

TALITA ROMANATTO

O *KNOCKOUT* PARA O RECEPTOR 1 DE TNF-
 α PROTEGE CONTRA OBESIDADE INDUZIDA
POR DIETA

CAMPINAS

2009

TALITA ROMANATTO

**O *KNOCKOUT* PARA O RECEPTOR 1 DE TNF-
 α PROTEGE CONTRA OBESIDADE INDUZIDA
POR DIETA**

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas, para
obtenção do título de Doutor em Fisiopatologia
Médica, área de concentração Medicina
Experimental*

ORIENTADOR: PROF. DR. LÍCIO AUGUSTO VELLOSO

CAMPINAS

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP
Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

R661k Romanatto, Talita
O knockout para o receptor 1 de TNF- α protege contra obesidade induzida por dieta / Talita Romanatto. Campinas, SP : [s.n.], 2009.

Orientador : Lício Augusto Velloso
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Obesidade. 2. Inflamação. 3. Fator de necrose tumoral alfa. 4. Termogênese. 5. Dieta hiperlipídica. I. Velloso, Lício Augusto. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : “Deletion of tumor necrosis factor-alpha-receptor 1 (TNFR1) protects against diet-induced obesity by means of increased thermogenesis”

Keywords: • Obesity
• Inflammation
• Tumor necrosis factor alpha
• Thermogenesis
• High fat diet

Titulação: Doutor em Fisiopatologia Médica
Área de concentração: Medicina Experimental

Banca examinadora:

Prof. Dr. Lício Augusto Velloso
Prof. Dr. Mário José Abdala Saad
Prof. Dr. Gabriel Forato Anhô
Profa. Dra. Tânia Cristina Pithon Curi
Profa. Dra. Denise Pires de Carvalho

Data da defesa: 30-10-2009

Banca examinadora da tese de Doutorado

Talita Romanatto

Orientador: Prof. Dr. Lício Augusto Velloso

Membros:

1. Profa. Dra. Denise Pires de Carvalho

2. Profa. Dra. Tânia Cristina Pithon Curi

3. Prof. Dr. Mário José Abdalla Saad

4. Prof. Dr. Gabriel Forato Anhe

5. Prof. Dr. Lício Augusto Velloso

Curso de pós-graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 30/10/2009

**Dedico esta tese aos meus pais, Mauro e Ângela, à minha tia Maria José, à minha avó Ana e ao meu noivo Rodrigo, por estarem sempre
ao meu lado incondicionalmente.**

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradeço aqui, de maneira especial, meu orientador e mestre, Lício A. Velloso. Seu exemplo de dedicação e paixão pela pesquisa é admirável e, sem dúvida, contribuiu muito para minha formação. Você faz o que poucos pesquisadores-professores conseguem hoje em dia: mantém a mesma dedicação e competência dentro do laboratório e em sala de aula. Mais do que um orientador você sempre foi um amigo, muitas vezes com preocupações de pai... Obrigada por todos esses anos de convivência e exemplo dentro e fora do laboratório. Obrigada por acreditar em mim desde o começo, mesmo sem referências, pela oportunidade de participar desse grupo de pesquisa que eu tanto me orgulho. Vou sentir muita falta da convivência e das sábias discussões... seu exemplo seguirá comigo por onde quer que eu esteja! **MUITO OBRIGADA DE CORAÇÃO!**

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer imensamente a todas as pessoas que participaram direta ou indiretamente da realização desse trabalho. Em especial:

- Ao meu pai Mauro, pelo admirável senso de honestidade e seriedade. Um cientista-educador, talvez um idealista, obrigada pelas discussões filosóficas sobre ciência e tantas coisas da vida! Obrigada por me apoiar e me consolar em todos os momentos sem exceção. Você é meu exemplo de ser humano.
- À minha mãe Ângela, por todo o carinho e delicadeza que a fazem essa mulher forte e batalhadora. Admiro sua bondade, sua ingenuidade, apenas sinto muito por conviver tão pouco com você. Obrigada por cuidar de mim e estar sempre ao meu lado. Amo você!
- Ao meu amado Rodrigo, sempre presente em todos os momentos, pela ajuda direta e indireta na elaboração desse trabalho. Obrigada pelo companheirismo, pelo otimismo e pela paciência, principalmente nos momentos finais do trabalho. Obrigada por tornar meus dias mais felizes, com você ao meu lado tudo sempre fica mais fácil!
- Ao meu irmão Tales que, mesmo à distância, está sempre no meu coração. Te amo moleque!
- À minha tia Maria José, pelo exemplo de mulher guerreira e por cuidar tão bem de mim. Obrigada por todos os mimos e todo carinho que eu recebo quando estou em São Carlos, não sei o que seria da minha vida sem a sua presença!
- À minha querida avó Ana, que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos da minha vida. Obrigada por toda preocupação e também por todo o carinho de sempre. Agradeço a Deus por ter uma avó tão presente na minha vida e peço a Ele que continue dando muita saúde a ela!
- Ao meu anjo da guarda do Labsincel, minha querida amiga Erika Anne. O que seria dos meus experimentos se não existisse uma Erika na minha vida? Obrigada pelo carinho, pela amizade e, principalmente, pela paciência que você sempre teve comigo! Eu ainda vou descobrir de que mundo você é, porque daqui você não é não.... obrigada por tudo minha querida!
- À minha amiga Marciane, pelo bom humor de sempre, obrigada pela amizade, pelo companheirismo, pelos jantares na sua casa e pelas risadas nos bares da vida. Obrigada pelos conselhos e por estar sempre disposta a me ajudar. Você é uma pessoa iluminada!

- Ao meu outro anjo da guarda do Labsincel, minha primeira aluna de iniciação científica e meu braço direito no laboratório, Carina. Adoro trabalhar com você porque você adivinha meus pensamentos. Obrigada por toda ajuda, sempre, em todos os experimentos, principalmente aqueles mais absurdos! E obrigada também pela companhia fora do laboratório!
- À minha amiga Maria Lúcia, que infelizmente já voltou pro Paraná, mas que também contribuiu muito direta e indiretamente para a realização desse trabalho. Obrigada por sua amizade, por todo carinho e por, mesmo à distância, estar sempre presente. Saudades de você!
- Ao casal amigo: Marcelo e Ana Paula. Ao Marcelo pelos bons momentos compartilhados fora do laboratório e à Ana pelo exemplo de pesquisadora e pessoa solícita. Obrigada por me ajudar nas discussões do trabalho e também pela agradável companhia nos nossos “happy hours” no Pier 4.
- Ao Gérson, nosso querido técnico, pela convivência no laboratório e pela amizade. Agradeço também à Fernanda, pela companhia e alegria nas tardes de sexta feira. Obrigada por fazerem parte da minha vida; vocês, junto com as meninas (Carol e Luiza) são pessoas muito especiais que eu tive muita sorte terem cruzado meu caminho!
- Ao Raphael, meu querido francês, pela ajuda nas discussões sobre o trabalho e também nas análises estatísticas. Obrigada pela amizade, pelos jantares nos fins de semana e pelas conversas doidas! Agradeço também à Hanna, muito querida, que participou de tudo isso também. Muita saudade de vocês dois!
- Ao Márcio Alves-Cruz, nosso bioterista preferido, obrigada por toda a sua dedicação ao trabalho e ao nosso laboratório, o qual não seria o mesmo sem você. Você vai longe com toda essa garra e curiosidade!
- Aos professores Mário Saad e Márcio Torsoni, pelas discussões acadêmicas e agradável convivência.
- À querida Eliana, pela convivência dentro e fora do laboratório... obrigada pelo carinho e por participar da minha história em Campinas!
- Ao Ricardo Contarteze (*in memoriam*) pelas lições de garra e perseverança... Infelizmente Deus te levou cedo demais.... você nos faz falta...
- Aos meus queridos amigos Flávio e Graziela, que sempre estiveram presentes na minha vida dos momentos mais felizes aos nem tanto... obrigada pela amizade incondicional e por serem essas pessoas tão especiais na minha vida.... Não sei o que seria de mim sem vocês!

- Aos meus amigos de Mogi das Cruzes, Pedro, Mari, Fernandinho, Jé, Carol, Tchoris, Vit e Beto, pela ajuda indireta, mas fundamental nos meus finais de semana. O prazer da companhia de vocês e o fato de sempre torcerem por mim colaborou para que eu trabalhasse com mais garra e alegria.
- Aos professores Rui Curi (USP, São Paulo) pela disponibilização de seu laboratório para os experimentos de respirometria e João Santana da Silva (USP, Ribeirão Preto), pela doação dos animais knockout.
- Aos pais do Rodrigo, Maria Helena e Daniel, pelo apoio e carinho sempre constantes. Muito obrigada por tudo!
- A todos os amigos do Labsincel, pela agradável convivência e troca de experiências: Adriana Torsoni, Alessandra Girasol, Andressa Coope, Carla Nunes, Claudio T. de Souza, Daniela Bertelli, Daniela Razoli, Dennys Cintra, Eli Mansour, Eliana P. de Araújo, Erika Anne, Gabriela Albuquerque, Gabriela Souza, Giovanna Degasperi, Íkaro Breder, Joseane Morari, Juliana de Moraes, Letícia Souza, Livia Pascoal e Patricia Prada, Simone Lee e Sylka Gelonese.
- E, é claro, um agradecimento não muito comum, mas muito digno, a todos os meus queridos camundongos e ratinhos, por suas vidas sacrificadas, sem as quais não seria possível a realização desse trabalho!
- A CAPES, CNPq e FAPESP, pelo auxílio financeiro.

Meu muito obrigada a todos!

RESUMO

O aumento da prevalência de obesidade em várias regiões do planeta é um dos mais importantes fenômenos clínico-epidemiológicos da atualidade. Fatores como a mudança do hábito alimentar e o estilo de vida sedentário, aliados a determinantes genéticos ainda pouco conhecidos desempenham um papel relevante na patogênese dessa doença. Nos últimos quinze anos, desde o descobrimento do hormônio leptina, avanços consideráveis foram obtidos na caracterização dos mecanismos hipotalâmicos do controle da ingestão alimentar e da termogênese. Em um estudo recente demonstrou-se que o consumo de uma dieta rica em gordura induz a expressão de várias citocinas pró-inflamatórias no hipotálamo e que a inibição da via de sinalização intracelular da serina quinase JNK é capaz de reverter parcialmente algumas das conseqüências clínicas do consumo dessa dieta (De Souza et al, 2005). No presente estudo avaliou-se a importância do receptor 1 de TNF- α (TNFR1) na gênese do processo inflamatório desencadeado pela dieta rica em gordura. O TNFR1 é responsável pela maioria dos efeitos do TNF- α , no entanto no contexto da obesidade induzida por dieta, a função desse receptor não está completamente esclarecida. Para tanto, camundongos *knockout* (KO) para o TNFR1 e seu respectivo background genético, C57BL6, foram tratados por 8 semanas com dieta hiperlipídica e observamos que o TNFR1 KO está protegido da obesidade induzida por dieta por meio de aumento na termogênese. Em ambas as dietas, padrão e hiperlipídica (HF), TNFR1 KO ganha menos peso apesar de aumento na ingestão alimentar. Adiposidade e diâmetro dos adipócitos estão reduzidos, assim como as concentrações sanguíneas de insulina e leptina. TNFR1 KO estão protegidos de

resistência hipotalâmica à via da leptina por meio de preservação da sinalização da leptina através de JAK2, STAT3 e FOXO1. TNFR1 KO apresentam aumento de termogênese, pelo aumento do consumo de O₂, aumento da expressão de UCP-1 e UCP-3, no tecido adiposo marrom e músculo esquelético, respectivamente, e aumento do consumo de O₂ de mitocôndrias isoladas de músculo. Isso demonstra que a via de sinalização do TNF- α pelo TNFR1 representa um importante mecanismo envolvido na termogênese deficiente associada à obesidade.

ABSTRACT



In diet-induced obesity, hypothalamic and systemic inflammatory factors trigger intracellular mechanisms that lead to resistance to the main adipostatic hormones, leptin and insulin. Tumor necrosis factor- α (TNF- α) is one of the main inflammatory factors produced during this process and its mechanistic role as an inducer of leptin and insulin resistance has been widely investigated. Most of TNF- α inflammatory signals are delivered by TNFR1; however, the role played by this receptor in the context of obesity-associated inflammation is not completely known. Here, we show that TNFR1 knockout (TNFR1 KO) mice are protected from diet-induced obesity due to increased thermogenesis. Under standard rodent chow or high-fat diet, TNFR1 KO gain significantly less body mass in spite of increased caloric intake. Visceral adiposity and mean adipocyte diameter are reduced and blood concentrations of insulin and leptin are lower. Protection from hypothalamic leptin resistance is evidenced by increased leptin-induced suppression of food intake and preserved activation of leptin signal transduction through JAK2, STAT3 and FOXO1. Under high fat diet, TNFR1 KO mice present a significantly increased expression of the thermogenesis-related neurotransmitter, TRH. Further evidence of increased thermogenesis includes the increased O₂ consumption and CO₂ production in respirometry measurements, increased expressions of UCP1 and UCP3 in brown adipose tissue and skeletal muscle, respectively, and increased O₂ consumption by isolated skeletal muscle fiber mitochondria. This demonstrates that TNF- α signaling through TNFR1 is an important mechanism involved in obesity-associated defective thermogenesis.

LISTA DE ABREVIATURAS

α -MSH	Hormônio estimulador α -melanocítico
AgRP	Peptídeo relacionado ao agouti
Akt	Proteína quinase B
ANOVA	Análise de variâncias
ATP	Trifosfato de adenosina
BAT	Tecido adiposo marrom
BSA	Albumina de soro bovino
CART	Peptídeo regulado por cocaína e anfetamina
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
CTs	Threshold Cycle
CTR	Controle
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
FOXO 1	forkhead box O1
GAPD	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
HEPES	Ácido (hidroxi-piperazina) etanosulfônico
I κ B	Quinase inibidora do fator nuclear κ B
ICV	Intracerebroventricular
IKK	I κ B quinase
IL-1 β	Interleucina-1 beta

IL-1R	Receptor de interleucina 1
IL-6	Interleucina-6
IR	Receptor de insulina
IRSs	Substratos do receptor de insulina
JAK-2	Janus quinase 2
JNK	<i>c-jun amino-terminal kinase</i>
KO	<i>Knockout</i>
LH	Hipotálamo lateral
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MCH	Hormônio concentrador de melanina
NF κ B	Fator de transcrição nuclear kappa B
NPY	Neuropeptídeo Y
ObRb	Receptor de leptina
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PI3K	Fosfatidilinositol 3 quinase
PMSF	Fluoreto de fenilmetil sulfona
POMC	Pro-opiomelanocortina
PVN	Núcleo paraventricular
rpm	Rotações por minuto
RQ	Quociente respiratório
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

SEM	Erro padrão da média
SHP-2	SH2 fosfatase
SOCS3	Supressor de sinalização de citocina 3
STAT3	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3
T3	3,5,3'-triiodo L-tironina
TLRs	<i>Toll-like Receptors</i>
TNF α	Fator de necrose tumoral - alfa
TNFR-1	Receptor 1 de TNF- α
TNFR2	Receptor 2 de TNF- α
TRAF2	<i>TNF-receptor-associated factor 2</i>
TRAF6	<i>TNF-receptor-associated factor 6</i>
TRH	Hormônio liberador de tirotrofina
TRIF	Proteína adaptadora que contém domínio TIR
Tris	Tri (hidroximetil)-aminometano
UCP-1	Proteína desacopladora 1
UCP-3	Proteína desacopladora 3

	Página
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	14
INTRODUÇÃO	18
OBJETIVOS	34
CAPÍTULO	36
 <i>Artigo: TNFR1 knockout protects against diet-induced obesity by means of increased thermogenesis</i>	
CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
APÊNDICE.....	70

INTRODUÇÃO

A obesidade é hoje um dos principais problemas de saúde pública no mundo. De acordo com dados epidemiológicos aproximadamente 1 bilhão de pessoas apresentam obesidade ($\text{IMC} \geq 30 \text{ Kg/m}^2$) ou sobrepeso (IMC entre 25 e 30 Kg/m^2), o que equivale a aproximadamente 28% da população mundial. Estimativas da Organização Mundial da Saúde projetam prevalências superiores a 50% nos Estados Unidos e superiores a 25% no Brasil para o ano de 2025 (1). O desenvolvimento da obesidade é um dos mais importantes fatores de risco para outras doenças também altamente prevalentes na sociedade moderna, tais como, diabetes mellitus tipo 2, hipertensão arterial, doença arterial coronariana, dislipidemias, certos tipos de câncer, distúrbios circulatórios, entre outras (2).

O acúmulo de massa corporal ocorre devido a uma combinação de múltiplos fatores genéticos e ambientais, com exceção de raros casos de defeitos monogênicos (3). A regulação da massa corporal depende de um perfeito equilíbrio entre a ingestão alimentar e o gasto energético. Esse equilíbrio é coordenado, em parte, por neurônios especializados localizados no hipotálamo, os quais recebem sinais periféricos, como insulina e leptina, controlando os estoques de energia (4, 5).

A leptina é um hormônio com características estruturais de citocina produzida predominantemente pelo tecido adiposo branco em relação proporcional direta à massa deste tecido no organismo (6). A sinalização da leptina depende de sua ligação a um receptor da família de citocinas de classe I (7). O receptor de leptina possui várias isoformas, sendo a ObRb a predominante em neurônios do núcleo arqueado e a principal responsável pela transdução do sinal da leptina nessa

região anatômica (8). Como outros membros da família de receptores de classe I de citocinas, o ObRb não possui atividade catalítica intrínseca sendo constitutivamente ligado a uma proteína citosólica com atividade tirosina quinase chamada Janus quinase - 2 (JAK-2) (9). A ligação da leptina ao ObRb ativa três vias distintas de sinalização intracelular, IRS/PI3-quinase, SHP-2/MAP-quinase e STAT, as quais são responsáveis pela modulação de fenômenos fisiológicos controlados pela leptina como a produção e liberação de neurotransmissores responsáveis pelo controle da fome e termogênese (10).

Os avanços na caracterização dos mecanismos de ação da leptina no hipotálamo revelaram que a transdução do sinal desse hormônio sofre importante controle por vias paralelas de sinalização celular, sendo que, até o presente momento, a insulina se destaca como o principal modulador do sinal da leptina (11, 12, 13).

A insulina ocupa um papel central na manutenção da homeostase energética e coordena o armazenamento e utilização das moléculas combustíveis no tecido adiposo, fígado e músculo esquelético. O aumento plasmático pós-prandial da concentração de insulina promove a captação de glicose e sua conversão em glicogênio ou triglicérides pelo músculo ou tecido adiposo. Em paralelo, a produção hepática de glicose é inibida como resultado da supressão insulino-dependente da gliconeogênese e glicogenólise, e pelo aumento da síntese de glicogênio (14).

A resistência à insulina é uma condição, genética ou adquirida, na qual concentrações fisiológicas de insulina provocam uma resposta subnormal na

captação de glicose pelas células. Em consequência da hiperglicemia decorrente da menor captação da glicose, as células β pancreáticas aumentam a produção e secreção de insulina, aumentando dessa forma a concentração circulante desse hormônio. Assim, a resistência à insulina é acompanhada de hiperinsulinemia. A capacidade das ilhotas pancreáticas em responder a elevações na concentração plasmática de glicose com aumento na secreção de insulina é o evento principal na preservação da homeostase glicêmica. Ela depende de uma fina regulação na maquinaria secretória das células β . A secreção é ajustada continuamente, de acordo com as flutuações dos níveis de nutrientes circulantes, em especial, a glicose (15).

Mesmo considerando que as oscilações na concentração plasmática de glicose sejam cruciais para a regulação da secreção de insulina, outros fatores também participam desse processo. Além dos aminoácidos, ácidos graxos, hormônios intestinais, hormônios produzidos pelas ilhotas pancreáticas, o sistema nervoso autônomo (SNA) possui um papel importante na modulação da secreção de insulina. O sistema nervoso parassimpático via nervo vago, através de receptores muscarínicos na célula β , potencializa a secreção, enquanto o sistema nervoso simpático, agindo por meio de receptores α -adrenérgicos, inibe a secreção de insulina. Esse controle multifatorial permite que as células β secretem insulina em quantidade e tempo adequados, regulando a concentração de nutrientes no sangue em diferentes situações fisiológicas, como jejum, refeição, exercício físico, gravidez, lactação entre outras (16).

As diversas evidências a respeito de um *cross-talk* entre as vias de sinalização da insulina e da leptina, não apenas no hipotálamo, mas também em tecidos periféricos (11, 12) despertaram o interesse pela localização anatômica precisa dos receptores para esses hormônios. Nas últimas décadas, a avaliação da expressão de ObRb e do receptor de insulina (IR) no sistema nervoso central revelaram que, apesar de ambos os receptores serem encontrados em múltiplas e distintas regiões do cérebro, a presença no hipotálamo, e mais especificamente no núcleo arqueado, é a mais marcante (8, 17, 18, 19). Atualmente, duas sub-populações de neurônios foram bem caracterizadas no núcleo arqueado. Uma expressa os neurotransmissores orexigênicos NPY e AgRP, enquanto a outra expressa os neurotransmissores anorexigênicos α -MSH (clivado a partir de POMC) e CART (20). Neurônios α -MSH/CARTérgicos do núcleo arqueado possuem conexões inibitórias curtas com os neurônios NPY/AgRPérgicos e conexões inibitórias longas com neurônios localizados no núcleo hipotalâmico lateral (LH), além de possuírem também conexões excitatórias longas com neurônios do núcleo paraventricular (PVN). As características das conexões dos neurônios NPY/AgRPérgicos são mais controversas. Na visão tradicional esses neurônios possuem apenas conexões inibitórias longas com o PVN e excitatórias longas com o LH (21). Porém, de acordo com a visão mais recente do sistema, acredita-se que além de possuírem conexões inibitórias longas com o PVN e excitatórias longas com o LH, os neurônios NPY/AgRPérgicos possuam também conexões inibitórias curtas com os α -MSH/CARTérgicos (22). As conexões de ambos os tipos de neurônios se fazem com duas sub-populações distintas tanto

no PVN quanto no LH. No PVN existem neurônios que expressam os neurotransmissores CRH e TRH (21). Ambos os neurotransmissores têm funções anorexigênicas e pró-termogênicas, sendo que o TRH desempenha de forma predominante a função pró-termogênica enquanto o CRH desempenha predominantemente a função anorexigênica (20, 21). Por outro lado, no LH também duas sub-populações distintas foram caracterizadas, uma delas expressando a orexina, com papel predominantemente orexigênico, e a outra expressando o MCH, com papel predominantemente, porém não exclusivamente, anti-termogênico (20, 21, 23).

Num ambiente com baixos níveis de insulina e leptina, como por exemplo, durante o jejum prolongado ou em indivíduos com baixo percentual de gordura corporal a maior parte dos receptores ObRb e IR no núcleo arqueado estão desocupados. Nesta situação, há predominância de sinais e conexões excitatórios para os neurônios NPY/AgRPérgicos e sinais e conexões inibitórios para os α -MSH/CARTérgicos (20). Como resultado, há aumento da expressão de orexina e MCH no LH acompanhado da redução da expressão de TRH e CRH no PVN. Por outro lado, no período pós-prandial ou quando há discreto ganho de massa de tecido adiposo como, por exemplo, após um período de ingestão alimentar média aumentada, os níveis plasmáticos de insulina e leptina se elevam, proporcionando uma redução na expressão de orexina e MCH no LH e aumento da expressão de TRH e CRH no PVN (21).

Acredita-se hoje que falhas em alguns dos componentes desse complexo sistema de controle da homeostase energética possam desempenhar uma função

importante no desenvolvimento da obesidade (24). A resistência hipotalâmica à ação da leptina e da insulina é um dos principais eventos participantes da gênese da obesidade. A ligação da leptina ou da insulina aos seus respectivos receptores promove a ativação de uma série de eventos intracelulares que culminam com o controle da expressão gênica, regulação da atividade de canais iônicos, atividade elétrica de neurônios e controle da produção e liberação de neurotransmissores, entre outros (20). Nos últimos anos, diversos grupos têm procurado caracterizar defeitos na transdução do sinal desses hormônios no hipotálamo e relacioná-los a defeitos no controle de eventos fisiológicos como ingestão alimentar e termogênese.

A primeira evidência da existência de um mecanismo pós-receptor que pudesse participar de uma eventual resistência hipotalâmica à ação anorexigênica/adipostática da leptina surgiu a partir de estudos com camundongos nos quais se induziu a obesidade pela oferta de uma dieta rica em gordura. Nesses animais a capacidade da leptina promover a ativação do fator de transcrição STAT-3 foi consideravelmente reduzida aparentemente em razão da indução da expressão de uma proteína que possui a capacidade de se ligar a JAK-2 e à própria STAT-3 impedindo assim sua ativação (25). Essa proteína, chamada SOCS-3 (*suppressor of cytokine signaling-3*), foi inicialmente descrita como sendo induzida por uma série de estímulos gerados por citocinas, tendo o papel de controlar o sinal pró-inflamatório iniciado pelas mesmas (26). Por ser o ObR um receptor com características similares às dos receptores de citocina da classe I seria admissível que proteínas da família SOCS pudessem ter sua

expressão estimulada pela leptina, e que, uma vez presentes no citosol, pudessem interagir com JAK-2 e STAT-3 e assim regular negativamente a sinalização gerada pela leptina. Tal suposição foi comprovada por Bjorbaek e colaboradores ao revelarem que a proteína SOCS-3 induzida pelo estímulo por leptina, liga-se a JAK-2 e inibe por até 20 horas a reutilização da mesma via por um novo estímulo com o hormônio (27). A demonstração definitiva da participação de SOCS-3 como um dos mecanismos indutores da resistência aos sinais celulares e à atividade anorexigênica/adipostática da leptina surgiu com estudos em que camundongos transgênicos haploinsuficientes para SOCS-3 revelaram-se resistentes à obesidade induzida por dieta hipercalórica/hiperlipídica (28). Assim, acredita-se que, a hiperleptinemia gerada durante o desenvolvimento da obesidade mantenha um constante estímulo transcripcional sobre o gene da SOCS-3. Os níveis constitutivamente elevados de SOCS-3 em neurônios hipotalâmicos sustentam um mecanismo inibitório que atua sobre a via de sinalização celular da própria leptina (26, 27).

Como dito anteriormente, o fenótipo de obesidade é resultado do desequilíbrio entre ingestão alimentar e gasto energético. Nos dias atuais, a maior parte das intervenções comportamentais ou farmacológicas, baseia-se na modulação da ingestão alimentar, considerando apenas um lado da equação, o que resulta em benefícios temporários no controle da obesidade. Intervenções baseadas no aumento do gasto energético são, atualmente, pouco exploradas (29).

O tecido adiposo marrom representa um alvo potencial na modulação do gasto energético, pois é um tecido com alta atividade metabólica e especializado na

produção de calor. A produção de calor ou termogênese é fundamental em diversos processos fisiológicos tais como: manutenção da temperatura corporal em animais homeotérmicos (capazes de regular a temperatura por mecanismos endógenos), regulação do peso corporal e adaptação ao frio (30, 31). Didaticamente, a termogênese é classificada em obrigatória (ou basal) e facultativa (ou adaptativa), embora não exista limite nítido entre elas. A termogênese obrigatória corresponde ao calor produzido em todos os processos metabólicos envolvidos na manutenção das funções essenciais para vida durante o repouso, estando, portanto, diretamente relacionada à taxa metabólica basal. A termogênese facultativa é ativada quando a temperatura ambiente é menor do que a temperatura de termoneutralidade ou quando há excesso de alimentação. Nessas condições são ativados mecanismos de geração de calor endógeno que não se restringem àqueles observados durante a termogênese obrigatória (30, 31). Enquanto a termogênese obrigatória ocorre em todos os órgãos do corpo, o órgão responsável pela termogênese facultativa varia dependendo do animal. Em pequenos mamíferos e humanos recém-nascidos, a ativação da termogênese facultativa ocorre principalmente no tecido adiposo marrom e músculo esquelético (30, 31, 32, 33).

A principal função do tecido adiposo marrom em pequenos roedores é a manutenção da temperatura corporal. Em ratos e camundongos, o tecido adiposo marrom localiza-se na região interescapular, permanecendo ativo desde o nascimento até a vida adulta (34, 35, 36). O estudo da fisiologia do tecido adiposo marrom limitou-se durante muitos anos a roedores, pois em humanos, a massa

total desse tecido reduz-se consideravelmente após o nascimento. No entanto, algumas observações clínicas recentes revelaram vestígios de tecido adiposo marrom entre o tecido adiposo branco de pessoas expostas ao frio (37) e também em pacientes com feocromocitoma (38), mostrando que o tecido adiposo marrom pode ter alguma relevância em humanos adultos. De acordo com esses estudos, o tecido adiposo marrom está presente e ativo em alguns humanos adultos e essa presença é inversamente proporcional à adiposidade. Essas observações colocam esse tecido no alvo de intervenções farmacológicas para a modulação do gasto energético (29).

O tecido adiposo marrom é composto por adipócitos, células endoteliais e células precursoras que, quando ativadas, diferenciam-se em adipócitos marrons maduros. A origem dos pré-adipócitos marrons é diversa da origem dos adipócitos brancos, estando mais próxima da origem das células musculares, o que indica uma possível proximidade funcional entre esses dois tecidos (39). O citoplasma do adipócito marrom contém inúmeras gotículas de lipídeos e muitas mitocôndrias, as quais são bem desenvolvidas. Estas características, somadas à vasta vascularização desse tecido conferem a coloração marrom característica do tecido adiposo marrom (31, 40).

A produção de calor nas mitocôndrias do tecido adiposo marrom está intimamente relacionada com a atividade da proteína desacopladora 1 (UCP 1) presente na membrana mitocondrial interna (40, 41). Nas mitocôndrias do tecido adiposo marrom, o acoplamento entre a oxidação dos substratos e a síntese de ATP é pouco eficiente, graças à presença da proteína desacopladora 1 (UCP1).

Esta proteína promove uma rota alternativa para o retorno de prótons do espaço intermembrana para a matriz mitocondrial, desacoplando assim, a respiração da síntese de ATP. Quando a UCP1 está ativa há uma aceleração na taxa de consumo de oxigênio acompanhada de uma diminuição na taxa de síntese de ATP (42). Acredita-se, que através da UCP1, a energia contida no gradiente eletroquímico seja dissipada na forma de calor, já que não é utilizada para sintetizar ATP (40, 43).

Outro tecido que também participa do controle do gasto energético é o músculo esquelético, visto que ele representa 40% do total de massa de um organismo, possui alta atividade metabólica e grande capacidade de responder rapidamente a estímulos nervosos (43). O músculo esquelético é composto por fibras musculares especializadas e bastante heterogêneas que possuem funções bioquímicas, fisiológicas e metabólicas diferentes. O músculo de contração lenta (músculo vermelho) é rico em mitocôndrias, possui vasta rede de capilares circundando cada fibra, além de apresentar maior conteúdo de mioglobina. O músculo de contração rápida (músculo branco) possui um número menor de mitocôndrias, metabolismo glicolítico sendo altamente fatigável. As fibras musculares demonstram uma grande plasticidade podendo se adaptar a uma variedade de estímulos externos, como, por exemplo, os níveis de atividade contrátil, o exercício físico e a temperatura (44).

A produção de calor pelas mitocôndrias do músculo esquelético parece também ser relevante, uma vez que em animais expostos ao frio há um aumento da biogênese e da respiração mitocondrial nesse tecido. No entanto, os

mecanismos pelos quais ocorre tal ativação não estão completamente esclarecidos. Embora nas mitocôndrias ocorra a expressão de uma isoforma da UCP, a UCP3, a função desta isoforma para a termogênese não está totalmente clara. Dentre as evidências que desfavorecem o papel da UCP3 na termogênese está o fato que o RNAm da UCP3 está aumentado em animais em jejum enquanto há uma diminuição em situações em que ocorre aumento da termogênese (45). Animais knockout (KO) para a UCP3 apresentam uma resposta normal ao frio e não são obesos (46). Dentre as evidências que indicam que a UCP3 participa da termogênese muscular estão: a UCP3 está aumentada após administração de Ecstasy, derivado da anfetamina que promove hipertermia (47); e a expressão aumentada dessa proteína protege contra obesidade induzida por dieta (48).

O gasto energético de repouso varia bastante entre humanos, sendo que o baixo gasto energético de repouso predispõe o ganho de peso. Uma parcela considerável da variabilidade na taxa metabólica entre humanos é decorrente de diferenças no gasto energético do músculo esquelético, o que coloca esse tecido numa posição de destaque como modulador da termogênese adaptativa (49).

Levando-se em consideração que o avanço pandêmico da obesidade em diversas regiões do planeta ocorre em íntima associação com a modificação dos padrões alimentares e a introdução de hábitos de vida mais sedentários, é de se supor que, para a maior parte das pessoas que se tornam obesas, fenômenos ambientais como a dieta inadequada e o sedentarismo devam se associar a fatores genéticos predisponentes (raramente monogênicos) para finalmente produzir o fenótipo de obesidade. Assim, uma das mais importantes questões

atuais referentes à fisiopatologia da obesidade, diz respeito aos mecanismos através dos quais os fenômenos ambientais interagem com fatores genéticos predisponentes para produzir o quadro clínico em questão.

Nos últimos 15 anos, tem-se observado que uma das causas da resistência à insulina e à leptina na obesidade é o aumento de mediadores inflamatórios atipicamente produzidos em diversos tecidos dos indivíduos obesos (50, 51). A primeira evidência que mostra a associação entre obesidade e inflamação foi publicada em 1990 por Hotamisligil e Spiegelman (52). Neste trabalho mostrou-se que o fator de necrose tumoral α (TNF α), uma das principais citocinas pró-inflamatórias, está aumentado no tecido adiposo de animais obesos (52). Essa descoberta foi surpreendente tendo em vista que até então essa citocina era encontrada apenas em células do sistema imune. Posteriormente, foi mostrado que a resistência à insulina induzida em animais obesos era dependente dos níveis de TNF α , já que animais que não apresentavam essa citocina estavam protegidos da resistência à insulina durante a obesidade (53).

Atualmente já se sabe que além do TNF α , outros mediadores inflamatórios estão aumentados no tecido adiposo e outros órgãos de camundongos obesos. Dentre esses fatores destacam-se a interleucina 6 (IL6) (54, 55), a proteína C reativa (56) e o fator de transcrição NF κ B, responsável pela regulação da transcrição de diversas proteínas mediadoras da resposta inflamatória (57). Além disso, foi observado que o tecido adiposo de animais obesos possui infiltração de macrófagos, característica típica de processos inflamatórios (58).

O aumento do consumo de dietas altamente calóricas e ricas em ácidos graxos está implicado na gênese de respostas inflamatórias em vários tecidos, inclusive no hipotálamo. De acordo com um estudo realizado pelo nosso grupo, o tratamento por 16 semanas com dieta hiperlipídica, contendo aproximadamente 40% de gordura saturada modula mais de 10% de genes expressos no hipotálamo de roedores, dentre os quais as citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-6 e IL-1 β (59).

O TNF- α foi inicialmente descrito como uma endotoxina causadora de necrose em tumores (60). Posteriormente, descobriu-se que o TNF- α era idêntico à caquexina, uma substância encontrada no sobrenadante de culturas de macrófagos expostos à endotoxinas (61). Classicamente, o TNF- α é descrito como o principal mediador da resposta inflamatória aguda contra bactérias gram-negativas, além de participar da resposta imune contra outros microorganismos patogênicos. Ele é um dos principais mediadores da resposta inflamatória e dos efeitos anorexigênicos durante quadros de infecções e câncer (62). Estudos com ênfase nas funções centrais do TNF- α mostram que este pode exercer efeitos divergentes no hipotálamo, dependendo da concentração em que se encontra em determinadas situações patológicas. Em altas concentrações, em situações de infecções e neoplasias, o TNF- α desencadeia anorexia, no entanto, em baixas concentrações, como observado em quadros de obesidade, o TNF- α bloqueia os efeitos anorexigênicos da insulina e leptina (63, 64, 65). Os efeitos da baixa concentração de TNF- α dependem da expressão de neurotransmissores hipotalâmicos e da ativação de vias de sinalização inflamatórias que impedem a

transdução dos sinais da insulina e da leptina. O $\text{TNF}\alpha$ é produzido majoritariamente pelas células do sistema imune. No entanto, durante a obesidade, essa citocina é expressa pelos macrófagos infiltrados no tecido adiposo hipertrófico e também pela micróglia em neurônios do hipotálamo (66).

As ações do $\text{TNF-}\alpha$ são mediadas principalmente por dois receptores distintos, o TNFR1 , também chamado de p55, e o TNFR2 , p75 na maioria das células e tecidos (67). A ligação do $\text{TNF-}\alpha$ a esses receptores induz a transdução de sinais intracelulares que podem resultar na ativação de diferentes eventos como regulação de apoptose, indução de genes de resposta imediata e ativação da transcrição de genes de resposta inflamatória, inclusive genes codificadores de outras citocinas como $\text{IL-1}\beta$, IL-6 e IL-10 (68). Os receptores TNFR1 e TNFR2 apresentam homologia nos seus domínios extra-celulares, no entanto, na região intra-celular, TNFR1 possui um domínio de morte (DD) que se associa com a proteína adaptadora TRADD, enquanto TNFR2 possui um domínio TRAF. A transdução dos sinais do $\text{TNF-}\alpha$ por meio de ambos os receptores resulta na ativação da transcrição de genes inflamatórios pelo $\text{NF}\kappa\text{B}$ e AP-1 (69). Em determinadas circunstâncias, estímulos pró-apoptóticos podem ser induzidos pelo $\text{TNF-}\alpha$. A presença de ambos TNFR1 e TNFR2 é necessária para a ativação da via pró-apoptótica completa, enquanto apenas a ausência do TNFR1 , mas não do TNFR2 inibe completamente a apoptose induzida por $\text{TNF-}\alpha$ (67, 69).

As vias de sinalização desencadeadas por cada receptor têm sido extensamente estudadas em vários tipos celulares e tecidos. Vários domínios

funcionais do TNFR1 têm sido descritos a partir de análises estruturais (70, 71). O domínio de morte (DD), localizado na porção amino-terminal do receptor sinaliza para apoptose, ativação do fator de transcrição nuclear NF κ B e ativação da quinase JNK. Essas funções são mediadas pela interação do DD e TRADD (*TNFR1-associated death domain protein*) (72). Várias proteínas que se ligam ao TRADD foram identificadas, incluindo FADD (*Fas-associated death domain protein*), TRAF2 (*TNFR-associated factor 2*) e RIP (*receptor interaction protein*). A interação direta de TRADD com FADD é responsável pela sinalização de apoptose, com subsequente ativação da caspase 10 (Flice2/Mch4). A interação de TRADD com TRAF2 assim como com RIP é essencial para a ativação de NF κ B mediada pelo TNF- α (71, 73).

Apesar da função do TNF- α ter sido bastante explorada no contexto da obesidade e da resistência à insulina, poucos estudos avaliaram a participação de cada receptor individualmente nesse contexto. Uysal e colaboradores mostraram que o duplo KO para TNFR1 e TNFR2 protege camundongos de resistência à insulina associada à obesidade (53). Quando a deleção dos genes para os receptores é feita separadamente, apenas a ausência do TNFR1 é capaz de proteger o camundongo ob/ob da resistência à insulina (74). Em contraste, Schreyer e colaboradores demonstraram que ambos, TNFR1 e TNFR2, agem em conjunto, protegendo da resistência à insulina induzida por dieta (75).

De acordo com as evidências recentes, de que no hipotálamo o TNF- α participa de mecanismos inflamatórios que resultam em resistência à insulina e à

leptina associadas à obesidade e considerando que nenhum estudo prévio avaliou o papel individual do TNFR1 na obesidade induzida por dieta, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito de uma ingestão altamente calórica sobre o fenótipo de camundongos KO para o TNFR1.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Gerais

Avaliar a participação do receptor 1 de TNF- α , TNFR1, no desenvolvimento da obesidade induzida por dieta hiperlipídica.

Específicos

Investigar características metabólicas e moleculares de camundongos knockout para o TNFR1 mediante os seguintes parâmetros:

- Variação de massa corporal e ingestão alimentar
- Características estruturais dos tecidos adiposo branco e marrom
- Sensibilidade à leptina no hipotálamo
- Secreção de insulina pelas células β
- Consumo de O_2 /produção de CO_2
- Respiração mitocondrial em músculo esquelético
- Gasto energético no tecido adiposo marrom e músculo esquelético

CAPÍTULO

JBC Papers in Press, Published on October 26, 2009 as manuscript M109.030874

DELETION OF TUMOR NECROSIS FACTOR-ALPHA-RECEPTOR 1 (TNFR1) PROTECTS AGAINST DIET-INDUCED OBESITY BY MEANS OF INCREASED THERMOGENESIS

Talita Romanatto¹, Erika A. Roman¹, Ana Paula Arruda¹, Raphael G. Denis¹, Carina Solon¹, Marciane Milanski¹, Juliana C. Moraes¹, Maria Lucia Bonfleur¹, Giovanna R. Degasper¹, Paty K. Picardi¹, Sandro Hirabara³, Antonio C. Boschero², Rui Curi³, Licio A. Velloso¹

¹Laboratory of Cell Signaling and ²Department of Physiology and Biophysics, University of Campinas and ³Department of Physiology and Biophysics, University of São Paulo, Brazil

Corresponding author: Licio A. Velloso, DCM – FCM UNICAMP 13084-761, Campinas SP Brazil. Email: lavelloso@fcm.unicamp.br

Running head: TNFR1-KO protects from obesity

In diet-induced obesity, hypothalamic and systemic inflammatory factors trigger intracellular mechanisms that lead to resistance to the main adipostatic hormones, leptin and insulin. Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) is one of the main inflammatory factors produced during this process and its mechanistic role as an inducer of leptin and insulin resistance has been widely investigated. Most of TNF- α inflammatory signals are delivered by TNFR1; however, the role played by this receptor in the context of obesity-associated inflammation is not completely known. Here, we show that TNFR1 knockout (TNFR1 KO) mice are protected from diet-induced obesity due to increased thermogenesis. Under standard rodent chow or high-fat diet, TNFR1 KO gain significantly less body mass in spite of increased caloric intake. Visceral adiposity and mean adipocyte diameter are reduced and blood concentrations of insulin and leptin are lower. Protection from hypothalamic leptin resistance is evidenced by increased leptin-induced suppression of food intake and preserved activation of leptin signal transduction through JAK2, STAT3 and FOXO1. Under high fat diet, TNFR1 KO

mice present a significantly increased expression of the thermogenesis-related neurotransmitter, TRH. Further evidence of increased thermogenesis includes the increased O₂ consumption in respirometry measurements, increased expressions of UCP1 and UCP3 in brown adipose tissue and skeletal muscle, respectively, and increased O₂ consumption by isolated skeletal muscle fiber mitochondria. This demonstrates that TNF- α signaling through TNFR1 is an important mechanism involved in obesity-associated defective thermogenesis.

Obesity results from the progressive loss of the homeostatic control of food intake and energy expenditure (1, 2). High consumption of dietary fats is one of the main environmental factors contributing to the worldwide epidemic of obesity (2, 3). Fatty acids present in the diet can activate systemic and hypothalamic inflammatory signaling, which contribute to obesity-associated resistance to insulin and leptin (4, 5). Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) is one of the main mediators of the inflammatory response in obesity, and is expressed by infiltrating macrophages and adipocytes in the

hypertrophic adipose tissue and also by microglia and neurons in the hypothalamus (4).

TNF- α receptor 1 (TNFR1) and TNF- α receptor 2 (TNFR2) are the two main transducers of the TNF- α signals in most cells and tissues (6). The receptors share high homology in the extracellular domains, however, in the intracellular region, TNFR1 has a death domain (DD) that mediates its association with the adapter protein, TRADD, while TNFR2 has a TRAF-binding motif (7). Transducing TNF- α signals through either receptor results in the activation of inflammatory gene transcription by NF κ B and AP1 (7). In addition, under certain circumstances, pro-apoptotic stimulus can be induced by TNF- α (6, 7). The presence of both TNFR1 and TNFR2 is required for full pro-apoptotic signaling, while only the absence of TNFR1, but not of TNFR2 inhibits completely TNF- α -induced apoptosis (6, 7).

Although in the context of obesity and insulin resistance, the role played by TNF- α has been thoroughly explored, few studies have evaluated the participation of each receptor type individually in this setting. Uysal and colleagues showed that the double knockout for TNFR1 and TNFR2 protects mice from obesity-associated insulin resistance (8). When knocking out either receptor separately, only the absence of TNFR1 was capable of rescuing ob/ob mice from insulin resistance (9). Conversely, Schreyer and colleagues reported that both TNFR1 and TNFR2, acting in concert, protect mice from diet-induced insulin resistance (10).

With the recent demonstration that, in the hypothalamus, TNF- α participates in the inflammatory mechanisms that result in obesity-associated leptin and insulin resistance and considering that no previous study has evaluated the role of TNFR1 in diet-induced obesity, we decided to evaluate the effect of high caloric feeding on the phenotype of TNFR1 knockout mice. Here, we show that knocking out TNFR1 protects mice against diet-induced obesity by a

mechanism dependent on increased thermogenesis.

Experimental procedures

Antibodies, chemicals and buffers. Reagents for SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and immunoblotting were from Bio-Rad (Richmond, CA, USA). HEPES, phenylmethylsulfonyl fluoride, aprotinin, dithiothreitol, Triton X-100, Tween 20, glycerol and bovine serum albumin (fraction V) were from Sigma (St. Louis, MO, USA). Protein A-Sepharose 6MB was from Pharmacia (Uppsala, Sweden), and nitrocellulose paper (BA85, 0.2 μ m) was from Amersham (Aylesbury, UK). The reagents for chemiluminescence labeling of proteins in blots were from Amersham (Aylesbury, UK). Leptin was from Calbiochem (San Diego, CA, USA), the anti-TNF- α monoclonal antibody infliximab was from Centocor (Horsham, PA, USA) and mouse recombinant TNF- α was from Calbiochem (Darmstadt, Germany). Antibodies against phospho-JAK2 (pJAK2, rabbit polyclonal, sc-16566R), SOCS3 (rabbit polyclonal, sc-9023), phospho-Tyr (pTyr, mouse monoclonal, sc-508), STAT3 (rabbit polyclonal, sc-483), β -actin (mouse monoclonal, sc-8432), TNFR2 (mouse monoclonal, sc-8041), TRAF2 (mouse monoclonal, sc-137048) and UCP1 (goat polyclonal sc-6529) were from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA); phospho-FKHR (pFOXO1, rabbit polyclonal, recognizing Ser 256, #9461) was from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA) and cytochrome C (#556433) was from BD Biosciences Pharmingen (San Jose, CA, USA). Chemicals for real-time PCR were from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) and Applied Biosystems (Foster City, CA, USA).

Experimental model and feeding protocols. Male TNFRp55^{-/-} (TNFR1 KO) and its respective control C57BL/6J (as suggested by the original breeder - jaxmice.jax.org/strain/002818.html), were from The Jackson Laboratory and kindly donated by Dr. J. S.

Silva from the University of São Paulo (11). The mice were bred under specific pathogen-free conditions at the Central Breeding Center of the University of Campinas. In addition, some experiments were performed with eight-week-old (280–300 g) male Wistar rats obtained from the University of Campinas Animal Breeding Center. All animals were handled according to the University guidelines for the use of animals in experimental studies and conform to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, published by the US National Institutes of Health (NIH publication No. 85-23 revised 1996). All experiments were approved by the Ethics Committee at the University of Campinas. The animals were maintained on a 12 h-light/dark cycle. Eight-week-old male TNFR1 KO mice and their controls (C57BL/6J) were divided into two groups paired by age and body mass and assigned to receive two distinct diets for eight weeks: a standard rodent chow (SC) or a high-fat diet (HF) (Table 1). Body mass and food intake were measured weekly. In some experiments, mice were treated with a daily dose of TNFR2 antibody (1.25 µg, ip) or similar concentration of pre-immune mouse serum, for three weeks. For determination of food intake after leptin treatment, mice were food deprived for 12 h (from 19 h to 7 h) and at 7 h were treated with leptin (10 µL/g, 10^{-6} M, ip) or saline (10 µL/g, ip). Food ingestion was determined over the next 3 h. For all the remaining experiments, animals were food deprived for 6 h.

Icv cannulation. Rats were stereotaxically instrumented using a Stoelting stereotaxic apparatus, according to a method previously described (12). A cannula was placed in the lateral ventricle and efficiency was tested one week after cannulation by the evaluation of the drinking response elicited by angiotensin II injected icv (13). Stereotaxic coordinates were: antero-posterior 0.2 mm/ lateral 1.5 mm/ depth 4.0 mm. For the evaluation of the effect of hypothalamic TNF- α inhibition, rats were icv treated either with diluent or with infliximab, 0.6 µg/dose (2.0 µL icv, once a day for seven days)

Hormone and glucose determinations. Blood leptin and insulin concentrations at the end of the experimental period and insulin secreted by isolated pancreatic islets were determined by enzyme-linked immunosorbent assays (Millipore-Linco, Billerica, MA, USA). Blood glucose was determined by colorimetric assay.

Intraperitoneal glucose tolerance test (GTT). GTT was performed at the end of the experimental period after 6 h fasting. After collection of an unchallenged sample (time 0), a solution of 20% glucose (2.0 g/kg body mass) was administered into the peritoneal cavity. Blood samples were collected from the tail at 30, 60, 90, and 120 min for determination of glucose concentrations. Results are presented as the area under glucose curves.

Insulin tolerance test (ITT). Insulin (0.5 U/kg body mass) was administered by ip injection, and blood samples were collected at 0, 4, 8, 12, 16 and 20 min for serum glucose determination. The constant for glucose disappearance rate during the test (*Kitt*) was calculated using the formula $0.693/t_{1/2}$. The glucose $t_{1/2}$ was calculated from the slope of the least-square analysis of the plasma glucose concentrations during the linear decay phase.

Dynamic insulin secretion studies. Groups of 50 freshly isolated islets were placed on Millipore SW 1300 filters (8.0 µm pore) and perfused in a KRB buffer at a flow rate of 1.0 mL/min for 30 min in the presence of 5.6 mM glucose (basal conditions). After stabilization, the islets were perfused with 5.6 mM or 11.1 mM glucose. Perfusion solutions were gassed with 95% O₂/5% CO₂ and maintained at 37 °C. Insulin concentration was measured in the perfusate and expressed as ng/islet.h.

Islet insulin content. Groups of 4 islets were collected and transferred to tubes containing 1.5 mL deionized water (1.0 mL). After sonication (3 times, 10 seconds pulse), the

extracts were used for determination of islet insulin content.

Microscopy. Mice were fasted for 6 h and killed with an overdose of anesthetic (sodium thiopental). Epididymal white adipose tissue (WAT) and brown adipose tissue (BAT) depots were dissected and assessed by light microscopy. After dissection, specimens were fixed by immersion in 4% formaldehyde in 0.1 mM phosphate buffer, pH 7.4, for 24 h, dehydrated, cleared, and then embedded in paraffin. Serial sections (5µm thick) were obtained and then stained by hematoxylin and eosin.

Morphometry. Tissue sections were evaluated with a Zeiss Axiophot light microscope using a *x40* objective, and digital images were captured with a Canon PowerShot G5. Mean adipocyte surface area (average surface area of 30 randomly – sorted adipocytes per specimen) were determined using Imagelab Analysis software (version 2.4), as described previously (14).

Real-time PCR. Hypothalamic total RNA was extracted using Trizol reagent (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA), according to the manufacturer's recommendations. Total RNA was rendered genomic DNA free by digestion with Rnase-free Dnase (RQ1, Promega, Madison, WI, USA). Real-time PCR analysis of gene expression was carried out in an ABI Prism 7500 sequence detection system (Applied Biosystems). The optimal concentration of cDNA and primers, as well as the maximum efficiency of amplification, were obtained through seven-point, 3-fold dilution curve analysis for each gene. Each PCR reaction contained 25–30 ng of reverse-transcribed cDNA (depending on the gene). Primers were purchased from Applied Biosystems and were: UCP3, Mm00494077_m1; TRH, Mm01182425_g1; MCH, Mm01242886_g1; NPY, Mm00445771_m1; POMC, Mm00435874_m1; and, GAPD #4352339E for mouse. The PCR conditions were 2 min at 50°C; 10 min at 95°C, followed by 40 cycles at 95°C for 15 sec and 60°C for 60 sec.

Normalization was obtained by determining the expression of GAPDH in all samples. Real-time data were analyzed using the engine provided by Applied Biosystems.

Oxygen consumption/carbon dioxide production and respiratory exchange ratio determination. Oxygen consumption/carbon dioxide production and respiratory exchange ratio (RER) were measured in fed animals (mice and rats) through an indirect open circuit calorimeter (Oxymax Deluxe System; Columbus Instruments, Columbus, OH, USA), as described previously (15).

Tissue extraction, immunoprecipitation, and immunoblotting. Mice were anesthetized by intraperitoneal injection of sodium thiopental and used 10–15 min later, i.e., as soon as anesthesia was assured by the loss of pedal and corneal reflexes. In some experiments, ten or thirty minutes after leptin injection (10µL/g, 10^{-6} M, ip), hypothalami were removed and homogenized immediately in extraction buffer at 4°C [1% Triton X-100, 100 mM Tris–HCl (pH 7.4), 100 mM sodium pyrophosphate, 100 mM sodium fluoride, 10 mM EDTA, 10 mM sodium orthovanadate, 2.0 mM PMSF and 0.1 mg aprotinin/mL] with a Polytron PTA 20 S generator (model PT 10/35; Brinkmann Instruments, Westbury, NY, USA). In other experiments, ten minutes after TNF-α injection (100µL, 10^{-8} M, iv), the spleen and thymus were removed and immediately homogenized as described above. Insoluble material was removed by centrifugation for 30 min at 9,000 *xg* in a 70.Ti rotor (Beckman, Fullerton, CA, USA) at 4°C. The protein concentrations of the supernatants were determined by the Bradford dye binding method. Aliquots of the resulting supernatants containing 1.0 mg of total protein were used for immunoprecipitation with antibodies against STAT3 or TNFR2 at 4°C overnight, followed by SDS–PAGE, transfer to nitrocellulose membranes and blotting with anti-pTyr or TRAF2. In direct immunoblot experiments, 0.2 mg of protein extracts were separated by SDS–PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted with anti-pJAK2, pFOXO1, SOCS3, UCP1 and cytochrome C.

The homogeneity of gel loading was always evaluated by blotting the membranes with antibodies against β -actin, STAT3 or TNFR2, as appropriate.

Skeletal muscle mitochondria oxygen consumption. For oxygen consumption measurements, a fragment (2–6 mg) of the gastrocnemius muscle was placed into a Petri dish on ice with 1 mL of relaxing solution containing Ca^{2+} /EGTA buffer (10 mM), free calcium (0.1 μM), imidazole (20 mM), K^+ /4-morpholinoethanesulfonic acid (MES) (50 mM), dithiothreitol (DTT; 0.5 mM), MgCl_2 (6.56 mM), ATP (5.77 mM), phosphocreatine (15 mM), pH 7.1, and individual fiber bundles were separated with a sharp forceps. The fiber bundles were permeabilized for 30 min in 3 ml of ice-cold relaxing solution containing saponin (50 $\mu\text{g/mL}$). The fibers were washed twice for 10 minutes each. The muscle bundles were then immediately transferred into a respirometer (Oxygraph-2k; Oroboros) containing an air-saturated respiration medium at 37°C. The respiration medium (MiR05; Oroboros, Innsbruck, Austria) composition contained sucrose (110 mM), potassium lactobionate (60 mM), EGTA (0.5 mM), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (3 mM), taurine (20 mM), KH_2PO_4 (10 mM), HEPES (20 mM), sucrose (110 mM), BSA (2 mg/mL), pH 7.1. The maximal respiration in state 3 was measured in a mixture containing pyruvate + malate (5 mM) and ADP (2 mM). For state 4, oligomycin (1 $\mu\text{g/mL}$) was added in the assay medium (the Oxygraph-2k is a two-chamber titration-injection respirometer with a limit of oxygen flux detection of 1 pmol/mL.s).

Statistical analysis. Specific protein bands present on the blots were quantified by densitometry. Mean values \pm SEM obtained from densitometric scans and from the other experiments were compared utilizing Student's *t*-test for paired samples or by repeat-measure analysis of variance (one-way or two-way ANOVA) followed by *post hoc* analysis of significance (Bonferroni test) when appropriate. A $p < 0.05$ was accepted as statistically significant.

Results

Reduced body mass gain and reduced adipose tissue depots in TNFR1 KO. On standard rodent chow, the mean body mass of eight-week-old TNFR1 KO was significantly lower than that of C57BL/6J (21.4 ± 0.5 vs. 28.6 ± 0.4 g, respectively; $n = 5$, $p < 0.05$). When paired for starting body mass and fed for eight weeks with HF diet, C57BL/6J mice presented a significant increase in body mass as compared to mice treated with CT diet (Fig. 1A). However, the same diet regimen resulted in no significant change in the body mass of TNFR1 KO (Fig. 1A). Comparing relative body mass, change on HF diet, a significant difference was observed between C57BL/6J and TNFR1 KO (Fig. 1B). Protection from diet-induced obesity was independent of reduced food intake. In fact, relative food intake of TNFR1 KO mice was significantly higher than that of C57BL/6J on either diet (Fig. 1C). In addition, no difference was determined in relative amount of feces (not shown). As a consequence of the protection against diet-induced obesity, TNFR1 KO mice had lower blood concentrations of insulin (Fig. 1D) and leptin (Fig. 1E), and lower insulin secretion from isolated pancreatic islets (Fig. 1F), in spite of similar amount of intracellular insulin in pancreatic islets (not shown). Glucose tolerance as determined by a glucose tolerance test was unaffected in TNFR1 KO mice (Fig. 1G), however, the insulin tolerance test revealed a significantly increased responsiveness to insulin in TNFR1 KO mice fed on HF diet (Fig. 1H). Finally, TNFR1 KO mice had a smaller epididymal fat depot (Fig. 1I) on the HF diet and reduced mean adipocyte diameter on both diets (Fig. 1J and 1K).

Protection from diet-induced obesity is not modified by the inhibition TNFR2. Because of the immunological importance of TNFR2 as a transducer of the TNF- α signals, we evaluated the effect of the inhibition of this receptor type in TNFR1 KO mice. The activity of TNFR2 is fully preserved in

TNFR1 KO mice as shown by the determination of TNF- α -induced association of TNFR2 with TRAF2 in two important organs of the immune system, the spleen and the thymus (Fig. 2A). Inhibiting TNFR2 with a competitive antibody produced no effects on body mass (Fig. 2B) and caloric intake (Fig. 2C) in either C57BL/6J or TNFR1 KO mice in CT or HF diets. The efficiency of the TNFR2 antibody to inhibit the receptor's function is depicted in Figure 2D.

TNFR1 KO mice are protected against diet-induced hypothalamic leptin resistance. The ability of leptin to inhibit food intake was significantly higher in TNFR1 KO mice on both diet types (Fig. 3A). This was accompanied by increased leptin-induced JAK2 (Fig. 3B) and STAT3 (Fig. 3D) tyrosine phosphorylation and FOXO1 (Fig. 3C) serine phosphorylation. In addition, the protein level of the leptin signal inhibitor, SOCS3, was lower in TNFR1 KO mice (Fig. 3E). To evaluate the functional consequences of increased hypothalamic leptin responsiveness in TNFR1 KO mice, we determined the mRNA levels of some of the main hypothalamic neurotransmitters involved in the control of food intake and thermogenesis. As shown in Fig. 3F, NPY was lower in TNFR1 KO mice on the CT diet, however, on the HF diet, the level of this orexigenic neurotransmitter was higher than that of the control. The levels of the anorexigenic neurotransmitter, POMC, were significantly lower in TNFR1 KO mice for both diet types (Fig. 3G). With regard to the thermogenic neurotransmitter TRH, TNFR1 KO mice presented a higher level when fed on HF diet (Fig. 3H). Finally, the anti-thermogenic neurotransmitter, MCH, presented similar levels in TNFR1 KO and C57BL/6J mice, independently of diet type (Fig. 3I).

Increased O₂ consumption in TNFR1 KO mice. Since TNFR1 KO mice were protected from diet-induced obesity even presenting an increased food intake, and considering that the level of the thermogenic neurotransmitter TRH was increased in the hypothalamus of HF diet fed TNFR1 KO mice, we decided to

evaluate oxygen consumption/carbon dioxide production and RER. As depicted in Fig. 4A, mutant mice presented a significantly increased oxygen production on both diets. No significant differences in carbon dioxide production and RER were detected between the strains (Fig. 4B and 4C); however, under HF diet, both strains presented a reduction of RER (Fig. 4C) indicating a preferential consumption of fat for energy production.

Increased thermogenesis in brown adipose tissue and skeletal muscle of TNFR1 KO mice. Since hypothalamic TRH level was increased in TNFR1 KO mice fed on a HF diet, we measured the concentration of T3 in blood samples to evaluate a possible endocrine mechanism leading to increased thermogenesis. As presented in Table 2, no significant differences in T3 concentrations were observed between strains in either diet. Next, we evaluated markers of thermogenesis in two organs involved in heat production. The expression of the thermogenesis-inducing protein, UCP1, was significantly increased in BAT of TNFR1 KO mice (Fig. 5A). This expression was independent of increased mitochondria number, since cytochrome C, a marker of mitochondriogenesis, was similar between strains (Fig. 5B). Further evidence of greater thermogenesis were increased relative size of BAT (Fig. 5C and Fig. 5D; 35 \pm 12% heavier in TNFR1 KO as compared to C57BL/6J mice under HF diet, n = 5; p<0.05), which also displayed a more reddish color than BAT of C57BL/6J, and reduction of fat droplets, as determined by histological analysis (Fig. 5E and Fig. 5F). Skeletal muscle thermogenesis was also increased in TNFR1 KO mice. This was evidenced by increased UCP3 expression (Fig. 5G) and increased O₂ consumption, as determined by skeletal muscle mitochondria respiration assay (Fig. 5I). As in BAT, the level of cytochrome C was similar between strains, suggesting no major change in mitochondria number (Fig. 5H).

Inhibition of TNF- α activity in the hypothalamus increases diet-induced thermogenesis. The hypothalamus controls thermogenesis by modulating the tonus of

adrenergic neural connections to thermogenic tissues, such as BAT and skeletal muscle. To evaluate whether the mechanisms involved in the protection against obesity and increased thermogenesis in TNFR1 KO may be, at least in part, dependent upon the hypothalamic actions of TNF- α , Wistar rats fed on a HF diet were treated icv with the anti-TNF- α monoclonal antibody, infliximab, for seven days. As shown in Fig. 6A, the inhibition of TNF- α in the hypothalamus resulted in increased oxygen consumption, whereas the effects on carbon dioxide production and RER were not significant (Fig. 6B and 6C).

Discussion

The role of TNF- α in the genesis of insulin resistance has been a matter of intense investigation over the last 20 years (4). Initially, it was thought that this cytokine of the innate immune system would be produced by activated macrophages and adipocytes during the progression of adipose tissue hypertrophy. As such, TNF- α and other inflammatory cytokines produced in obesity would be the result of body mass gain and, only after the installation of obesity, they would act in insulin sensitive tissues to promote insulin resistance. However, recent studies have provided evidence for the triggering of an innate immune response much before obesity installation (16-20). Nutrients, such as fatty acids, can activate signal transduction through TLR2 and TLR4 and also endoplasmic reticulum stress, leading to increased pro-inflammatory gene transcription (20, 21). In addition, in the hypothalamus, short-term exposure to fatty acids can activate TLR4 signaling and endoplasmic reticulum stress, leading to local production of inflammatory factors and also to apoptosis of neurons involved in the control of energy homeostasis (17, 19, 22, 23). Thus, TNF- α and other inflammatory cytokines play a central role not only in the development of insulin resistance and diabetes, but also in the genesis of obesity.

The experimental inhibition of TNF- α by a number of genetic and pharmacological approaches improves insulin resistance and also has an impact on body mass gain (8, 24). However, long-term inhibition of TNF- α in humans, as for the treatment of rheumatoid arthritis and Crohn's disease, may have serious infectious outcomes, discouraging its clinical use for metabolic diseases (25). Nevertheless, defining the details of TNF- α action in obesity and insulin resistance may provide the basis for the development of novel strategies for treating these prevalent diseases.

We herein evaluated the role of TNFR1 in diet-induced obesity. This receptor is expressed in most cells of the body and is the main receptor responsible for transducing the TNF- α signal, leading to both inflammatory and apoptotic outcomes (7). Previous studies have shown that knockout of TNFR1 protects genetically obese ob/ob mice from insulin resistance (9). However, most cases of obesity in human populations are due to combined effects of environmental and genetic factors. Monogenic defects leading to obesity are extremely rare in humans and therefore, analysis of animal models such as ob/ob and db/db mice must be interpreted with caution. In our opinion, the data we present using mice with obesity induced by a dietary approach, offers a more realistic view of the effect of TNF- α signal transduction in obesity than those data obtained with the monogenic determined obesity models.

Initially we observed that, when fed on a high-fat diet, TNFR1 KO mice do not become obese even in face of an increased caloric intake. The protection against diet-induced obesity resulted in normal blood concentrations of insulin and leptin, indicating a preserved response to both these hormones. A reduction in blood insulin level was also obtained when ob/ob mice were made TNFR1 deficient (9). However, in this case, the reduction was partial, probably because the animals retained their obese phenotype (9).

In previous studies employing mice with combined defects of the TNFR1 and TNFR2 expressions, the role for TNFR2 upon insulin sensitivity was proven to be minimal (9). Here, we excluded a role for TNFR2 in diet-induced obesity since no phenotypic modification was obtained by blocking TNFR2 activity in control and TNFR1 KO mice.

The protection against diet-induced obesity in TNFR1 KO was, at least in part, due to reduced visceral fat accumulation and reduced mean adipocyte size. Interestingly, in another genetically-manipulated animal model lacking the innate immune system receptor, TLR4, protection against obesity was also accompanied by reduction of adipose tissue mass and reduction of mean adipocyte size (16).

Leptin action in the hypothalamus is one of the main players in the coupling of caloric intake and energy expenditure (26). The normal blood concentration of leptin in TNFR1 KO mice fed on a HF diet suggests an adequate response to this hormone. This was tested at the functional and molecular levels. First we showed that leptin retained its capacity to acutely inhibit food intake in TNFR1 KO mice treated with the HF diet. In addition, there was an increased molecular response to leptin, as evaluated by the activation of JAK2, STAT3 and FOXO1. A number of previous studies have explored the outcomes of defective leptin signaling through the JAK2/STAT3 and PI3K/Akt/FOXO1 signaling pathways (23, 26). Acting in concert, these pathways control neurotransmitter expression and release in synaptic terminals (27). Under leptin resistance, reduced activation of JAK2/STAT3 and PI3K/Akt/FOXO1 pathways contribute to an anomalous expression of key hypothalamic neurotransmitters (28, 29). In TNFR1 KO mice fed on a HF diet, the levels of POMC were reduced, while the levels of NPY and TRH were increased. The increased expression of NPY and reduced expression of POMC were expected since TNFR1 KO mice are hyperphagic. However, the increased expression of TRH was unexpected because it

is, at least in part, inhibited by NPY and stimulated by POMC. Previous studies have shown that leptin can affect TRH expression through two distinct mechanisms: first, a direct activation of the ObR in TRH neurons, and second, indirectly through α -MSH-induced MC4 activation. In lean, normoleptinemic subjects, the leptin-dependent TRH expression is under homeostatic control. Conversely, in diet-induced obesity, with the installation of hypothalamic leptin resistance, a reduction of TRH levels was expectable. What is interesting about this regulation is that in TNFR1 KO mice the drop of TRH levels was of a significantly lesser magnitude than in control mice. Thus, we believe this phenomenon plays a role in the relative increased thermogenesis of TNFR1 KO mice.

The mechanisms involved in TRH-induced thermogenesis are the regulation of thyroid function and the modulation of adrenergic tonus to peripheral thermogenic organs, such as brown adipose tissue and skeletal muscle (30). In the TNFR1 KO mice, no significant change in T3 blood concentration was detected. However, in respirometry there was a significant increase in O₂ consumption, which was accompanied by increased UCP1 expression in BAT and increased UCP3 in skeletal muscle. Taken together, these data suggest that, in the absence of TNFR1, thermogenesis is increased by modulation of proteins involved in energy expenditure in peripheral organs, with no major involvement of thyroid function.

To explore the hypothesis of hypothalamic regulation of thermogenesis through TNF- α signaling, rats fed on the HF diet were icv treated with the anti-TNF- α monoclonal antibody, infliximab, and respirometry was performed. According to this experiment, in the absence of hypothalamic TNF- α activity in the obese state, an increase of O₂ consumption is obtained, suggesting increased energy expenditure.

At high concentration, as in sepsis, TNF- α increases thermogenesis producing fever and energy wastage (6, 31). However, at low

concentration, as happens in obesity, TNF- α produces an anti-thermogenic effect. This is evidenced by reduced relative thermogenesis in obesity (32) and by reduced thermogenesis in animals treated with a low dose of exogenous TNF- α (33). These dose-dependent effects of TNF- α on thermogenesis, may depend at least in part on its hypothalamic actions that control the local activity of leptin and insulin (12).

Many of the phenotypic outcomes obtained when TNFR1 KO mice are exposed to a HF diet are similar to the results obtained when feeding TLR4 loss-of-function mutated mice on the same diet (16). Since diet-induced hypothalamic inflammation is triggered by local activation of TLR4 signaling, leading to a complex cellular response that involves endoplasmic reticulum stress, cytokine production and apoptosis (17, 22), we suspect that hypothalamic production of TNF- α , and its signaling through TNFR1 are amongst the most important phenomena linking high-fat diet consumption and obesity.

The present study defines TNF- α signaling through TNFR1 as an important mechanism in diet induced obesity, controlling predominantly energy expenditure.

Acknowledgements. Grants for these studies were provided by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). The Laboratory of Cell Signaling is a member of the Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Obesidade e Diabetes and also a member of the Gastrocentro – University of Campinas. We thank Dr. N. Conran for English grammar review and Mr. G. Ferraz for technical assistance.

References

1. **Schwartz MW** 2006 Central nervous system regulation of food intake. *Obesity* (Silver Spring) 14 Suppl 1:1S-8S
2. **Flier JS** 2004 Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell* 116:337-350
3. **Freire RD, Cardoso MA, Gimeno SG, Ferreira SR** 2005 Dietary fat is associated with metabolic syndrome in Japanese Brazilians. *Diabetes Care* 28:1779-1785
4. **Hotamisligil GS** 2006 Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444:860-867
5. **Velloso LA, Araujo EP, de Souza CT** 2008 Diet-induced inflammation of the hypothalamus in obesity. *Neuroimmunomodulation* 15:189-193
6. **Hehlgans T, Pfeffer K** 2005 The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 115:1-20
7. **Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ** 2001 The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104:487-501
8. **Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS** 1997 Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. *Nature* 389:610-614
9. **Uysal KT, Wiesbrock SM, Hotamisligil GS** 1998 Functional analysis of tumor necrosis factor (TNF) receptors in TNF- α -mediated insulin resistance in genetic obesity. *Endocrinology* 139:4832-4838
10. **Schreyer SA, Chua SC, Jr., LeBoeuf RC** 1998 Obesity and diabetes in TNF- α receptor- deficient mice. *J Clin Invest* 102:402-411
11. **Pfeffer K, Matsuyama T, Kundig TM, Wakeham A, Kishihara K, Shahinian A, Wiegmann K, Ohashi PS, Kronke M, Mak TW** 1993 Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to L. monocytogenes infection. *Cell* 73:457-467
12. **Romanatto T, Cesquini M, Amaral ME, Roman EA, Moraes JC, Torsoni MA, Cruz-Neto AP, Velloso LA** 2007 TNF- α acts in the hypothalamus inhibiting food intake and increasing the respiratory quotient--effects on leptin and insulin signaling pathways. *Peptides* 28:1050-1058
13. **Johnson AK, Epstein AN** 1975 The cerebral ventricles as the avenue for the dipsogenic action of intracranial angiotensin. *Brain Res* 86:399-418
14. **Schenka AA, Machado CM, Grippo MC, Queiroz LS, Schenka NG, Chagas CA, Verinaud L, Brousset P, Vassallo J** 2005 Immunophenotypic and ultrastructural validation of a new human glioblastoma cell line. *Cell Mol Neurobiol* 25:929-941
15. **Hirabara SM, Silveira LR, Alberici LC, Leandro CV, Lambertucci RH, Polimeno GC, Cury Boaventura MF, Procopio J, Vercesi AE, Curi R** 2006 Acute effect of fatty acids on metabolism and mitochondrial coupling in skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* 1757:57-66
16. **Tsukumo DM, Carvalho-Filho MA, Carvalheira JB, Prada PO, Hirabara SM, Schenka AA, Araujo EP, Vassallo J, Curi R, Velloso LA, Saad MJ** 2007 Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56:1986-1998
17. **Milanski M, Degasperi G, Coope A, Morari J, Denis R, Cintra DE, Tsukumo DM, Anhe G, Amaral ME, Takahashi HK, Curi R, Oliveira HC, Carvalheira JB, Bordin S, Saad MJ, Velloso LA** 2009 Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *J Neurosci* 29:359-370
18. **Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS** 2006 TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 116:3015-3025

19. **Yang L, Hotamisligil GS** 2008 Stressing the brain, fattening the body. *Cell* 135:20-22
20. **Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, Tuncman G, Gorgun C, Glimcher LH, Hotamisligil GS** 2004 Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 306:457-461
21. **Caricilli AM, Nascimento PH, Pauli JR, Tsukumo DM, Velloso LA, Carvalho JB, Saad MJ** 2008 Inhibition of toll-like receptor 2 expression improves insulin sensitivity and signaling in muscle and white adipose tissue of mice fed a high-fat diet. *J Endocrinol* 199:399-406
22. **Moraes JC, Coope A, Morari J, Cintra DE, Roman EA, Pauli JR, Romanatto T, Carvalho JB, Oliveira AL, Saad MJ, Velloso LA** 2009 High-fat diet induces apoptosis of hypothalamic neurons. *PLoS ONE* 4:e5045
23. **De Souza CT, Araujo EP, Bordin S, Ashimine R, Zollner RL, Boschero AC, Saad MJ, Velloso LA** 2005 Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology* 146:4192-4199
24. **Araujo EP, De Souza CT, Ueno M, Cintra DE, Bertolo MB, Carvalho JB, Saad MJ, Velloso LA** 2007 Infliximab restores glucose homeostasis in an animal model of diet-induced obesity and diabetes. *Endocrinology* 148:5991-5997
25. **Crawford M, Curtis JR** 2008 Tumor necrosis factor inhibitors and infection complications. *Curr Rheumatol Rep* 10:383-389
26. **Myers MG, Cowley MA, Munzberg H** 2008 Mechanisms of leptin action and leptin resistance. *Annu Rev Physiol* 70:537-556
27. **Munzberg H, Jobst EE, Bates SH, Jones J, Villanueva E, Leshan R, Bjornholm M, Elmquist J, Sleeman M, Cowley MA, Myers MG, Jr.** 2007 Appropriate inhibition of orexigenic hypothalamic arcuate nucleus neurons independently of leptin receptor/STAT3 signaling. *J Neurosci* 27:69-74
28. **Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdan MG, Diano S, Horvath TL, Cone RD, Low MJ** 2001 Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 411:480-484
29. **Munzberg H, Myers MG, Jr.** 2005 Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance. *Nat Neurosci* 8:566-570
30. **Lechan RM, Fekete C** 2006 The TRH neuron: a hypothalamic integrator of energy metabolism. *Prog Brain Res* 153:209-235
31. **Zanotti S, Kumar A, Kumar A** 2002 Cytokine modulation in sepsis and septic shock. *Expert Opin Investig Drugs* 11:1061-1075
32. **Felig P, Cunningham J, Levitt M, Hendler R, Nadel E** 1983 Energy expenditure in obesity in fasting and postprandial state. *Am J Physiol* 244:E45-51
33. **Klir JJ, McClellan JL, Kozak W, Szelenyi Z, Wong GH, Kluger MJ** 1995 Systemic but not central administration of tumor necrosis factor-alpha attenuates LPS-induced fever in rats. *Am J Physiol* 268:R480-486

Table 1. Composition of diets.

	<i>Standard Chow (SC)</i>		<i>High-Fat Diet (HF)</i>	
	g%	kJ%	g%	kJ%
Protein	20	19	20	14
Carbohydrate	76	72	45	31
Fat	4	9	35	55
kJ/g	17.5		24.1	

Table 2. Concentrations of T3 in serum.

	SC		HF	
	CT	KO	CT	KO
T3 (ng/dL)	63.6	64.1	70.9	66.4
SEM	2.8	2.6	4.1	6.1

N = 4. No significant differences among groups.

Legends for the figures

Figure 1. (A) Body mass (g) was determined weekly in control mice fed on standard rodent chow (circles) or high-fat diet (triangles), and in TNFR1 KO mice fed on standard rodent chow (squares) or high-fat diet (inverted triangles). (B) The changes of body mass in control (CT) and TNFR1 KO (KO) mice fed on high-fat diet for 8 weeks are expressed as % change of initial body mass. (C) Mean daily food intake was determined over the experimental period of 8 weeks while CT and KO mice were fed standard rodent chow (SC) or high-fat diet (HF). Plasma insulin (D) and leptin (E) concentrations were determined at the end of experimental period in CT and KO mice fed on SC or HF. (F) Insulin secretion was determined from isolated pancreatic islets stimulated with low (5.6 mmol/L) or high (11 mmol/L) glucose concentrations. (G) Area under glucose concentration curves obtained during the glucose tolerance test, and (H) constant of glucose disappearance (K_{it}) obtained from the glucose concentration curves during the insulin tolerance test were determined at the end of the experimental period. Total epididymal fat mass (I) and mean adipocyte diameter (J) were determined at the end of the experimental period in CT and KO mice fed on SC or HF diets. Representative histological analysis of epididymal fat is depicted (K). In all experiments, $n = 5$; * $p < 0.05$. In A, * $p < 0.05$ refers to CT-HF mice vs. KO-HF mice and vs. CT-SC mice.

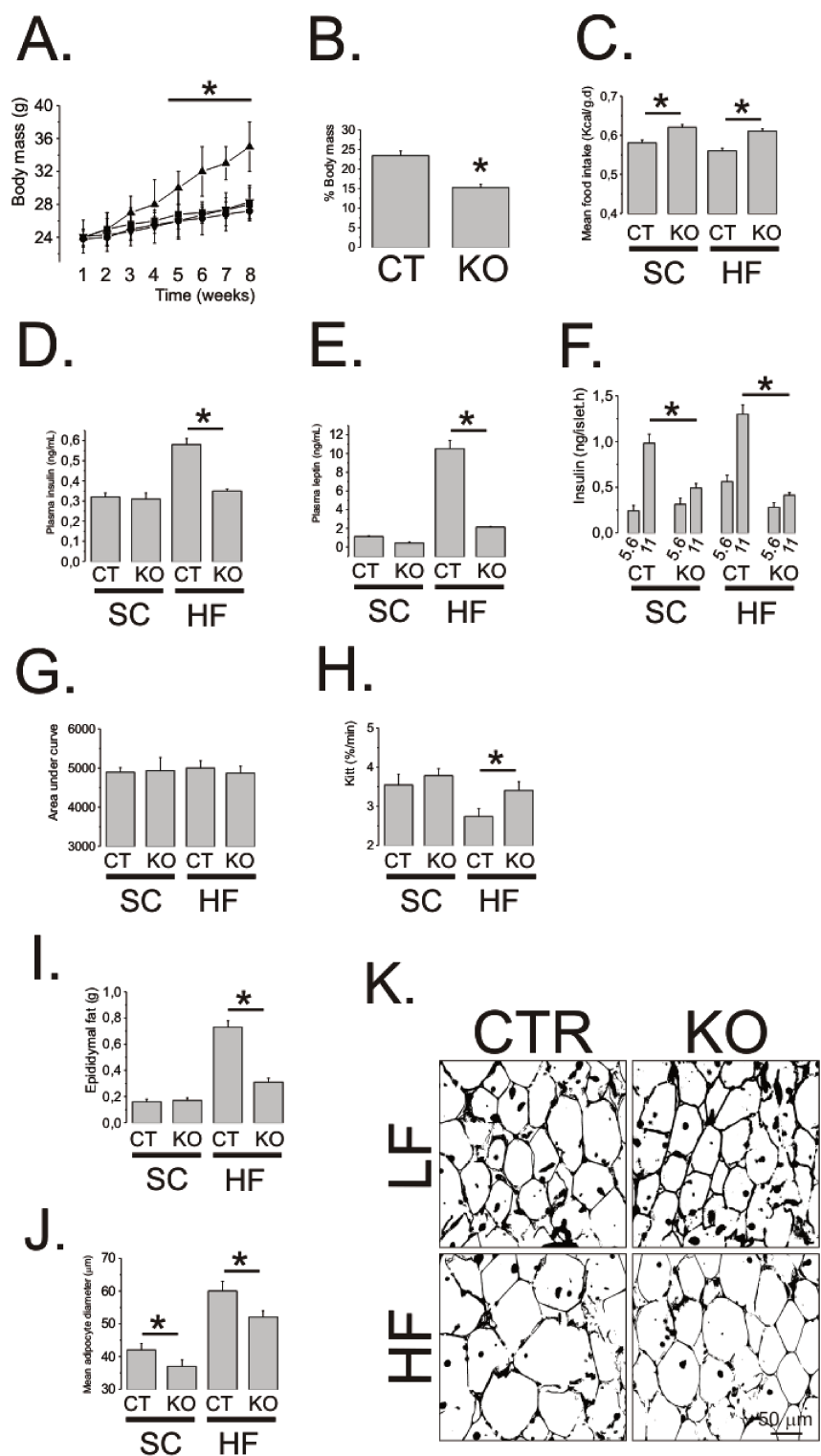
Figure 2. (A) The association of TNFR2 with TRAF2 was evaluated by immunoprecipitation (IP) followed by immunoblotting (IB) of total protein samples from spleen and thymus of control (CT) and TNFR1 KO (KO) mice treated iv with saline (-) or TNF- α (100 μ L, 10^{-8} M) (+). (B) CT and KO mice fed on high-fat diet were treated with a TNFR2 antibody (T2Ab) or a pre-immune serum (PS) for three weeks and body mass change (expressed as %) was obtained from the difference between final and initial body masses. (C) CT and KO mice fed on standard rodent chow (SC) or high-fat diet (HF) were treated for three weeks with T2Ab or PS and mean caloric intake was obtained from the daily determination of food consumption. (D) The association of TNFR2 with TRAF2 was evaluated by IP followed by IB of total protein samples from spleen and thymus of CT and KO mice treated for three weeks with T2Ab (+) or PS (-) and acutely treated iv with saline (-) or TNF- α (100 μ L, 10^{-8} M) (+). In all experiments $n = 5$. In A and D, membranes were reblotted with anti-TNFR2 antibody.

Figure 3. (A) The effect of leptin on inhibition of food intake was determined in control (CT) and TNFR1 KO (KO) mice fed on standard rodent chow (SC) or high-fat diet (HF) for 8 weeks and treated with a single ip dose of leptin (10 μ L/g, 10^{-6} M); results are expressed as % change in food intake, as compared with mice of respective groups treated ip with saline. Tyrosine phosphorylation of JAK2 (B), serine phosphorylation of FOXO1 (C) and tyrosine phosphorylation of STAT3 (D) were determined by immunoblot in the hypothalami of CT and KO mice fed on SC or HF diet for 8 weeks and treated ip with a single dose of leptin (10 μ L/g, 10^{-6} M) (+) or similar volume of saline (-). The protein amount of SOCS3 (E) was determined in the hypothalami of CT and KO mice fed on SC or HF diet for 8 weeks. For control of gel loading, membranes were reblotted with β -actin (B, C and E) or STAT3 (D) antibodies. The mRNA expressions of NPY (F), POMC (G), TRH (H) and MCH (I) were determined by real-time PCR. In all experiments, $n = 5$; * $p < 0.05$.

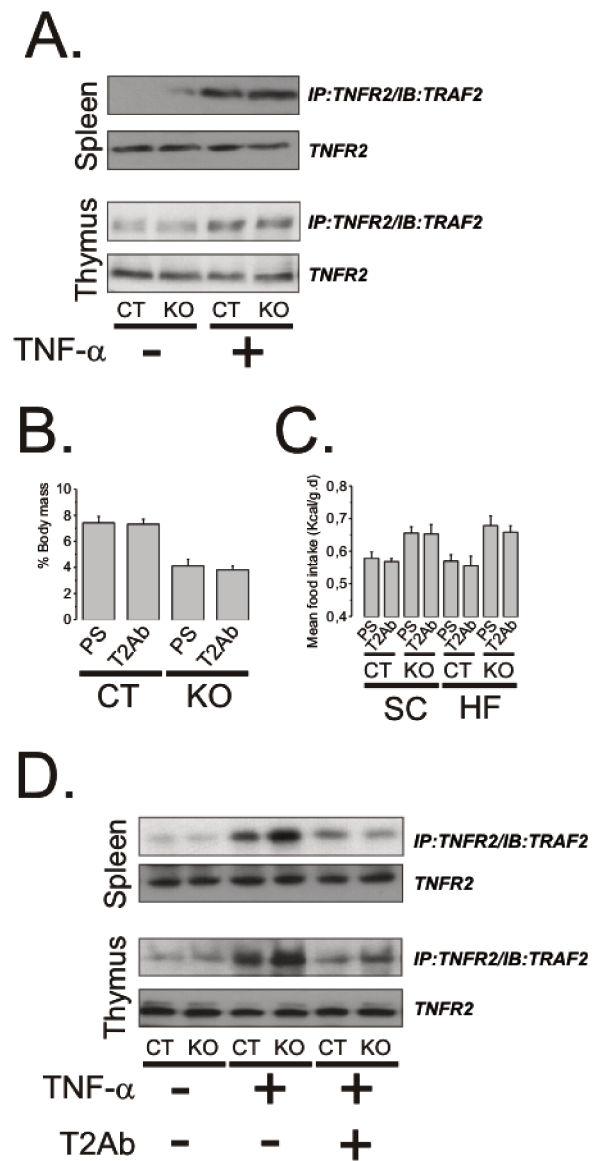
Figure 4. Oxygen consumption (A), carbon dioxide production (B) and respiratory exchange ratio (RER) (C) were determined in control (CT) and TNFR1 KO (KO) mice fed for eight weeks on standard rodent chow (SC) or high-fat diet (HF). In all experiments, $n = 5$; * $p < 0.05$.

Figure 5. Uncoupling protein 1 (UCP1) (A) and cytochrome C (Cyt-C) (B) were determined by immunoblot in total protein extract samples of brown adipose tissue (BAT) of control (CT) and TNFR1 KO (KO) mice fed for eight weeks on standard rodent chow (SC) or high-fat diet (HF). (C) Macroscopic aspect of the BAT and the mass of BAT relative to total body mass (D) were evaluated at the end of the experimental period, as well as the microscopic aspect of BAT stained by the hematoxylin-eosin method (E) and the relative quantification of fat area in histological samples (F). Uncoupling protein 3 (UCP3) mRNA (G) and Cyt-C protein (H) were determined in skeletal muscle by real-time PCR and immunoblot, respectively. Oxygen consumption by skeletal muscle mitochondria was determined by an *ex vivo* respirometry assay (I). In all experiments, n = 5; *p<0.05. In A, B and H, membranes were reblotted with anti- β -actin antibody.

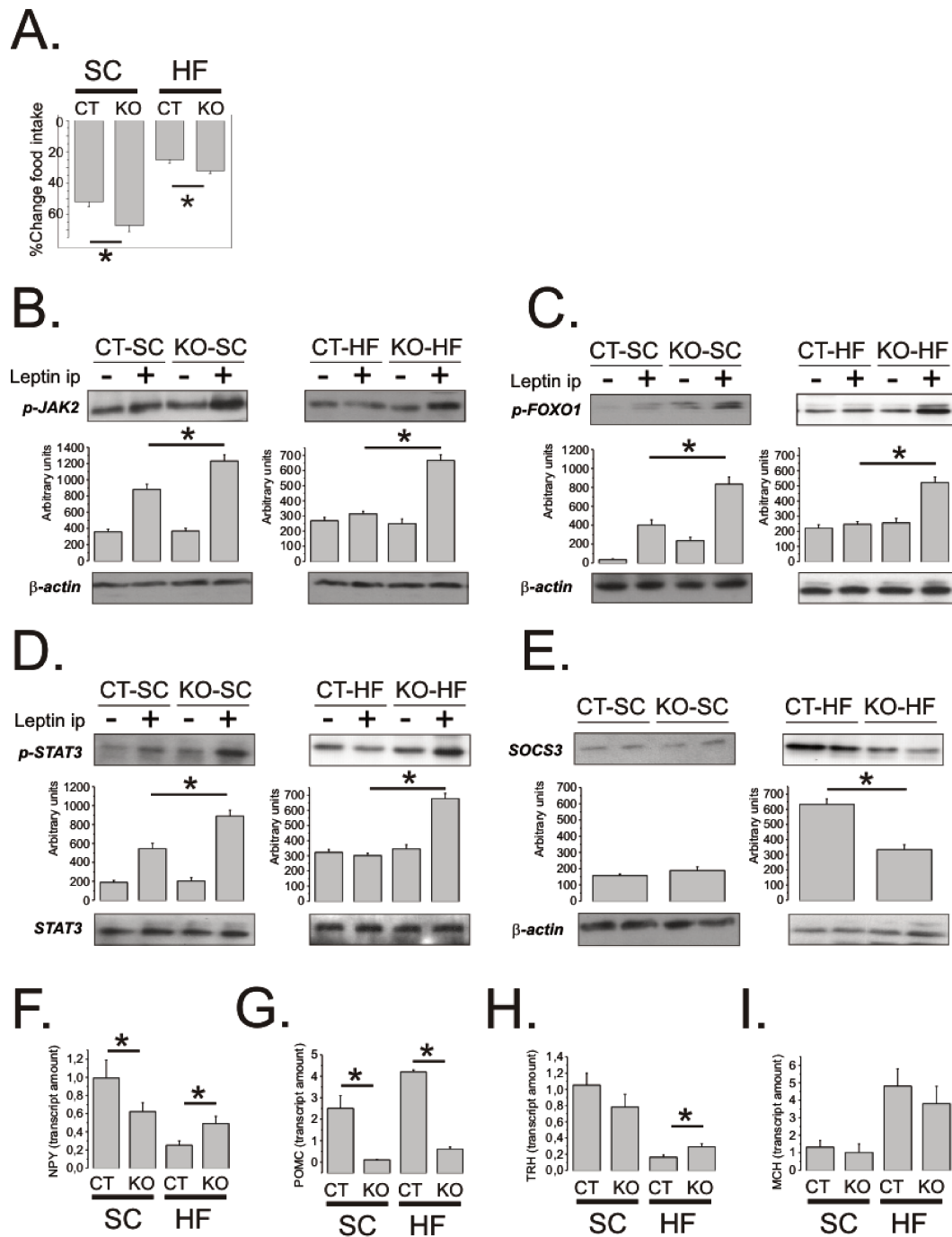
Figure 6. Oxygen consumption (A), carbon dioxide production (B) and respiratory exchange ratio (RER) (C) were determined. Wistar rats fed on standard rodent chow (SC) or high-fat diet (HF and HFI) for eight weeks and treated icv with saline (SC and HI) or infliximab (0.6 μ g/dose; 2.0 μ L once a day for seven days) (HFI). N = 5; *p<0.05.



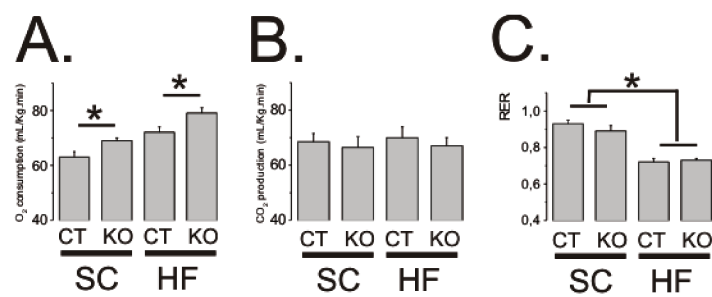
Romanatto Fig 1



Romanatto Fig 2



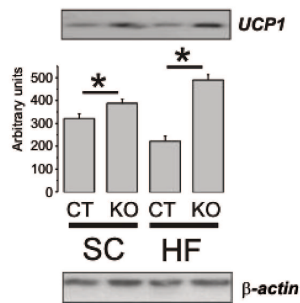
Romanatto Fig 3



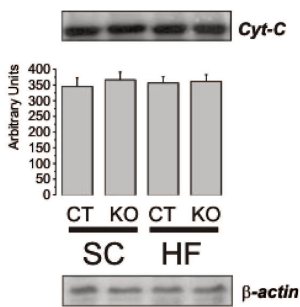
Romanatto Fig 4

BAT

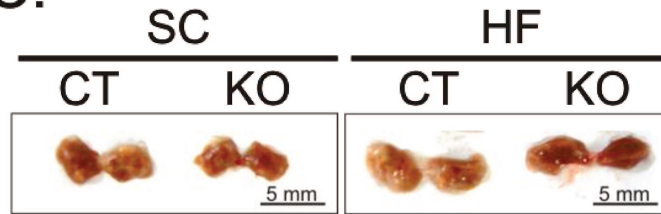
A.



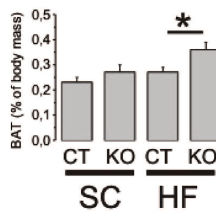
B.



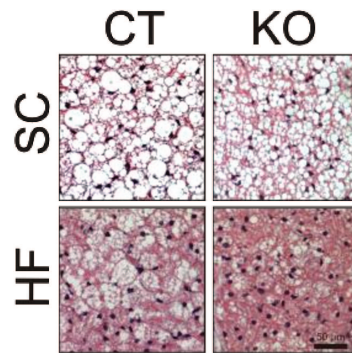
C.



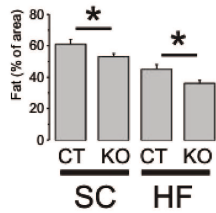
D.



E.

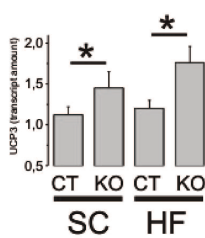


F.

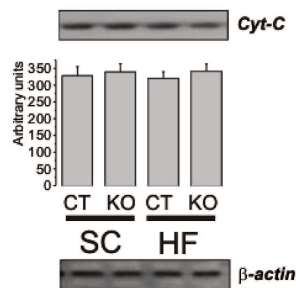


Skeletal muscle

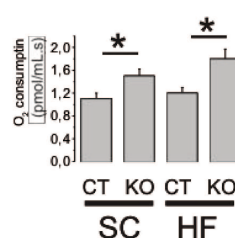
G.



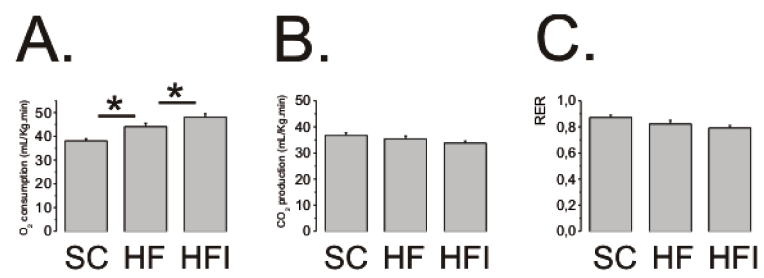
H.



I.



Romanatto Fig 5



Romanatto Fig 6

CONCLUSÃO

De acordo com o trabalho realizado concluímos que o receptor 1 de TNF- α , TNFR1 está envolvido no controle do gasto energético em camundongos. A ausência do TNFR1:

- Protege contra a obesidade apesar de hiperfagia em ambas as dietas administradas;
- Mantêm as concentrações de insulina e leptina nos níveis normais mesmo após o consumo de dieta hiperlipídica;
- Proporciona a manutenção da função das células β pancreáticas e da sensibilidade à insulina;
- Promove redução no acúmulo de gordura epididimal e redução do tamanho dos adipócitos;
- Proteção contra a resistência hipotalâmica à via da leptina;
- Aumento da termogênese.

Em resumo, a ausência do TNFR1 promove proteção contra a obesidade induzida por dieta hiperlipídica por aumento no gasto energético. Esse estudo mostra que a via de sinalização do TNF- α , através do TNFR1 é um importante mecanismo relacionado à obesidade induzida por dieta hiperlipídica, controlando predominantemente o gasto energético.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature* 2000;404(6778):635-43.
2. Jung, RT. Obesity as a disease. *Br Med Bull* 1997; 53:307-321.
3. Farooqi S, O'Rahilly S. Genetics of obesity in humans. *Endocr Rev* 2006;27(7):710-8.
4. Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 2006; 443:289–295.
5. Horvath TL. The hardship of obesity: a softwired hypothalamus. *Nat Neurosci* 2005;8:561-565.
6. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994;372:425-32.
7. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Wool EA, Monroe CA, Tepper RI. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 1995;83:1263-71.
8. Tartaglia LA. The leptin receptor. *J Biol Chem* 1997;272:6093-6.
9. Bjorbaek C, Uotani S, da Silva B, Flier JS. Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor. *J Biol Chem* 1997;272:32686-95.
10. Bjorbaek C, Kahn BB. Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Recent Prog Horm Res* 2004;59:305-31.

11. Carvalheira JB, Siloto RM, Ignacchitti I, Brenelli SL, Carvalho CR, Leite A, Velloso LA, Gontijo JA, Saad MJ. Insulin modulates leptin-induced STAT3 activation in rat hypothalamus. *FEBS Lett* 2001;500:119-24.
12. Carvalheira JB, Ribeiro EB, Folli F, Velloso LA, Saad MJ. Interaction between leptin and insulin signaling pathways differentially affects JAK-STAT and PI 3-kinase-mediated signaling in rat liver. *Biol Chem* 2003;384:151-9.
13. Carvalheira JB, Torsoni MA, Ueno M, Amaral ME, Araujo EP, Velloso LA, Gontijo JA, Saad MJ. Cross-talk between the insulin and leptin signaling systems in rat hypothalamus. *Obes Res* 2005;13:48-57.
14. Ruan H and Lodish H F. Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor-alpha. *Cytokine Growth Factor* 2003; Rev 14, 447-455.
15. Ahren B, Sauerberg P, Thomsen C et al. Increased insulin secretion and normalization of glucose tolerance by cholinergic agonism in high fat-fed mice *Am J Physiol* 1999; 277(1 Pt 1): E93-102.
16. Boschero A.C. Acoplamento da estimulação-secreção de insulina pelas células beta pancreáticas ABE&M 1996; 40(3):149-155.
17. Torsoni MA, Carvalheira JB, Pereira-Da-Silva M, de Carvalho-Filho MA, Saad MJ, Velloso LA. Molecular and functional resistance to insulin in hypothalamus of rats exposed to cold. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003;285: 216-23.

18. Folli F, Bonfanti L, Renard E, Kahn CR, Merighi A. Insulin receptor substrate-1 (IRS-1) distribution in the rat central nervous system. *J Neurosci* 1994;14:6412-22.
19. de LAFML, Saad MJ, Velloso LA. Insulin induces tyrosine phosphorylation of the insulin receptor and SHC, and SHC/GRB2 association in cerebellum but not in forebrain cortex of rats. *Brain Res* 1999;826:74-82.
20. Flier JS. Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell* 2004;116:337-50.
21. Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Jr., Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature* 2000;404:661-71.
22. Xu AW, Kaelin CB, Takeda K, Akira S, Schwartz MW, Barsh GS. PI3K integrates the action of insulin and leptin on hypothalamic neurons. *J Clin Invest* 2005;115:951-8.
23. Pereira-da-Silva M, Torsoni MA, Nourani HV, Augusto VD, Souza CT, Gasparetti AL, Carvalheira JB, Ventrucchi G, Marcondes MC, Cruz-Neto AP, Saad MJ, Boschero AC, Carneiro EM, Velloso LA. Hypothalamic melanin-concentrating hormone is induced by cold exposure and participates in the control of energy expenditure in rats. *Endocrinology* 2003;144:4831-40.
24. Nandi A, Kitamura Y, Kahn CR, Accili D. Mouse models of insulin resistance. *Physiol Rev* 2004;84:623-47.
25. El-Haschimi K, Pierroz DD, Hileman SM, Bjorbaek C, Flier JS. Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity. *J Clin Invest* 2000;105:1827-32.

26. Alexander WS, Hilton DJ. The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response. *Annu Rev Immunol* 2004;22:503-29.
27. Bjorbaek C, El-Haschimi K, Frantz JD, Flier JS. The role of SOCS-3 in leptin signaling and leptin resistance. *J Biol Chem* 1999; 274:30059-65.
28. Howard JK, Cave BJ, Oksanen LJ, Tzamelis I, Bjorbaek C, Flier JS. Enhanced leptin sensitivity and attenuation of diet-induced obesity in mice with haploinsufficiency of Socs3. *Nat Med* 2004; 10:734-8.
29. Celi FS. Brown adipose tissue--when it pays to be inefficient. *N Engl J Med* 2009; 360(5):1553-6.
30. Lowell BB, Spiegelman BM. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature* 2000; 404:652-60.
31. Silva, J.E. Thermogenic mechanisms and their hormonal regulation. *Physiol Rev* 2006; 86:435-64.
32. Cannon, B and Nedergaard, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 2004; 84:277-359.
33. Ricquier D. Fundamental mechanisms of thermogenesis. *Comptes Rendus Biologies* 2006; 329 : 578-586.
34. Block BA. Thermogenesis in muscle. *Annu Rev Physiol*.56:535-77, 1994.
35. Reyne Y, Nougues J, Cambon B, Viguerie-Bascands N, Casteilla L. Expression of c-erbA alpha, c-erbA beta and Rev-erbA alpha mRNA during

- the conversion of brown adipose tissue into white adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol* 1996;116(1):59-65.
36. Cambon B, Reyne Y, Nougès In vitro induction of UCP1 mRNA in preadipocytes from rabbit considered as a model of large mammals brown adipose tissue development: importance of PPARgamma agonists for cells isolated in the postnatal period. *J. Mol Cell Endocrinol* 1998;146(1-2):49-58.
 37. Huttunen P, Hirvonen J, Kinnula V. The occurrence of brown adipose tissue in outdoor workers. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1981;46:339-45.
 38. English JT, Patel SK, Flanagan MJ. Association of pheochromocytomas with brown fat tumors. *Radiology* 1973;107:279.
 39. Timmons JA, Wennmalm K, Larsson O, Walden TB, Lassmann T, Petrovic N, et al. Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages. *Proceedings of the National Academy Science* 2007; 104: 4401-4406.
 40. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 2004;84:277-359.
 41. Silva JE, Larsen PR. Adrenergic activation of triiodothyronine production in brown adipose tissue. *Nature* 1983;305: 712-3.
 42. Nicholls D G. A history of UCP1. *Biochemical Society Transactions* 2001; 29: 751-755.
 43. Argyropoulos G, Harper ME. Uncoupling proteins and thermoregulation. *J Appl Physiol* 2002; 92:2187-98.
 44. Spangenburg EE, Booth FW. Molecular regulation of individual skeletal muscle fibre types. *Acta Physiologica Scandinavia* 2003; 178:413-424.

45. Cadenas S, Buckingham JA, Samec S, Seydoux J, Din N, Dulloo AG, Brand MD. UCP2 and UCP3 rise in starved rat skeletal muscle but mitochondrial proton conductance is unchanged. *FEBS Lett* 1999; 462:257–260.
46. Gong DW, Monemdjou S, Gavrilova O, Leon LR, Marcus-Samuels B, Chou CJ, Everett C, Kozak LP, Li C, Deng C, Harper ME, Reitman ML. Lack of obesity and normal response to fasting and thyroid hormone in mice lacking uncoupling protein-3. *J. Biol. Chem* 2000; 275:16251–16257.
47. Mills EM, Banks ML, Sprague JE, Finkel T. Pharmacology: uncoupling the agony from ecstasy. *Nature*, 426:403–404, 2003.
48. Choi CS, Fillmore JJ, Kim JK, Liu ZX, Kim S, Collier EF *et al.* Overexpression of uncoupling protein 3 in skeletal muscle protects against fat-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 2007; 117:1995-2003
49. Lowell BB, Spiegelman BM. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature* 2000; 404(6778):652-60.
50. Wellen K E, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 2005; 115:1111–1119.
51. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 2006; 444:860-867.
52. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993; 259: 87–91.
53. Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. *Nature* 1997;389:610-14.

54. Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawes A, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS, Klein S, Coppack SW. Subcutaneous Adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor, in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:4196-200.
55. Bastard JP, Maachi M, Van Nhieu JT, Jardel C, Bruckert E, Grimaldi A, Alessi MC, Alessi JC, Alessi JP, Alessi MC, Alessi JC, Alessi JP. Adipose tissue IL6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both in vivo and in vitro. *Journal Clin Endr Metabolism* 2002; 87, 2084-2089.
56. Aronson D, Bartha P, Zinder O, Kerner A, Markiewicz W, Avizohar O, Brook GJ, Levy Y. Obesity is the major determinant of elevated C-reactive protein in subjects with the metabolic syndrome. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004; 28:674-9.
57. Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J, Shoelson SE. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK- β and NF- κ B. *Nature Medicine* 2003; 11: 183-190.
58. Weisberg SP, Mccann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *The J J Clin Invest* 2003; 112: 1796- 1807.
59. De Souza CT, Araujo EP, Bordin S, Ashimine R, Zollner RL, Boschero AC, Saad MJ, Velloso LA. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology* 2005;146:4192–99.
60. Carswell E.A, Old L J, Kassel R L, Green S, Fiore N, Williamson, B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975; 72: 3666-3670.

61. Beutler B, Greenwald D, Hulmes J D, Chang M, Pan YC, Mathison J *et al.* Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature* 1985; 316: 552-554.
62. Lawson DH, Richmond A, Nixon, DW, Rudman D. Metabolic approach to cancer cachexia. *Annu. Rev .Nutr* 1996; 2: 277-301.
63. Romanatto T, Cesquini M, Amaral ME, Roman EA, Moraes JC, Torsoni MA, Cruz-Neto AP, Velloso LA. TNF- α acts in the hypothalamus inhibiting food intake and increasing the respiratory quotient – effects on leptin and insulin signaling pathways. *Peptides* 2007;28:1050–58.
64. Torsoni MA, Carvalheira JB, Pereira-Da-Silva M, de Carvalho-Filho MA, Saad MJ, Velloso LA. Molecular and functional resistance to insulin in hypothalamus of rats exposed to cold. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003;285:E216–E223.
65. De Souza CT, Pereira-da-Silva M, Araujo EP, Morari J, Alvarez-Rojas F, Bordin S, Moreira- Filho DC, Carvalheira JB, Saad MJ, Velloso LA. Distinct subsets of hypothalamic genes are modulated by two different thermogenesis-inducing stimuli. *Obesity (Silver Spring)* 2008;16:1239-47.
66. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 2006;444:860-867.
67. Hehlhans T, Pfeffer K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 2005;115:1-20.
68. Hotamisligil GS. Inflammatory pathways and insulin action. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003; 27 *Suppl 3*: S53-55.

69. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 2001;104:487-501.
70. Rothe M, Wong SC, Henzel WJ, Goeddel DV. A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 1994; 78: 681-692.
71. Hsu, H., Shu, H.B., Pan, M.G. and Goeddel, D.V. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* 1996; 84: 299-308.
72. Hsu H, Xiong J, Goeddel DV. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 1995; 81, 495-504.
73. Ting AT, Pimentel-Muinos FX, Seed B. RIP mediates tumor necrosis factor receptor 1 activation of NF-kappaB but not Fas/APO-1-initiated apoptosis. *EMBO J* 1996; 15: 6189-6196.
74. Uysal KT, Wiesbrock SM, Hotamisligil GS. Functional analysis of tumor necrosis factor (TNF) receptors in TNF-alpha-mediated insulin resistance in genetic obesity. *Endocrinology* 1998;139:4832-38.
75. Schreyer SA, Chua SC, Jr., LeBoeuf RC. Obesity and diabetes in TNF-alpha receptor- deficient mice. *J Clin Invest* 1998;102:402-11.
76. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72, 248-254.

77. Velloso LA, Folli F, Sun XJ, White MF, Saad MJ, and Kahn CR. Cross-talk between the insulin and angiotensin signaling systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93, 12490-12495.
78. Bonora E, Manicardi V, Zavaroni I, Coscelli C, Butturini U. Relationships between insulin secretion, insulin metabolism and insulin resistance in mild glucose intolerance. *Diabetes Metab* 1987; 13:116–121.

APÊNDICE

Materiais e Métodos

Animais experimentais

Foram utilizados camundongos knockout para o receptor 1 de TNF- α , TNFR-1, e seu respectivo background, C57BL6, que foram divididos em 4 grupos a partir da oitava semana de vida:

- Controle (C57BL6) tratados com dieta padrão (Ração)
- Controle (C57BL6) tratados com dieta hiperlipídica
- Knockout (KO) tratados com dieta padrão (Ração)
- Knockout (KO) tratados com dieta hiperlipídica

Foram também utilizados ratos machos, da linhagem Wistar entre oito e dezesseis semanas de idade, provenientes do Biotério Central da UNICAMP (CEMIB) para os experimentos de respirometria. Os animais foram divididos em 3 grupos:

- Controle: tratados com ração padrão, ad libitum;
- Dieta por 8 semanas, tratados com Infliximab 0.6 μ g/dose (2.0 μ l ICV, uma vez por dia durante sete dias)
- Dieta por 8 semanas, tratados com salina ICV.

Tabela 1. Composição de macronutrientes das dietas.

	Dieta padrão		Dieta hiperlipídica	
	g%	kJ%	g%	kJ%
Proteína	20	19	20	14
Carboidrato	76	72	45	31
Gordura saturada	4	9	35	55
kJ/g	17,5		24,1	

Cirurgia Estereotáxica

Ao atingirem oito semanas de idade, os ratos foram submetidos à dieta hiperlipídica (2 grupos) ou ração padrão por 8 semanas. Após esse período, foi realizada a canulação do ventrículo lateral. Os animais (250 – 350 g) foram previamente anestesiados por via intraperitoneal com uma mistura de 70 % cloridrato de cetamina (50 mg/ml) e 30 % de diazepam (5,0 mg/ml). Depois de testados e garantidos os reflexos corneal e pedioso, os animais foram posicionados no aparelho de estereotaxia para implantação de uma cânula no ventrículo lateral do hipotálamo, seguindo as coordenadas do Atlas Paxinos-Watson (49) que variam de acordo com o peso do animal. Em ratos de aproximadamente 300 g as coordenadas utilizadas foram AP: 0,2 mm; lateral: 1,5 mm; profundidade: 4,0 mm.

Infusão intracerebroventricular

Após o período de uma semana de recuperação da cirurgia estereotáxica, os animais foram submetidos a um teste de resposta de ingestão hídrica subsequente ao tratamento com angiotensina II (2,0 μ L de solução 10^{-6} M) para avaliação da adequação da posição da cânula. Ratos com resposta positiva à angiotensina II foram selecionados e utilizados nos experimentos.

Para a infusão intracerebroventricular foi utilizada uma seringa Hamilton (50 μ L) acoplada, por meio de uma cânula plástica, a uma agulha 30 G, de modo que esta ultrapassasse o comprimento da cânula metálica (0,1 - 0,2 mm) garantindo a entrada do líquido no ventrículo lateral.

Os animais foram randomicamente divididos em 3 grupos e tratados por via intracerebroventricular (ICV) com 2 μ L uma vez ao dia por sete dias com: Infliximab 0.6 μ g/dose (2 grupos) ou salina (1 grupo).

Avaliação da ingestão alimentar

Os animais foram colocados individualmente em gaiolas metabólicas e mantidos em jejum por 6 horas. Às 19h o alimento foi introduzido e a ingestão de 12 horas foi determinada pela aferição da diferença de peso entre o alimento oferecido e o alimento restante na gaiola. Para avaliação da ingestão alimentar com estímulo de leptina (10^{-6} M), esta foi infundida intraperitonealmente na dose de 10 μ L/g e a ingestão foi medida após 3 horas.

Dissecção do hipotálamo e tecido adiposo marrom

Os animais foram anestesiados através da administração intraperitoneal de tiopental sódico (15mg/kg) e a perda dos reflexos pedioso e corneano foram utilizados como controle da anestesia. O tecido adiposo marrom foi retirado e previamente dissecado. Após a retirada deste, o crânio foi aberto, o hipotálamo retirado e em seguida ambos os tecidos foram homogeneizados em aproximadamente 10 volumes de tampão de solubilização (1% Triton X-100; 100mM Tris pH 7,4; contendo 100mM de pirofosfato de sódio; 100mM de fluoreto de sódio; 10mM de vanadato de sódio; 2mM PMSF e 0,1 mg de aprotinina/ml) a 4° em “Politron PTA 20S generator” (Brinkmann Instruments mode PT 10/35) com velocidade máxima por 30 segundos. Os homogeneizados foram então centrifugados a 11.000 rpm por 30 minutos para remoção de material insolúvel. No sobrenadante foi determinada a concentração de proteínas utilizando o método de Bradford (76).

Imunoprecipitação

Para verificar a associação entre TNFR2 e TRAF2 e a fosforilação em tirosina de STAT3 foi empregado o método de imunoprecipitação. As amostras solubilizadas foram centrifugadas a 11.000 rpm por 30 min a 4 °C e o sobrenadante foi retirado para imunoprecipitação. Os volumes das amostras foram normalizados por concentração protéica (1,0 mg de proteína total por amostra). As amostras foram incubadas por 12 a 14 horas, a 4 °C com anticorpos específicos. Após incubação, os imunocomplexos foram recuperados com Proteína A Sepharose 6MB por 2

horas a 4 °C e decantados por centrifugação por 15 minutos a 4 °C/11.000 rpm. O precipitado foi lavado três vezes, em intervalos de 5 minutos, com tampão de lavagem contendo: 2,0 mM ortovanadato de sódio, 100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA e 0,5% Triton X-100. O sobrenadante foi descartado restando apenas as proteínas precipitadas (imunocomplexos) (77). Os imunocomplexos foram ressuspensos em 25 µl de tampão de Laemmli, contendo 100 mmol/L de DTT.

Western blots

Os extratos totais contendo 0,2 mg de proteína foram ressuspensos em tampão de Laemmli, contendo 100 mmol/l de DTT. Após rápida fervura (2 minutos) foram aplicados em gel de poliacrilamida para separação por eletroforese (SDS-PAGE). As proteínas separadas por SDS-PAGE foram transferidas para membrana de nitrocelulose em aparelho de transferência da BIO-RAD. A membrana de nitrocelulose foi incubada overnight com anticorpo específico. A ligação do anticorpo a proteínas não específicas foi minimizada pela pré-incubação da membrana de nitrocelulose com tampão de bloqueio (5% de leite em pó desnatado; 10mmol/l de Tris, 150mmol/l de NaCl, 0,02% de Tween 20) por 2 horas. O sinal foi detectado por tratamento com 2µCi de [125] Proteína A (30µCi/µg) em 10 ml de tampão de bloqueio por 2 horas em temperatura ambiente e exposição a filmes de RX Kodak a -80°C de 12-48 horas. As bandas identificadas na autoradiografia foram quantificadas através de densitometria óptica (77).

Os anticorpos utilizados foram: TNFR-1: sc-8436, mouse; TNFR-2: sc-8041, mouse; TRAF-2: sc-137048, mouse; p-JAK2: sc-16566R, rabbit; STAT-3: sc-483, goat; p-Tyr: sc-508, rabbit; SOCS-3: sc-7009, rabbit; p-Akt: sc-7985, rabbit; p-FOXO: 9461 (Cell Signaling), rabbit; UCP-1: sc-6529, goat. sc: Santa Cruz Biotechnology; Citocromo c: #7H8.2C12, mouse (BD Bioscience)

Histologia convencional

Os animais (camundongos) foram previamente anestesiados com tiopental sódico (15mg/kg) e após testados os reflexos pedioso e corneano, os tecidos adiposo branco e adiposo marrom foram retirados, dissecados e armazenados em formalina 3% durante 3 semanas e após esse período foram processados para histologia convencional. A coloração utilizada foi Hematoxilina-Eosina (HE).

Extração de RNA

A extração de RNA total foi realizada para hipotálamo e músculo segundo método do reagente Trizol (Invitrogen). Para a produção do DNAc, utilizamos o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems), sendo a concentração final do DNAc de 3 µg para os experimentos subseqüentes.

PCR quantitativo (qPCR) – Real Time PCR

As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando-se o sistema TaqMan™ (Applied Biosystems), que é constituído por um par de primers e uma sonda marcada com um fluoróforo. Para cada gene foram utilizados os seguintes primers:

- Mm01249143_g1 - SOCS 3
- Mm00494077_m1 - UCP3
- Mm00445771_m1 - NPY
- Mm00435874_m1 – POMC

O gene GAPD (TaqMan™ - Applied Biosystems) foi escolhido como controle endógeno da reação, o qual serve para normalizar a expressão do gene de interesse nas diferentes amostras. A sonda GAPD está marcada com o fluoróforo VIC.

Antes de se iniciarem os experimentos de quantificação relativa da expressão de qualquer gene, fizemos a validação do sistema para os genes TNFRSF-1a e para o controle endógeno (GAPD), a fim de se verificar se as

eficiências de amplificação de ambos os genes são semelhantes e próximas a 100%. Esse passo é essencial para que o controle endógeno possa ser utilizado para normalizar os valores de expressão relativa do gene de interesse. A validação consiste na amplificação, tanto com os primers do gene de interesse quanto do controle endógeno, dos cDNAs de triplicatas de 7 concentrações diferentes (diluições seriadas de 3 vezes) de uma amostra escolhida aleatoriamente. Em seguida, construímos uma curva padrão a partir do logaritmo da concentração das amostras pelo Ct (Threshold Cycle): ciclo em que cada curva de amplificação atravessa o limiar de detecção (Threshold), o qual é definido arbitrariamente). Nessa curva, são obtidos os valores da inclinação (slope) da curva e da confiabilidade das réplicas (R2). Dessa forma, a eficiência de um sistema é calculada através da fórmula: $E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$. Para a placa de validação de cada gene foram feitas triplicatas da amostra de cDNA de hipotálamo de rato referentes aos tratamentos citados acima em 7 concentrações diferentes.

Após o cálculo das eficiências de amplificação do gene de interesse e do controle endógeno, foi construído um gráfico de dispersão, o qual tem por finalidade definir qual é a amplitude de concentrações para as quais o sistema é eficiente. Para a construção do gráfico, foram utilizados os mesmos valores de logaritmo da concentração das amostras no eixo X e a diferença entre as médias dos Cts do controle endógeno e as médias dos Cts do gene de interesse para cada concentração no eixo Y. A seguir, obtém-se uma linha de tendência para estes valores, a qual possui uma equação de reta na qual é possível verificar o valor da inclinação desta reta. Para que um sistema seja considerado eficiente, o valor da inclinação deve ser menor que 0,1 (quanto mais próximo de zero for este valor, menor é a inclinação da curva e, portanto, mais constante é a diferença entre as médias dos Cts do gene de interesse e do controle endógeno). Os pontos no gráfico, correspondentes às concentrações, que estiverem mais próximos à linha de tendência são considerados validados (o sistema tem 100% de eficiência nestas concentrações).

Para a quantificação relativa do gene em estudo, as reações de PCR em tempo real foram realizadas em triplicata a partir de: 6,25µL de TaqMan Universal

PCR Master Mix 2x, 0,625µL da solução de primers e sonda, 1,625µL de água e 4,0µL de cDNA, sendo que no controle negativo, foi adicionado 4,0 µL de água ao invés do cDNA. As condições de ciclagem utilizadas foram: 50oC por 2 minutos, 95oC por 10 minutos e 40 ciclos de 95oC por 15 segundos e 60oC por 1 minuto. Os valores da expressão gênica relativa foram obtidos pela análise dos resultados no programa 7500 System SDS Software (Applied Biosystems). No programa BioEstat 3.0 , foram realizados os testes estatísticos ANOVA 2 fatores com replicação (análise de variância) e Kruskal-Wallis para verificar se havia diferença significativa na expressão do gene de interesse.

Consumo de O₂ e produção de CO₂ em camundongos

O consumo de O₂, liberação de CO₂ e RER foram determinados através do analisador de gases (Columbus Instruments, Ohio, EUA). Os animais foram manipulados e adaptados na câmara do analisador de gases uma semana antes das mensurações. Os ratos foram pesados imediatamente antes das análises. Após um período de estabilização de 10 min, as determinações foram realizadas durante um período de 5 min. A ração foi retirada 3 h antes das mensurações. Esse procedimento foi repetido em três dias consecutivos, sempre no período da manhã.

Respiração mitocondrial

Para as medidas de consumo de oxigênio mitocondrial, um pequeno pedaço (1-2 mg) de músculo esquelético (*Soleus*) foi colocado em uma placa de Petri com cerca de 1 ml de um tampão de relaxamento composto de Ca²⁺/EGTA (10 mM), cálcio livre (0.1 µM), imidazol (20 mM), K⁺/4-morpholinoethanesulfonic acid (MES) (50 mM), dithiothreitol (DTT; 0.5 mM), MgCl₂ (6.56 mM), ATP (5.77 mM), fosfocreatina (15 mM), pH 7.1. As fibras musculares foram cuidadosamente dissecadas utilizando pinças adequadas. As fibras foram permeabilizadas por 30 min em 3 ml de meio de relaxamento gelado contendo saponina (50 µg/ml). As fibras foram lavadas com meio de relaxamento sem saponina duas vezes por 10 minutos. As fibras foram imediatamente transferidas para o respirômetro

(Oxygraph-2k; Oroboros) contendo o meio de respiração saturado com ar a 37°C. A composição do meio de respiração (MiR05; Oroboros, Innsbruck, Austria) foi: sacarose (110 mmol/l), lactobionato de potássio (60 mmol/l), EGTA (0.5 mmol/l), MgCl₂.6H₂O (3 mmol/l), taurina (20 mmol/l), KH₂PO₄ (10 mmol/l), HEPES (20 mmol/l), BSA (2 mg/ml), pH 7.1. A respiração foi medida na presença de piruvato + malato (5mM) e ADP (estado III) e oligomicina (inibidor da enzima ATP sintase) (4ug/ml) (estado IV).

Teste intraperitoneal de tolerância à glicose (ipGTT): Após 6 horas de jejum, os animais foram submetidos ao teste intraperitoneal de tolerância à glicose. Os animais foram pesados e em seguida foi realizada a coleta de sangue pela cauda para obtenção da glicemia de jejum (tempo 0) com auxílio de um glicosímetro. Após a medição, os animais receberam uma injeção intraperitoneal de glicose na concentração de 2g/Kg de peso corporal. A glicemia foi verificada aos 15, 30, 60 e 120 min após a administração da glicose. Amostras de sangue foram coletadas nos tempos 0, 30 e 60 para determinação da insulinemia, pelo método de ELISA.

Teste de tolerância à insulina (ITT): Após 6 horas de jejum, os animais foram submetidos ao teste de tolerância à insulina. Os animais foram pesados e em seguida foi realizada a coleta de sangue pela cauda para obtenção da glicemia de jejum (tempo 0) com auxílio de um glicosímetro. Em seguida, os animais receberam uma injeção intraperitoneal de insulina humana na concentração de 0,5U/Kg de peso corporal. Amostras de sangue foram imediatamente coletadas nos tempos 04, 08, 12 e 16 minutos após a injeção para determinação da taxa de decaimento da glicose kITT, através da fórmula: $0.693/t_{1/2}$. (78).

Isolamento das Ilhotas Pancreáticas e incubação com glicose: As ilhotas pancreáticas foram isoladas pelo método da collagenase e em seguida coletadas em uma placa de Petri com auxílio de uma lupa. Após, as ilhotas foram colocadas em uma placa acrílica tipo “Costar” (4 ilhotas por poço). Em seguida, foi adicionado 500 µl de solução Krebs-Ringer (K-R) pH 7.4 (NaCl 120 mM; KCl 5

mM; NaHCO₃ 25 mM; CaCl₂ 2,56 mM; MgCl₂ 1,13 mM), contendo 0,3% de albumina bovina, na presença de 5,6 mM de glicose. As placas foram pré-incubadas na estufa a 37°C por 30 min na presença de carbogênio (mistura de 95% de O₂ e 5% de CO₂). Em seguida, a solução K-R foi retirada e foi adicionado 1 ml de K-R com 5,6 mM ou 11,1 mM de glicose. As placas foram incubadas novamente a 37°C, durante 1 hora na presença de carbogênio. Terminada a incubação as placas foram retiradas da estufa e colocadas sobre o gelo por 10 min. Foram recolhidos 600 µl de solução para posterior dosagem de insulina pelo método de radioemunoensaio.

Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Quando comparados dois grupos, foi utilizado teste t de Student para dados não pareados. Quando necessário foi utilizada análise de variância, seguida de teste para comparação múltipla de médias. Foi adotado o $n \geq 4$ para cada experimento e nível de significância $P < 0,05$.