e MCP-1/CCL2 e maior secreção de adiponectina nestas células (figuras 29B, 28B e 27D, respectivamente).

Macrófagos desempenham importante papel na manutenção do tecido adiposo e sua ativação em decorrência do quadro de obesidade contribuem para patogênese da resistência à insulina induzida por esta doença (Xu et al. 2003). Estas células respondem à estímulos

inflamatórios através da secreção de citocinas e formação de corpúsculos lipídicos. Maya-Monteiro e colaboradores mostraram que adipocina leptina era capaz de ativar macrófagos murinos através da ativação de PI3K/mTOR e que este estímulo era capaz de modular a formação de corpúsculos lipídicos (Maya-Monteiro et al. 2008). MCP-1/CCL2 é essencial para a ativação de macrófagos em processos inflamatórios como aterosclerose e está envolvida na biogênese de CL em macrófagos no quadro de sepse (Melo et al. 2011). Pacheco e colaboradores mostraram que o acúmulo de CL enriquecido em ADRP era resultado do processo de ativação de CCR2 (receptor de MCP-1/CCL2), via PI3K (Pacheco et al. 2007).

A cultura macrófagos derivados de medula óssea com meio condicionado de adipócitos maduros primários leva à formação de corpúsculo lipídico nestas células (figura 30A e B), entretanto, apesar de observarmos maior secreção diferencial de leptina e MCP-1/CCL2 pelos adipócitos de WAT EP, não foi possível observar modulação positiva de CL e ADRP em macrófagos cultivados com MAD de tecido adiposo epididimal quando comparados à macrófagos estimulados com MAD dos outros depósitos de tecido adiposo (figura 30A e C), não obstante tenhamos verificado maior secreção de MCP-1/CCL2 pelas células estimuladas com MAD EP de camundongo HFD. Da mesma forma, não observamos mudança no perfil inflamatório dos macrófagos estimulados com MAD de camundongos ND e HFD avaliado através expressão de arginase 1 (figura 30F).

Nosso grupo demonstrou que as células tronco-mesenquimais derivadas de diferentes depósitos de tecido adiposo possuíam perfil inflamatório distinto (Silva et al. 2017). Assim, a secreção de mediadores inflamatórios por este grupo de células também é importante na modulação do sistema imune e quadro inflamatório crônico presente no tecido adiposo. Vimos uma maior secreção de MCP-1/CCL2 em macrófagos estimulados com meio condicionado de FSV derivadas do WAT VC, enquanto que os mesmos macrófagos secretaram mais IL-6 pelo estímulo de meio condicionado de FSV derivado do tecido adiposo epididimal (figura 31C e D).

6 CONCLUSÃO

- Observamos neste estudo que os pacientes avaliados, apesar do alto índice de massa corporal, apresentaram quadro semelhante ao de obesidade metabolicamente saudável (MHO), levando em consideração o seu perfil inflamatório reduzido.
- Em relação ao metabolismo lipídico estudado, os tecidos humanos subcutâneo, pré-peritoneal e visceral não apresentaram diferenças importantes.
- Os depósitos de tecido adiposo subcutâneo, pré-peritoneal e visceral não diferem em relação ao conteúdo de macrófagos CD14+. Nossos dados mostraram que o tecido visceral não apresentou o perfil mais inflamado como normalmente descrito na literatura. O tecido adiposo subcutâneo apresentou maior conteúdo de diversas citocinas pró-inflamatórias quando comparado ao VC e o tecido adiposo PP mostrou significativa contribuição para o aumento plasmático de MCP-1/CCL2 observado na obesidade. Desta forma, nossos dados nos levam a crer que os três depósitos de tecido adiposo abdominal contribuem sinergicamente para o estabelecimento do perfil de citocinas séricas e que tais características aqui observadas parecem ter sido decisivas para o estabelecimento do quadro MHO destes pacientes.
- O tecido subcutâneo murino é o que mais se assemelha ao subcutâneo humano, em relação ao potencial adipogênico e tamanho das células adiposas.
- Em relação ao perfil inflamatório dos tecidos adiposos, não observamos o mesmo padrão de citocinas quando comparamos os tecidos adiposos dos camundongos obesos em relação aos tecidos dos pacientes com obesidade mórbida.
- Este conjunto de dados nos leva a sugerir cautela na interpretação dos dados experimentais usando camundongos como modelo de obesidade ao se estabelecer uma comparação paralela definitiva com os depósitos de tecido adiposo humano

7 Referências Bibliográficas

- Abella V, Scotece M, Conde J, Pino J, Gonzalez-Gay MA, Gómez-Reino JJ, et al. Leptin in the interplay of inflammation, metabolism and immune system disorders. *Nat Rev Rheumatol*. 2017;13(2):100–9.
- Ahmadian M, Suh JM, Hah N, Liddle C, Atkins AR, Downes M, et al. PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. 2013;
- Al-Suhaimi EA, & Shehzad A. Leptin, resistin and visfatin: the missing link between endocrine metabolic disorders and immunity. *Eur J Med Res*. 2013;18:12.
- Aprile M, Ambrosio MR, D'Esposito V, Beguinot F, Formisano P, Costa V, et al. PPAR γ in human adipogenesis: Differential contribution of canonical transcripts and dominant negative isoforms. *PPAR Res*. 2014;2014:18–20.
- Arner E, Westermark PO, Spalding KL, Britton T, Rydén M, Frisén J, et al. Adipocyte turnover: Relevance to human adipose tissue morphology. *Diabetes*. 2010;59(1):105–9.
- Baptista LS, Da Silva KR, Da Pedrosa CSG, Claudio-Da-Silva C, Carneiro JRI, Aniceto M, et al. Adipose tissue of control and ex-obese patients exhibit differences in blood vessel content and resident mesenchymal stem cell population. *Obes Surg*. 2009;19(9):1304–12.
- Bernlohr DA. Metabolic functions of FABPs—mechanisms and therapeutic implications. *HHS Public Access*. 2016;11(10):592–605.
- Berry R, Church CD, Gericke MT, Jeffery E, Colman L, & Rodeheffer MS. *Imaging of adipose tissue*. 1st ed. Vol. 537, *Methods in Enzymology*. Elsevier Inc.; 2014.
- Birnbaum MJ. Lipolysis: More than just a lipase. *J Cell Biol*. 2003;161(6):1011–2.
- Björnheden T, Jakubowicz B, Levin M, Odén B, Edén S, Sjöström L, et al. Computerized determination of adipocyte size. *Obes Res*. 2004;12(1):95–105.
- Bolinder J, Kager L, Ostman J, & Arner P. Differences at the receptor and postreceptor levels between human omental and subcutaneous adipose tissue in the action of insulin on lipolysis. *Diabetes*. 1983;32(2):117–23.
- Bouchard C, Tremblay A, Despres JP, Nadeau A, Lupien PJ, Theriault G, et al. The response to long-term overfeeding in identical twins. *N Engl J Med*. 1990;322(21):1477–82.
- Boutens L, & Stienstra R. Adipose tissue macrophages: going off track during obesity. *Diabetologia*. 2016;59(5):879–94.
- Bozza PT, Magalhães KG, & Weller PF. Leukocyte lipid bodies - biogenesis and function in inflammation. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1791(6):540–51.
- Brasaemle DL. Thematic review series: Adipocyte Biology. The perilipin family of structural

- lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *J Lipid Res.* 2007;48(12):2547–59.
- Brasaemle DL, Dolios G, Shapiro L, & Wang R. Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem.* 2004;279(45):46835–42.
- Bremer AA, & Jialal I. Adipose tissue dysfunction in nascent metabolic syndrome. *J Obes.* 2013;2013:393192.
- Brun RP, Tontonoz P, Forman BM, Ellis R, Chen J, Evans RM, et al. Differential activation of adipogenesis by multiple PPAR isoforms. *Genes Dev.* 1996;10(8):974–84.
- Bruun JM. Higher production of IL-8 in visceral vs. subcutaneous adipose tissue. Implication of nonadipose cells in adipose tissue. *AJP Endocrinol Metab.* 2003;286(1):8E–13.
- Buchwald H. The evolution of metabolic/bariatric surgery. *Obes Surg.* 2014;24(8):1126–35.
- Canello R, Tordjman J, Poitou C, Guilhem G, Bouillot JL, Hugol D, et al. Increased Infiltration of Macrophages in Omental Adipose Tissue Is Associated With Marked Hepatic Lesions in Morbid Human Obesity. *Diabetes.* 2006;55(6):1554–61.
- Cândido FG, Valente FX, Grześkowiak ŁM, Moreira APB, Rocha DMUP, & Alfenas R de CG. Impact of dietary fat on gut microbiota and low-grade systemic inflammation: mechanisms and clinical implications on obesity. *International Journal of Food Sciences and Nutrition.* 2017;1–19.
- Cani PD, & Everard A. Talking microbes: When gut bacteria interact with diet and host organs. *Mol Nutr Food Res.* 2016;60(1):58–66.
- Cao YL, Hu CZ, Meng X, Wang DF, & Zhang J. Expression of TNF- α protein in omental and subcutaneous adipose tissue in obesity. *Diabetes Res Clin Pract.* 2008;79(2):214–9.
- Carswell KA, Lee M, & Fried SK. Culture of Isolated Human Adipocytes and Isolated Adipose Tissue. In 2012. p. 203–14.
- Chen A, Mumick S, Zhang C, Lamb J, Dai H, Weingarth D, et al. Diet induction of monocyte chemoattractant protein 1 and its impact on obesity. *Obes Res.* 2005;13(8):1311–20.
- Chen HC, & Farese R V. Determination of adipocyte size by computer image analysis. *J Lipid Res.* 2002;43:986–9.
- Christodoulides C, & Vidal-Puig A. PPARs and adipocyte function. *Mol Cell Endocrinol.* 2010;318(1–2):61–8.
- Chusyd DE, Wang D, Huffman DM, & Nagy TR. Relationships between Rodent White

- Adipose Fat Pads and Human White Adipose Fat Depots. *Front Nutr.* 2016;3(April).
- Claria J, Nguyen BT, Madenci a. L, Ozaki CK, & Serhan CN. Diversity of lipid mediators in human adipose tissue depots. *AJP Cell Physiol.* 2013;304(12):C1141–9.
- Cornier M-AA, Dabelea D, Hernandez TL, Lindstrom RC, Steig AJ, Stob NR, et al. The Metabolic Syndrome. *Endocr Rev.* 2008;29(7):777–822.
- Cortez M, Carmo LS, Rogero MM, Borelli P, & Fock RA. A high-fat diet increases IL-1, IL-6, and TNF- α production by increasing NF- κ b and attenuating PPAR- γ expression in bone marrow mesenchymal stem cells. *Inflammation.* 2013;36(2):379–86.
- Cota D, Matter EK, Woods SC, & Seeley RJ. The role of hypothalamic mTORC1 signaling in diet-induced obesity. *Genome Res.* 2009;28(28):7202–8.
- Couillard C, Mauriège P, Imbeault P, Prud'homme D, Nadeau A, Tremblay A, et al. Hyperleptinemia is more closely associated with adipose cell hypertrophy than with adipose tissue hyperplasia. *Int J Obes.* 2000;24(JULY):782–8.
- Curat CA, Wegner V, Sengenès C, Miranville A, Tonus C, Busse R, et al. Macrophages in human visceral adipose tissue: increased accumulation in obesity and a source of resistin and visfatin. *Diabetologia.* 2006 Apr;49(4):744–7.
- Dandona P, Aljada A, & Bandyopadhyay A. Inflammation: The link between insulin resistance, obesity and diabetes. Vol. 25, *Trends in Immunology.* 2004. p. 4–7.
- Degawa-Yamauchi M, Moss K a, Bovenkerk JE, Shankar SS, Morrison CL, Lelliott CJ, et al. Regulation of Adiponectin Expression in Human Adipocytes: Effects of Adiposity, Glucocorticoids, and Tumor Necrosis Factor α . *Obes Res.* 2005;13(4):662–9.
- Delavari M, Sørderlund AL, Swinburn B, Mellor D, & Renzaho A. Acculturation and obesity among migrant populations in high income countries--a systematic review. *BMC Public Health.* 2013;13:458.
- Després J-P, & Lemieux I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature.* 2006;444(7121):881–7.
- Després JP. Is visceral obesity the cause of the metabolic syndrome? *Ann Med.* 2006;38(1):52–63.
- Dobbins RL, Szczepaniak LS, Zhang W, & McGarry JD. Chemical sympathectomy alters regulation of body weight during prolonged ICV leptin infusion. *Am J Physiol - Endocrinol Metab.* 2003;284(4):E778–87.
- Drolet R, Richard C, Sniderman a D, Mailloux J, Fortier M, Huot C, et al. Hypertrophy and

- hyperplasia of abdominal adipose tissues in women. *Int J Obes (Lond)*. 2008;32(2):283–91.
- Ducharme NA, & Bickel PE. Minireview: Lipid droplets in lipogenesis and lipolysis. *Endocrinology*. 2008;149(3):942–9.
- Eckel RH, Grundy SM, & Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet*. 2005;365(9468):1415–28.
- Elffers TW, De Mutsert R, Lamb HJ, de Roos A, Willems van Dijk K, Rosendaal FR, et al. Body fat distribution, in particular visceral fat, is associated with cardiometabolic risk factors in obese women. *PLoS One*. 2017;12(9):e0185403.
- Enevoldsen LH, Simonsen L, Stallknecht B, Galbo H, Coppack SW, Chinkes DL, et al. In vivo human lipolytic activity in preperitoneal and subdivisions of subcutaneous abdominal adipose tissue. 2001;
- Engin AB, & Engin A. *Obesity and Lipotoxicity*. Vol. 960. 2017.
- Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, & Bahouth SW. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology*. 2004 May;145(5):2273–82.
- Fajas L, Fruchart JC, & Auwerx J. Transcriptional control of adipogenesis. *Current Opinion in Cell Biology* Apr, 1998 p. 165–73.
- Fang L, Guo F, Zhou L, Stahl R, & Grams J. The cell size and distribution of adipocytes from subcutaneous and visceral fat is associated with type 2 diabetes mellitus in humans. *Adipocyte*. 2015;4(4):273–9.
- Fasshauer M, Klein J, Kralisch S, Klier M, Lossner U, Bluher M, et al. Monocyte chemoattractant protein 1 expression is stimulated by growth hormone and interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;317(2):598–604.
- Feige JN, Gelman L, Michalik L, Desvergne B, & Wahli W. From molecular action to physiological outputs: Peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions. *Prog Lipid Res*. 2006;45(2):120–59.
- Fernández M, Acuna MJ, Reyes M, Olivares D, Hirsch S, Bunout D, et al. Proliferation and differentiation of human adipocyte precursor cells: Differences between the preperitoneal and subcutaneous compartments. *J Cell Biochem*. 2010;111(3):659–64.
- Ferrante AW. The immune cells in adipose tissue. *Diabetes, Obes Metab*. 2013;15(S3):34–8.

- Fisher FM, McTernan PG, Valsamakis G, Chetty R, Harte AL, Anwar AJ, et al. Differences in adiponectin protein expression: Effect of fat depots and type 2 diabetic status. *Horm Metab Res.* 2002;34(11–12):650–4.
- Fried SK, Bunkin DA, & Greenberg AS. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: Depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(3):847–50.
- Friedman JM, & Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature.* 1998;395(6704):763–70.
- Gajda AM, Pellizzon M a, Ph D, Ricci MR, & Ulman E a. Diet-Induced Metabolic Syndrome. *Anim Lab News.* 2007;
- Galarraga M, Campion J, Munoz-Barrutia A, Boque N, Moreno H, Martinez JA, et al. Adiposoft: automated software for the analysis of white adipose tissue cellularity in histological sections. *J Lipid Res.* 2012;53(12):2791–6.
- Gavin KM, Gutman JA, Kohrt WM, Wei Q, Shea KL, Miller HL, et al. De novo generation of adipocytes from circulating progenitor cells in mouse and human adipose tissue. *FASEB J.* 2015;1–13.
- Good M, Newell FM, Haupt LM, Whitehead JP, Hutley LJ, & Prins JB. TNF and TNF receptor expression and insulin sensitivity in human omental and subcutaneous adipose tissue--influence of BMI and adipose distribution. *Diab Vasc Dis Res.* 2006;3(1):26–33.
- Gottschling-zeller H, Birgel M, Scriba D, Blum WF, & Hauner H. Depot-specific release of leptin from subcutaneous and omental adipocytes in suspension culture : effect of tumor necrosis factor- a and transforming growth factor- b 1. 1999;436–42.
- Greenberg AS, Egan JJ, Wek SA, Garty NB, Blanchette-Mackie EJ, & Londos C. Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets. *J Biol Chem.* 1991;266(17):11341–6.
- Guilherme A, Virbasius J V., Vishwajeet P, Czech MP, Puri V, Czech MP, et al. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol* 2008;9(5):367–77.
- Haczeyni F, Bell-Anderson KS, & Farrell GC. Causes and mechanisms of adipocyte enlargement and adipose expansion. *Obes Rev.* 2017;(2).
- Hagman DK, Larson I, Kuzma JN, Cromer G, Makar K, Rubinow KB, et al. The short-term and long-term effects of bariatric/metabolic surgery on subcutaneous adipose tissue

- inflammation in humans. *Metabolism*. 2017;70:12–22.
- Han TS, & Lean ME. A clinical perspective of obesity, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *JRSM Cardiovasc Dis*. 2016;5:204800401663337.
- Harford KA, Reynolds CM, McGillicuddy FC, & Roche HM. Fats, inflammation and insulin resistance: insights to the role of macrophage and T-cell accumulation in adipose tissue. *Proc Nutr Soc*. 2011;70(4):408–17.
- Harman-Boehm I, Blüher M, Redel H, Sion-Vardy N, Ovadia S, Avinoach E, et al. Macrophage infiltration into omental versus subcutaneous fat across different populations: Effect of regional adiposity and the comorbidities of obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(6):2240–7.
- Van Harmelen V, Reynisdottir S, Eriksson P, Thörne A, Hoffstedt J, Lönnqvist F, et al. Leptin secretion from subcutaneous and visceral adipose tissue in women. *Diabetes*. 1998 Jun;47(6):913–7.
- van der Heijden RA, Sheedfar F, Morrison MC, Hommelberg PPH, Kor D, Kloosterhuis NJ, et al. High-fat diet induced obesity primes inflammation in adipose tissue prior to liver in C57BL/6J mice. *Aging (Albany NY)*. 2015;7(4):256–68.
- Hellmer JP, & Marcus C. Mechanisms for Differences and Omental in Lipolysis Fat Cells *. *J Clin Endocrinol Metab*. 1992;75(1):15–20.
- Hoffstedt J, Arner P, Hellers G, & Lönnqvist F. Variation in adrenergic regulation of lipolysis between omental and subcutaneous adipocytes from obese and non-obese men. *J Lipid Res*. 1997;38(4):795–804.
- Huber J, Kiefer FW, Zeyda M, Ludvik B, Silberhumer GR, Prager G, et al. CC chemokine and CC chemokine receptor profiles in visceral and subcutaneous adipose tissue are altered in human obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(8):3215–21.
- Hurtado Del Pozo C, Calvo RM, Vesperinas-García G, Gómez-Ambrosi J, Frühbeck G, Rubio MA, et al. Expression profile in omental and subcutaneous adipose tissue from lean and obese subjects. Repression of lipolytic and lipogenic genes. *Obes Surg*. 2011;21(5):633–43.
- Iikuni N, Lam QLK, Lu L, Matarese G, & La Cava A. Leptin and Inflammation. *Curr Immunol Rev*. 2008;4(2):70–9.
- Jenkins-Kruchten AE, Bennaars-Eiden A, Ross JR, Shen WJ, Kraemer FB, & Bernlohr DA. Fatty acid-binding protein-hormone-sensitive lipase interaction: Fatty acid dependence on

- binding. *J Biol Chem.* 2003;278(48):47636–43.
- Jonas MI, Kurylowicz A, Bartoszewicz Z, Lisik W, Jonas M, Wierzbicki Z, et al. Interleukins 6 and 15 levels are higher in subcutaneous adipose tissue, but obesity is associated with their increased content in visceral fat depots. *Int J Mol Sci.* 2015;16(10):25817–30.
- Juge-Aubry CE, Somm E, Pernin A, Alizadeh N, Giusti V, Dayer JM, et al. Adipose tissue is a regulated source of interleukin-10. *Cytokine.* 2005;29(6):270–4.
- Kamei N, Tobe K, Suzuki R, Ohsugi M, Watanabe T, Kubota N, et al. Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. *J Biol Chem.* 2006;281(36):26602–14.
- Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa KI, Kitazawa R, et al. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest.* 2006;116(6):1494–505.
- Keidar A. Bariatric surgery for type 2 diabetes reversal: The risks. *Diabetes Care.* 2011;34(SUPPL. 2).
- Kennedy GC. The Role of Depot Fat in the Hypothalamic Control of Food Intake in the Rat. *Proc R Soc B Biol Sci.* 1953;140(901):578–92.
- Kershaw EE, & Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(6):2548–56.
- Kim D-H, Sandoval D, Reed JA, Matter EK, Tolod EG, Woods SC, et al. The role of GM-CSF in adipose tissue inflammation. *AJP Endocrinol Metab.* 2008;295(5):E1038–46.
- Klein S. The case of visceral fat : argument for the defense. *J Clin Invest.* 2004;113(11):1530–2.
- Klemm DJ, Leitner JW, Watson P, Nesterova A, Reusch JEB, Goalstone ML, et al. Insulin-induced adipocyte differentiation: Activation of CREB rescues adipogenesis from the arrest caused by inhibition of prenylation. *J Biol Chem.* 2001;276(30):28430–5.
- Klop B, Elte JWF, & Cabezas MC. Dyslipidemia in Obesity: Mechanisms and Potential Targets. *Nutrients.* 2013;5(4):1218–40.
- Klötting N, & Blüher M. Adipocyte dysfunction, inflammation and metabolic syndrome. *Rev Endocr Metab Disord.* 2014;15(4):277–87.
- Kranendonk MEGMEG, van Herwaarden JA, Stupkova T, Jager W de, Vink A, Moll FL, et al. Inflammatory characteristics of distinct abdominal adipose tissue depots relate differently to metabolic risk factors for cardiovascular disease: Distinct fat depots and vascular risk

- factors. *Atherosclerosis*. 2015;239(2):419–27.
- Kudel I, Alves JS, de Menezes Goncalves T, Kull K, & Nortoft E. The association between body mass index and health and economic outcomes in Brazil. *Diabetol Metab Syndr*. 2018;10:20.
- Kvetnoy IM, Reiter RJ, & Khavinson VK. Claude Bernard was right: hormones may be produced by “non-endocrine” cells. *Neuroendocrinol Lett*. 2000;
- Lafontan M. Adipose tissue and adipocyte dysregulation. *Diabetes Metab*. 2014;40(1):16–28.
- Lapid K, & Graff JM. Form(ul)ation of adipocytes by lipids. *Adipocyte*. 2017;0(0):1–11.
- Lass A, Zimmermann R, Oberer M, & Zechner R. Lipolysis - A highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores. *Prog Lipid Res*. 2011;50(1):14–27.
- Lee M-J, Wu Y, & Fried SK. Adipose tissue heterogeneity: implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications. *Mol Aspects Med*. 2013 Feb;34(1):1–11.
- Leff T, & Granneman JG. *Adipose Tissue in Health and Disease*. Leff T, & Granneman JG, editors. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2010.
- Lihn AS, Pedersen SB, & Richelsen B. Adiponectin: Action, regulation and association to insulin sensitivity. *Obes Rev*. 2005;6(1):13–21.
- Lin S, Thomas TC, Storlien LH, & Huang XF. Development of high fat diet-induced obesity and leptin resistance in C57BL/6JJ mice. *Int J Obes*. 2000;24(5):639–46.
- Liu KH, Chan YL, Chan WB, Kong WL, Kong MO, & Chan JCN. Sonographic measurement of mesenteric fat thickness is a good correlate with cardiovascular risk factors: Comparison with subcutaneous and preperitoneal fat thickness, magnetic resonance imaging and anthropometric indexes. *Int J Obes*. 2003;27(10):1267–73.
- Löllmann B, Grüniger S, Stricker-Krongrad A, & Chiesi M. Detection and Quantification of the Leptin Receptor Splice Variants Ob-Ra, b, and, e in Different Mouse Tissues. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;238(2):648–52.
- Loncar D. Convertible adipose tissue in mice. *Cell Tissue Res*. 1991;266(1):149–61.
- Lönnqvist F, Thörne A, Large V, & Arner P. Sex differences in visceral fat lipolysis and metabolic complications of obesity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17(7):1472–80.
- LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, & RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265–75.
- Luquet S, Gaudel C, Holst D, Lopez-Soriano J, Jehl-Pietri C, Fredenrich A, et al. Roles of

- PPAR delta in lipid absorption and metabolism: A new target for the treatment of type 2 diabetes. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 2005;1740(2):313–7.
- Lutz TA, & Woods SC. Overview of animal models of obesity. *Curr Protoc Pharmacol.* 2012;(SUPPL.58):1–18.
- Makki K, Froguel P, & Wolowczuk I. Adipose Tissue in Obesity-Related Inflammation and Insulin Resistance: Cells, Cytokines, and Chemokines. *ISRN Inflamm.* 2013;2013:1–12.
- Markman B, & Barton FE. Anatomy of the subcutaneous tissue of the trunk and lower extremity. *Plast Reconstr Surg.* 1987 Aug;80(2):248–54.
- Marques-Vidal P, Velho S, Waterworth D, Waeber G, von Känel R, & Vollenweider P. The association between inflammatory biomarkers and metabolically healthy obesity depends of the definition used. *Eur J Clin Nutr.* 2012;66(4):426–35.
- Matsusue K, Peters JM, Gonzalez FJ, Science V, & Matsusue K. PPAR β/δ potentiates PPAR γ -stimulated adipocyte differentiation. 2004;18(12):1477–9.
- Maya-Monteiro CM, Almeida PE, D'Avila H, Martins AS, Rezende AP, Castro-Faria-Neto H, et al. Leptin Induces Macrophage Lipid Body Formation by a Phosphatidylinositol 3-Kinase- and Mammalian Target of Rapamycin-dependent Mechanism. *J Biol Chem.* 2008;283(4):2203–10.
- Maya-Monteiro CM, & Bozza PT. Leptin and mTOR: Partners in metabolism and inflammation. *Cell Cycle.* 2008;7(12):1713–7.
- McLaughlin T, Craig C, Liu LF, Perelman D, Allister C, Spielman D, et al. Adipose cell size and regional fat deposition as predictors of metabolic response to overfeeding in insulin-resistant and insulin-sensitive humans. *Diabetes.* 2016;65(5):1245–54.
- Medina-Gomez G, Gray SL, Yetukuri L, Shimomura K, Virtue S, Campbell M, et al. PPAR gamma 2 prevents lipotoxicity by controlling adipose tissue expandability and peripheral lipid metabolism. *PLoS Genet.* 2007;3(4):0634–47.
- Melo RCN, D'Avila H, Wan H-C, Bozza PT, Dvorak AM, & Weller PF. Lipid Bodies in Inflammatory Cells. *J Histochem Cytochem.* 2011;59(5):540–56.
- Michalakis K, Mintziori G, Kaprara A, Tarlatzis BC, & Goulis DG. The complex interaction between obesity, metabolic syndrome and reproductive axis: A narrative review. *Metabolism.* 2013;62(4):457–78.
- Ministério da Saúde. *Vigitel Brasil 2016.* 2017;
- Miyazaki Y, Pipek R, Mandarino LJ, & DeFronzo R a. Tumor necrosis factor α and insulin

- resistance in obese type 2 diabetic patients. *Int J Obes*. 2003;27(1):88–94.
- Moore KL, Dalley AF, & Argur AMR. *Anatomia orientada para a clínica*. 7. ed. EDITORA GUANABARA KOOGAN LTDA., editor. 2014.
- Moseti D, Regassa A, & Kim WK. Molecular regulation of adipogenesis and potential anti-adipogenic bioactive molecules. *Int J Mol Sci*. 2016;17(1):1–24.
- Motoshima H, Wu X, Sinha MK, Hardy VE, Rosato EL, Barbot DJ, et al. Differential regulation of adiponectin secretion from cultured human omental and subcutaneous adipocytes: Effects of insulin and rosiglitazone. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(12):5662–7.
- Murphy DJ. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Prog Lipid Res*. 2001;40(5):325–438.
- Myers MG Jr, Leibel RL, Seeley RJ SM. Obesity and Leptin Resistance: Distinguishing Cause from Effect Martin. 2010;21(11):643–51.
- O’Connell J, Lynch L, Cawood TJ, Kwasnik A, Nolan N, Geoghegan J, et al. The Relationship of Omental and Subcutaneous Adipocyte Size to Metabolic Disease in Severe Obesity. *PLoS One*. 2010;5(4):e9997.
- O’Rourke R, Metcalf M, White A, Madala A, Winters B, Maizlin I, et al. Depot-specific differences in inflammatory mediators and a role for NK cells and IFN-g in inflammation in human adipose tissue. *Int J Obes*. 2009;33(9):978–90.
- Oberkofler H, Fukushima N, Esterbauer H, Krempler F, & Patsch W. Sterol regulatory element binding proteins: relationship of adipose tissue gene expression with obesity in humans. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1575(1–3):75–81.
- Oliveira ML De. Estimativa dos custos da obesidade para o Sistema Único de Saúde do Brasil. 2013;109.
- De Oliveira ML, Santos LMP, & Silvada EN. Direct healthcare cost of obesity in brazil: An application of the cost-of-illness method from the perspective of the public health system in 2011. *PLoS One*. 2015;10(4):1–15.
- Pacheco P, Vieira-de-abreu A, Gomes RN, Barbosa-lima G, Wermelinger LB, Maya-monteiro CM, et al. by Innate Immune Response 1. *Animals*. 2007;3.
- Pamir N, Liu NC, Irwin A, Becker L, Peng YF, Ronsein GE, et al. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-dependent dendritic cells restrain lean adipose tissue expansion. *J Biol Chem*. 2015;290(23):14656–67.
- Panee J. Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1) in Obesity and Diabetes. *Cytokine*.

2013;60(1):1–12.

- Paz-Filho G, Mastronardi C, Franco CB, Wang KB, Wong M-L, & Licinio J. Leptin: molecular mechanisms, systemic pro-inflammatory effects, and clinical implications Leptina: mecanismos moleculares, efeitos pró- inflamatórios sistêmicos e implicações clínicas. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2012;56(9).
- Pérez-Pérez A, Vilariño-García T, Fernández-Riejos P, Martín-González J, Segura-Egea JJ, & Sánchez-Margalet V. Role of leptin as a link between metabolism and the immune system. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2017;35:71–84.
- De Pergola G, & Silvestris F. Obesity as a major risk factor for cancer. *J Obes.* 2013;2013:291546.
- Phillips CM. Metabolically healthy obesity: Definitions, determinants and clinical implications. *Rev Endocr Metab Disord.* 2013;14(3):219–27.
- Planat-Benard V. Plasticity of Human Adipose Lineage Cells Toward Endothelial Cells: Physiological and Therapeutic Perspectives. *Circulation.* 2004;109(5):656–63.
- Porter SA, Massaro JM, Hoffmann U, Vasan RS, O'Donnell CJ, & Fox CS. Abdominal subcutaneous adipose tissue: A protective fat depot? *Diabetes Care.* 2009;32(6):1068–75.
- Prieur X, Mok CYL, Velagapudi VR, Núñez V, Fuentes L, Montaner D, et al. Differential lipid partitioning between adipocytes and tissue macrophages modulates macrophage lipotoxicity and M2/M1 polarization in obese mice. *Diabetes.* 2011;60(3):797–809.
- Pubmed. Número de publicações sobre tecido adiposo [Internet]. 2018. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=adipose+tissue>
- Qatanani M, & Lazar M a. Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu. *Genes Dev.* 2007;21(12):1443–55.
- Ray H, Pinteur C, Frering V, Beylot M, & Large V. Depot-specific differences in perilipin and hormone-sensitive lipase expression in lean and obese. *Lipids Health Dis.* 2009;8:1–10.
- reaven gerald M. Role of Insulin Resistance in Human Disease (Syndrome X): an Expanded Definition. *Annu Rev Med.* 1993;44:121–31.
- Rega-Kaun G, Kaun C, & Wojta J. More than a simple storage organ: Adipose tissue as a source of adipokines involved in cardiovascular disease. *Thromb Haemost.* 2013;110(4):641–50.
- Ren D, Collingwood TN, Rebar EJ, Wolffe AP, & Camp HS. PPARgamma knockdown by engineered transcription factors: exogenous PPARgamma2 but not PPARgamma1 reactivates adipogenesis. *Genes Dev.* 2002;16(1):27–32.

- Roden M. Mechanisms of Disease: hepatic steatosis in type 2 diabetes—pathogenesis and clinical relevance. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2006;2(6):335–48.
- Rosen ED, & MacDougald OA. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(12):885–96.
- Rosen ED, & Spiegelman BM. What We Talk About When We Talk About Fat. 2014a;156(0):20–44.
- Rosen ED, & Spiegelman BM. What We Talk About When We Talk About Fat. *Cell.* 2014b Jan;156(1–2):20–44.
- Ruderman N, Chisholm D, Pi-Sunyer X, & Schneider S. The metabolically obese, normal-weight individual revisited. *Diabetes.* 1998;47(5):699–713.
- Rutkowski JM, Stern JH, & Scherer PE. The cell biology of fat expansion. *J Cell Biol.* 2015;208(5):501–12.
- Sabir N, Pakdemirli E, Sermez Y, Zencir M, & Kazil S. Sonographic assessment of changes in thickness of different abdominal fat layers in response to diet in obese women. *J Clin Ultrasound.* 2003 Jan;31(1):26–30.
- Sackmann-Sala L, Berryman D, Munn R, Lubbers E, & Kopchick J. Heterogeneity among white adipose tissue depots in male C57BL/6JJ mice. *Nano.* 2008;6(9):2166–71.
- Sáinz N, Barrenetxe J, Moreno-Aliaga MJ, & Martínez JA. Leptin resistance and diet-induced obesity: central and peripheral actions of leptin. *Metabolism.* 2015;64(1):35–46.
- Salans LB, & Dougherty JW. The effect of insulin upon glucose metabolism by adipose cells of different size. Influence of cell lipid and protein content, age, and nutritional state. *J Clin Invest.* 1971;50(7):1399–410.
- Sambasivarao S V. Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nat Med.* 2013;18(9):1199–216.
- Schaab M, & Kratzsch J. The soluble leptin receptor. Vol. 29, *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism.* 2015. p. 661–70.
- Scherer PE. Adipose tissue: From lipid storage compartment to endocrine organ. *Diabetes.* 2006;55(6):1537–45.
- Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, & Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem.* 1995;270(45):26746–9.
- Serrano-Marco L, Chacón MR, Maymó-Masip E, Barroso E, Salvadó L, Wabitsch M, et al. TNF- α inhibits PPAR β/δ activity and SIRT1 expression through NF- κ B in human

- adipocytes. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids*. 2012;1821(9):1177–85.
- Seyfart T, Friedrich N, Kische H, Bülow R, Wallaschofski H, Völzke H, et al. Association of sex hormones with physical, laboratory, and imaging markers of anthropometry in men and women from the general population. *PLoS One*. 2018;13(1):1–13.
- Sharma AM, & Staels B. Review: Peroxisome proliferator-activated receptor γ and adipose tissue - Understanding obesity-related changes in regulation of lipid and glucose metabolism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(2):386–95.
- Shen WJ, Liang Y, Hong R, Patel S, Natu V, Sridhar K, et al. Characterization of the Functional Interaction of Adipocyte Lipid-binding Protein with Hormone-sensitive Lipase. *J Biol Chem*. 2001;276(52):49443–8.
- Silva KR, Cortes I, Liechocki S, Carneiro JRI, Souza AAP, Borojevic R, et al. Characterization of stromal vascular fraction and adipose stem cells from subcutaneous, preperitoneal and visceral morbidly obese human adipose tissue depots. *PLoS One*. 2017;12(3):1–15.
- Silva KR, Liechocki S, Carneiro JR, Claudio-da-Silva CS, Maya-Monteiro CM, Borojevic R, et al. Stromal-vascular fraction content and adipose stem cell behavior are altered in morbid obese and post bariatric surgery ex-obese women. *Stem Cell Res Ther*. 2015;6(1):72.
- Smith U. Effect of cell size on lipid synthesis by human adipose tissue in vitro. *J Lipid Res*. 1971;12(1):65–70.
- SOYAMA A, NISHIKAWA T, ISHIZUKA T, ITO H, SAITO J, YAGI K, et al. Clinical Usefulness of the Thickness of Preperitoneal and Subcutaneous Fat Layer in the Abdomen Estimated by Ultrasonography for Diagnosing Abdominal Obesity in Each Type of Impaired Glucose Tolerance in Man. *Endocr J*. 2005;52(2):229–36.
- Suganami T, & Ogawa Y. Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. *J Leukoc Biol*. 2010;88(1):33–9.
- Suzuki R, Hirai Y, Nishide T, Murayama H, Ohshima H, Shinomiya M, et al. Assessment of the Ratio of Visceral Fat to Subcutaneous Fat in the Abdomen. *Am J Med*. 1993;95(3):309–14.
- Takahashi Y, Shinoda A, Kamada H, Shimizu M, Inoue J, & Sato R. Perilipin2 plays a positive role in adipocytes during lipolysis by escaping proteasomal degradation. *Sci Rep*. 2016;6(February):1–14.
- Tamori Y, Masugi J, Nishino N, & Kasuga M. Role of peroxisome proliferator-activated

- receptor-?? in maintenance of the characteristics of mature 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes*. 2002;51(7):2045–55.
- Tan BK, Adya R, & Randeve HS. Omentin: A Novel Link Between Inflammation, Diabesity, and Cardiovascular Disease. Vol. 20, *Trends in Cardiovascular Medicine*. 2010. p. 143–8.
- Tang QQ, & Lane MD. Adipogenesis: From Stem Cell to Adipocyte. *Annu Rev Biochem*. 2012;81(1):715–36.
- Tansey J, Sztalryd C, Hlavin E, Kimmel A, & Londos C. The Central Role of Perilipin A in Lipid Metabolism and Adipocyte Lipolysis. *IUBMB Life (International Union Biochem Mol Biol Life)*. 2004a;56(7):379–85.
- Tansey J, Sztalryd C, Hlavin E, Kimmel A, & Londos C. The Central Role of Perilipin A in Lipid Metabolism and Adipocyte Lipolysis. *IUBMB Life (International Union Biochem Mol Biol Life)*. 2004b;56(7):379–85.
- Tartaglia LA. The Leptin Receptor. *J Biol Chem*. 1997;272(10):6093–6.
- Tchernof a., & Despres J-P. Pathophysiology of Human Visceral Obesity: An Update. *Physiol Rev*. 2013;93(1):359–404.
- Tchkonia T, Thomou T, Zhu Y, Karagiannides I, Pothoulakis C, Jensen MD, et al. Mechanisms and metabolic implications of regional differences among fat depots. *Cell Metab*. 2013;17(5):644–56.
- Tchoukalova YD, Koutsari C, Karpyak M V, Votruba SB, Wendland E, & Jensen MD. Subcutaneous adipocyte size and body fat distribution. *Am J Clin Nutr*. 2008;87(1):56–63.
- Timmons J a., Baar K, Davidsen PK, & Atherton PJ. Is irisin a human exercise gene? *Nature*. 2012;488(7413):E9–10.
- Tontonoz P, Kim JB, Graves RA, & Spiegelman BM. ADD1: a novel helix-loop-helix transcription factor associated with adipocyte determination and differentiation. *Mol Cell Biol*. 1993;13(8):4753–9.
- Tremmel M, Gerdtham U-G, Nilsson P, & Saha S. Economic Burden of Obesity: A Systematic Literature Review. *Int J Environ Res Public Health*. 2017;14(4):435.
- Trujillo ME, & Scherer PE. Adiponectin - Journey from an adipocyte secretory protein to biomarker of the metabolic syndrome. *J Intern Med*. 2005;257(2):167–75.
- Trujillo ME, Sullivan S, Harten I, Schneider SH, Greenberg AS, & Fried SK. Interleukin-6 Regulates Human Adipose Tissue Lipid Metabolism and Leptin Production *in Vitro*. *J Clin*

- Endocrinol Metab. 2004;89(11):5577–82.
- Vázquez-Carrera M. Unraveling the Effects of PPAR β/δ on Insulin Resistance and Cardiovascular Disease. Trends Endocrinol Metab. 2016;27(5):319–34.
- Veilleux A, Caron-Jobin M, Noel S, Laberge PY, Tchernof A, Noël S, et al. Visceral adipocyte hypertrophy is associated with dyslipidemia independent of body composition and fat distribution in women. Diabetes. 2011;60(5):1504–11.
- Vidal-Puig A, Jimenez-Liñan M, Lowell BB, Hamann A, Hu E, Spiegelman B, et al. Regulation of PPAR γ gene expression by nutrition and obesity in rodents. J Clin Invest. 1996;97(11):2553–61.
- Vidal-Puig AJ, Considine R V, Jimenez-Liñan M, Werman A, Pories WJ, Caro JF, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues. Effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids. J Clin Invest. 1997;99(10):2416–22.
- Virtue S, & Vidal-Puig A. Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome — An allostatic perspective. Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids. 2010;1801(3):338–49.
- Wang MC, & Crespi CM. The influence of childhood and adolescent environmental exposure to a westernized environment on the relation between body mass index and adiposity in young Asian American women. Am J Clin Nutr. 2011;93(5):1168–74.
- Warner A, & Mittag J. Breaking BAT: can browning create a better white? J Endocrinol. 2015;228(October):R19–29.
- Wentworth JM, Zhang JG, Bandala-Sanchez E, Naselli G, Liu R, Ritchie M, et al. Interferon-gamma released from omental adipose tissue of insulin-resistant humans alters adipocyte phenotype and impairs response to insulin and adiponectin release. Int J Obes. 2017;41(12):1782–9.
- Whitehead JP, Richards AA, Hickman IJ, Macdonald GA, & Prins JB. Adiponectin - A key adipokine in the metabolic syndrome. Vol. 8, Diabetes, Obesity and Metabolism. 2006. p. 264–80.
- WHO. Controlling the global obesity epidemic. 2008;2:2–3.
- Wildman RP, Muntner P, Reynolds K, McGinn AP, Rajpathak S, Wylie-Rosett J, et al. The Obese Without Cardiometabolic Risk Factor Clustering and the Normal Weight With Cardiometabolic Risk Factor Clustering. Arch Intern Med. 2008;168(15):1617–24.

- Wolf AM, Wolf D, Rumpold H, Enrich B, & Tilg H. Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;323(2):630–5.
- Wronska A, & Kmiec Z. Structural and biochemical characteristics of various white adipose tissue depots. *Acta Physiol.* 2012;205(2):194–208.
- Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest.* 2003;112(12):1821–1830.
- Yamauchi T, & Kadowaki T. Physiological and pathophysiological roles of adiponectin and adiponectin receptors in the integrated regulation of metabolic and cardiovascular diseases. *Int J Obes.* 2008;32:S13–8.
- Yanase T, Yashiro T, Takitani K, Kato S, Taniguchi S, Takayanagi R, et al. Differential expression of PPAR gamma1 and gamma2 isoforms in human adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;233(2):320–4.
- Young P, Arch JRS, & Ashwell M. Brown adipose tissue in the parametrial fat pad of the mouse. *FEBS Lett.* 1984;167(1):10–4.
- Yu R, Kim C-S, Kwon B-S, & Kawada T. Mesenteric adipose tissue-derived monocyte chemoattractant protein-1 plays a crucial role in adipose tissue macrophage migration and activation in obese mice. *Obesity (Silver Spring).* 2006;14(8):1353–62.
- Zechner R, Kienesberger PC, Haemmerle G, Zimmermann R, & Lass A. Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores. *J Lipid Res.* 2009;50(1):3–21.
- Zeyda M, Farmer D, Todoric J, Aszmann O, Speiser M, Györi G, et al. Human adipose tissue macrophages are of an anti-inflammatory phenotype but capable of excessive pro-inflammatory mediator production. *Int J Obes.* 2007;31(9):1420–8.
- Zeyda M, & Stulnig TM. Adipose tissue macrophages. *Immunol Lett.* 2007;112(2):61–7.
- https://www.nhlbi.nih.gov/health/educational/lose_wt/BMI/bmi_dis.htm