

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

JOSÉ CARLOS DE LIMA JUNIOR

A DEFICIÊNCIA DE INTERLEUCINA-10 RESULTA EM ANORMALIDADE DE ESTRUTURA E FUNÇÃO DAS MITOCÔNDRIAS DO TECIDO ADIPOSO MARROM

ABNORMAL MITOCHONDRIAL STRUCTURE AND FUNCTION IN IL10 DEFICIENCY

CAMPINAS 2018 JOSÉ CARLOS DE LIMA JUNIOR

A DEFICIÊNCIA DE INTERLEUCINA-10 RESULTA EM ANORMALIDADE DE ESTRUTURA E FUNÇÃO DAS MITOCÔNDRIAS DO TECIDO ADIPOSO MARROM

ABNORMAL MITOCHONDRIAL STRUCTURE AND FUNCTION IN IL10 DEFICIENCY

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Thesis submitted to the Faculty of Medical Sciences of the State University of Campinas as part of the application required to obtain a PhD in science.

ORIENTADOR: LICIO AUGUSTO VELLOSO

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO JOSÉ CARLOS DE LIMA JUNIOR E ORIENTADA PELO PROF. DR. LICIO AUGUSTO VELLOSO

CAMPINAS

2018

Agência(s) de fomento e n°(s) de processo(s): FAPESP, 2013/07607-8; CAPES ORCID: orcid.org/0000-0001-9430-4475

Ficha catalográfica Universidade Estadual de Campinas Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

L628d	Lima Júnior, José Carlos de, 1986- A deficiência de interleucina-10 resulta em anormalidade de estrutura e função das mitocôndrias do tecido adiposo marrom / José Carlos de Lima Júnior. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.
	Orientador: Licio Augusto Velloso. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.
	1. Interleucina-10. 2. Mitocôndrias. I. Velloso, Licio Augusto, 1963 II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Abnormal mitochondrial structure and function in IL10 deficiency Palavras-chave em inglês: Interleukin-10 Mitochondria Área de concentração: Fisiopatologia Médica Titulação: Doutor em Ciências Banca examinadora: Licio Augusto Velloso [Orientador] Fernanda Marques da Cunha Marcio Alberto Torsoni Mariana Kiony Osako Leonardo dos Reis Silveira Data de defesa: 26-01-2018 Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO JOSÉ CARLOS DE LIMA JUNIOR

ORIENTADOR: PROF. DR. LICIO AUGUSTO VELLOSO

MEMBROS:

- 1. PROF. DR. LICIO AUGUSTO VELLOSO
- 2. PROF(A). DR(A). FERNANDA MARQUES DA CUNHA
- 3. PROF. DR. MARCIO ALBERTO TORSONI
- 4. PROF(A). DR(A). MARIANA KIOMY OSAKO

5. PROF. DR. LEONARDO DOS REIS SILVEIRA

Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Data: 26/01/2018

Dedicatória

A memória de minha vó Maria Estelita, professora primária e maior estímulo, a meus pais (José Carlos e Maria Vilani), a minha irmã (Karla Vanessa) e a meu sobrinho (Pedro), que puderam me oferecer de forma desmedida exemplos de moral e coragem que seguem continuamente me espiando e me ensinando à distância como viver.

Ao meu amor Flávia, cujo olhar pode ser Uiara e Penélope simultaneamente, sempre me convidando a regressar.... "Vivia a te buscar / Porque pensando em ti / Corria contra o tempo / Eu descartava os dias / Em que não te vi / Como de um filme / A ação que não valeu / Rodava as horas pra trás / Roubava um pouquinho / E ajeitava o meu caminho / Pra encostar no teu / Subia na montanha / Não como anda um corpo / Mas um sentimento / Eu surpreendia o sol / Antes do sol raiar / Saltava as noites / Sem me refazer / E pela porta de trás / Da casa vazia / Eu ingressaria / E te veria / Confusa por me ver / Chegando assim / Mil dias antes de te conhecer"

("Valsa brasileira". Chico Buarque/Edu Lobo)

Agradecimentos

Amigos que me são como irmãos – Rochelle, fonte mais clara e carinhosa de força e amor que eu poderia ter encontrado por acaso, que se distribui agora com James e o Dudu; Riobaldo, irmão com que venho tropeçando noites adentro; Alexandre Toresan, grande irmão com quem divido a leveza da vida em Campinas e a paixão pela aventura nas montanhas ou na navegação, artes das quais com muito respeito nunca nos aproximamos; Ferdinand e Antônio, as fortalezas à distância, com quem ainda parece que me reúno diariamente. Thiago Quinaglia e Daniel Munhoz, triunvirato terapêutico para almoços rápidos na semana, ou para, agregados, formarmos uma imensa família que cada vez mais se une. Alexandre Moura, amigo de laboratório mais sonhador e sempre pronto a me ajudar, intelectual ou braçalmente. Bruno Chaussê e sua encantadora família, que sempre me recebem com amor e me deram repetidos exemplos de retidão difíceis de calcular, e que – finalmente – é meu guia pela retidão na ciência e pelo amor à cidade de São Paulo, agora por Heidelberg.

A meu caro orientador Lício Velloso, que me recebeu com muita confiança e que também me expandiu as fronteiras do conhecimento, e que sem saber me trouxe de volta a um mundo desafiador e amplo.

Ao meu companheiro galináceo que ainda não conheço pessoalmente, também inveterado notívago, mas que canta religiosamente às três da manhã e sobre quem eu jamais saberia não fosse o hábito noturno para escrever esta tese.

Aos amigos que pude admirar na ciência, como cientistas e como pessoas, e que tive a honra da proximidade biográfica e de um tanto de conversa sobre nossa filosofia da ciência versão popular: Andrei Sposito, Aníbal Vercesi, Helena Oliveira e Antônio Carlos Boschero.

Aos companheiros de luta diária no Laboratório de Sinalização Celular: Gabriela, grandessíssima, talvez o começo da minha forte ligação com isso tudo, grande amiga com quem muito dividi; e a Joaninha e ao Humberto, os quais desafiaram as barreiras linguísticas entre o nosso vernáculo e o vernáculo dos colonizadores para me mostrar muitos caminhos na ciência. Aos amigos trabalhadores de plantão pra todas as horas: Nathália Dragão e Nathália Mendes, apaixonados pelo saber científico e sempre prontos para me animar e enfrentar os dias (e noites) longos de trabalho. Ao meu companheiro de trabalho Gerson, que nos conquista com seu mau humor, que é o sentimento que mais transborda do seu grande coração, por ser o mais superficial que ele guarda lá. Ao nosso bioterista Márcio Cruz.

Aos companheiros do andar de cima do prédio do Obesity and Comorbidities Research Center, Tanes e Rafael, com quem tive tantas conversas sobre ciência e método que me serviram de inspiração em tantos momentos, e que continuam ajudando a me guiar nessa trajetória. Ao companheiro Felipe, árduo trabalhador da ciência, agora vizinho de Laboratório. Aos colegas do Aterolab que muito me ensinam – Vitor, Isabela, Michele e Joaquim. E, ainda, Luiz Sérgio, *housemate, workaholic* e inspirado pesquisador.

Aos voluntários humanos que se dispuseram a participar de nosso projeto!

At last but not least, aos amigos-irmãos da vida e do bairro que me viu crescer e hoje calorosamente me recebem sempre com nostalgia, os quais inundaram minha vida com a *orgia perpétua* da literatura e com as artes mais notívagas: Rodrigo Sérvulo, Thiago Pacífico, Daniel Reis, Fábio Rabelo.

Pasmo sempre quando acabo qualquer coisa. Pasmo e desolo-me. O meu instinto de perfeição deveria inibir-me de acabar; deveria inibir-me até de dar começo. Mas distraio-me e faço. O que consigo é um produto, em mim, não de uma aplicação de vontade, mas de uma cedência dela. Começo porque não tenho força para pensar; acabo porque não tenho alma para suspender. Este livro é a minha cobardia.

(Grifo meu. Bernardo Soares, trecho 152. Livro do Desassossego)

Voltando, agora, a falar sobre o seu método de vida e a excelência dos seus meios de instrução, devo informar-lhe que, naquela cidade, as ciências são aprendidas com tanta facilidade que as crianças ficam sabendo num ano o que entre nós só se adquire depois de dez ou quinze anos de estudo. Solicitado a interrogar os alunos, nem sei exprimir-lhe que surpresa tive ao ouvir respostas tão prontas, tão verdadeiras e tão sábias de alguns que falavam correntemente a nossa língua. Para isso, está estabelecido que três de cada manípulo devem aprender o nosso idioma, outros três o árabe, três o polaco e três outras línguas especiais. <u>Antes de se tornarem doutores, não lhes é concedido repouso algum: depois do estudo, vão para o campo, onde se exercitam em corrida, arco, lança, arcabuz, caça, ou em botânica, mineralogia, agricultura, pecuária.</u>

(Tommaso Campanella. Cidade do Sol).

Ele estava ali – foram se aglomerando em volta dele -, e um disse: "Então você se tornou mais um pintor! Teria sido bem melhor se ficasse remendando nossos sapatos".

Ele respondeu-lhes: "Eu os teria remendado, teria carregado pedras por vocês, por vocês teria ido buscar água – teria morrido por vocês -, mas vocês não me quiseram e no vácuo forçado de minha existência espezinhada não me restou nada senão aprender a pintar".

(Pestalozzi. O pintor de homens)

RESUMO

Tecido adiposo branco tem a função de estocar energia na forma de triglicérides em situações de excesso de nutrientes e sofre adaptações metabólicas induzidas por esse excesso nutricional que contribuem para alterações fisiopatológicas da obesidade e diabetes; por sua vez o tecido adiposo marrom (Brown adipose tissue, BAT) é capaz de dissipar energia na forma de calor através de um processo denominado termogênese adaptativa, por meio do qual o organismo pode promover modificações no gasto energético frente a mudanças na disponibilidade de substratos ou mesmo estímulos ambientais. Em parte, a termogênese adaptativa depende de alterações da geração de calor por desacoplamento da força prótonmotora da cadeia transportadora de elétrons por ação da proteína desacopladora 1 (UCP1), presente na membrana mitocondrial interna dos adipócitos marrons e ativada por ácidos graxos livres liberados no ambiente citosólico por lipólise. A lipólise está condicionada a ativação de uma via simpática induzida pelo frio ou por outros estímulos adrenérgicos. A ativação do receptor ß3-adrenérgico é capaz de promover gasto energético pelo tecido adiposo marrom (BAT) ou mesmo promover indução de adipócitos bege, uma subpopulação de adipócitos entremeados ao tecido adiposo branco e marrom expressando UCP1 e com capacidade termogênica. O recrutamento de células precursoras com potencial genético de se transformar em adipócitos marrons, brancos ou beges depende de sinais ambientais. Estudos recentes têm demonstrado que o cross-talk imune-adiposo, principalmente a sinalização celular anti-inflamatória (tipo 2) pode regular a termogênese. Liberação de interleucina-4 por eosinófilos em resposta ao frio é capaz de controlar a síntese de noradrenalina em macrófagos alternativamente ativados a fim de manter o tônus simpático para o desenvolvimento de adipócitos bege, processo celular conhecido como browning, no qual adipócitos branco adquirem fenótipo de adipócitos marrons/bege. Assim, a imunidade inata tipo 2 pode controlar o browning e a termogênese adaptativa. Aqui, nós demonstramos que camundongos deficientes da IL10 (IL10 KO), citocina anti-inflamatória chave da imunidade inata, exibiram piora do gasto energético basal in vivo, bem como menor tolerância ao estresse térmico após teste com 6h de frio, muito embora mantivesse outros elementos da resposta termogênica, como a quantidade global de UCP1 per depot no BAT interescapular, a captação de glicose radiomarcada pelo BAT após frio, medida por tomografia por

emissão de pósitrons/tomografia computadorizada. Concomitantemente, recrutamos indivíduos obesos a serem submetidos a cirurgia bariátrica e após a perda de peso, observamos que houve um recrutamento do BAT e que sua atividade estava associada a níveis séricos de IL10. Adicionalmente, realizamos uma análise de transcriptômica por RNA-Seq em sangue de indivíduos portadores de uma mutação pontual no receptor da IL10 (IL10RA homozygous: c537G>A: p.T197T splicing). Os genes diferencialmente expressos foram agrupados por ontologia gênica e compõem em geral elementos da membrana mitocondrial externa. Além disso, demonstramos que mitocôndrias isoladas do BAT de animais IL10 KO apresentam respiração no estado 2 diminuída em relação aos animais selvagem, bem como respiração desacoplada e dependente de UCP1 também diminuídas. Novamente, realizamos uma análise de transcriptômica por RNA-Seq no BAT de camundongos IL10 KO e controle e, similarmente, os genes diferencialmente expressos agrupados por ontologia gênica apontaram elementos estruturais da membrana mitocondrial interna, da membrana plasmática e do retículo endoplasmático. Por fim, realizamos microscopia eletrônica de transmissão do BAT e as mitocôndrias dos camundongos IL10 KO apresentam uma desorganização da arguitetura das cristas, além de uma forma arredondada compatível com um estado de maior fissão mitocondrial. Similarmente, em adipócitos marrons imortalizados, a imunoneutralização da IL10 também promoveu aumento da isoforma curta da proteína Opa1, indicando uma proporção aumentada da isoforma associada a fissão mitocondrial, e um aumento na fragmentação da rede mitocondrial. Assim, nós concluímos que a IL10 tem um papel relevante na respiração dependente de UCP1 e na organização estrutural das mitocôndrias.

Palavras-chave: Obesidade; tecido adiposo marrom; mitocôndria.

ABSTRACT

White adipose tissue stores energy in the form of triglycerides in times of excess nutrients and undergoes metabolic adaptations induced by this nutritional excess that contribute to the pathophysiological alterations of obesity and diabetes; while brown adipose tissue (BAT) is able to dissipate energy in the form of heat

through a process called adaptive thermogenesis, whereby the body can promote changes in energy expenditure in the face of changes in the availability of substrates or even environmental stimuli. Adaptive thermogenesis is a metabolic process of heat generation by uncoupling the proton-motor force of the electron transport chain dependent on uncoupling protein 1 (UCP1), present in the internal mitochondrial membrane of brown adipocytes and activated by free fatty acids released in the cytosolic environment by lipolysis. Lipolysis is conditioned by the activation of a sympathetic pathway induced by cold or by other adrenergic stimuli. Activation of the ß3-adrenergic receptor induces energy expenditure by brown adipose tissue (BAT) or promotes induction of beige adipocytes expressing UCP1. Recruitment of precursor cells with genetic potential to turn into brown, white or beige adipocytes depends on environmental cues. Recent studies have shown that type 2 cell signaling through the release of interleukin-4 by eosinophils in response to cold control the synthesis of norepinephrine in alternatively activated macrophages to maintain sympathetic tone for the development of beige adipocytes. Thus, type 2 innate immunity can control browning. Here, we demonstrate that IL10 KO mice, a key anti-inflammatory cytokine in the innate immunity, exhibited impaired basal respiration in vivo, as well as decreased tolerance to thermal stress after 6h cold test, although maintaining adaptive response elements such as the overall amount of UCP1 per depot and coldinduced ¹⁸F-fluordeoxyglucose uptake. Concomitantly, we recruited obese individuals to undergo bariatric surgery and after weight loss, we observed that there was a BAT recruitment and that its BAT activity was associated with serum II-10 levels. In addition, we performed a whole-blood transcriptome analysis using RNA-Seq of individuals carrying a point mutation at the IL10 receptor (IL10RA homozygous: c537G> A: pTT717T splicing). Differentially expressed genes were grouped by gene ontology and generally composed elements of the outer mitochondrial membrane. Moreover, we demonstrated that mitochondria isolated from IL10 KO mice BAT present impaired state 2 respiration in relation to wild type mice, as well as maximal and UCP1-dependent respiration. Again, we performed a transcriptomic analysis using RNA-Seq on BAT of control and IL10 KO mice and, similarly, differentially expressed genes grouped by gene ontology pointed out structural elements of the internal mitochondrial membrane, plasma membrane and endoplasmic reticulum. Finally, we performed transmission electron microscopy and IL10 KO mice showed a mitochondrial cristae ultrastructure disruption in addition to a sphere-shaped mitochondria, compatible with a state of greater mitochondrial fission. In addition, we treated immortalized brown adipocyte cell line with either IL10 recombinant or an immunoneutralizing IL10 antibody, which resulted in the increase of the proportion of fusion-deficient form of Opa1 and fragmented mitochondria network. Thus, we conclude that IL10 plays a relevant role in UCP1-dependent respiration and structural organization of mitochondria.

Key-words: Obesity; brown adipose tissue; mitochondria.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
2.	OBJETIVOS	35
3.	METODOLOGIA	.35
4.	RESULTADOS	.47
5.	DISCUSSÃO GERAL	98
6.	CONCLUSÃO	103
7.	REFERÊNCIAS	.105
8.	ANEXOS	.118
	8.1 ANEXO 1 - Artigo de revisão publicado como parte das atividades	
	desenvolvidas durante o doutorado	
		118
	8.2 ANEXO 2 - Certificado de aprovação do projeto pela Comissão de	Ética
	em Uso de Animais	129
	8.3 ANEXO 3 - Certificado de aprovação do projeto envolvendo human	nos pelo
	Comitê de Ética em Pesquisa	.130
	8.4 ANEXO 4 – Autorização da Springer Nature para reprodução integ	ral do
	artigo de revisão que compõe o anexo 1	131

1. INTRODUÇÃO

Em 2015, a prevalência global de obesidade entre crianças foi estimada em 108 milhões de casos, enquanto para adultos este valor chegou a 604 milhões de pessoas, o que resulta em uma prevalência mundial de 5% entre crianças e 12% entre adultos. Muito embora, em alguns países muito populosos, a prevalência possa ser ainda mais alarmante, como ilustrado nas Figuras 1A e 1B, nas quais se observa que entre adultos do México e do Egito supera 35%. Nos Estados Unidos, país que conta com maior número de estudos epidemiológicos publicados, a prevalência da obesidade entre crianças é de 12% (Figuras 1C e 1D). Por sua vez, o Brasil aparece em uma situação intermediária entre 15 e 20% entre os homens, mas com uma prevalência maior entre as mulheres (Afshin *et al.*, 2017).



Figura 1. Prevalência da obesidade ajustada para idade ao redor do mundo. Adaptado de *The GBD 2015 Obesity Collaborators* (Afshin *et al.*, 2017).



Figura 2. Impacto do índice de massa corpórea (IMC) nos anos de vida ajustados por incapacidade e na mortalidade. Adaptado de *The GBD 2015 Obesity Collaborators* (Afshin *et al.*, 2017).

Em 2015, um total de apenas 4,8% das mortes por todas as causas (Figura 2D) e 4,2% dos anos de vida ajustados para incapacidade (Figura 2B) ocorreram em pessoas com IMC abaixo de 25. Doença cardiovascular é a causa líder para ambos os eventos relacionados ao IMC, seguido por diabetes mellitus, neoplasias associadas à obesidade e doença renal crônica. Com isso, o excesso de peso foi responsável por 4 milhões de mortes em 2015, o que desperta um intenso interesse no conhecimento da fisiopatologia da obesidade e de suas comorbidades com o objetivo de desenvolver métodos preventivos e

terapêuticos mais eficazes que aqueles disponíveis atualmente (Afshin *et al.*, 2017).

Um dos alvos anatômicos com intensa pesquisa em obesidade é o tecido adiposo. Considerado por décadas como um órgão envolvido unicamente com o armazenamento de energia na forma de lípides, o tecido adiposo ganhou importância maior nas últimas décadas em decorrência de estudos que revelaram suas funções imunoendócrinas, suas particularidades anátomo-funcionais e seu papel no controle da termogênese. (Rosen e Spiegelman, 2006; Villarroya *et al.*, 2017).

1.1. Inflamação metabólica induzida pela obesidade

Obesidade é fortemente associada a complicações metabólicas tais como DM2, NASH, doenças cardiovasculares e neoplasias associadas à obesidade. A fisiopatologia de todas estas condições envolve a inflamação crônica de baixo grau induzida pela obesidade e culmina na ativação de várias cascatas de sinalização inflamatória, tais como TLR4, NF-kB, IkB (IKK), c-Jun N-terminal kinase (JNK), e inflamassoma em tecidos metabolicamente relevantes (Catrysse e Van Loo, 2017; Guillemot-Legris e Muccioli, 2017) (Fig. 3).

Muito embora já se suspeitasse da existência de uma relação entre o consumo de HFD, infecção e resistência à insulina(Himsworth, 1940), apenas nos anos 1990 Hotamilisgil e colaboradores (Hotamisligil *et al.*, 1993) demonstraram que o tecido adiposo branco inflamado de camundongos obesos e diabéticos liberava TNF-alfa em resposta à dieta, e que o bloqueio do TNF-alfa resultava em melhora na tolerância à glicose. Este estudo transformou-se num marco que deu inicio aos avanços no entendimento dos mecanismos moleculares de resistência à insulina através da fosforilação inibitória em serina dos receptores IRS1 e IRS2 por serina-quinases de estresse em vários tecidos (Spiegelman e Hotamisligil, 1993; Velloso *et al.*, 2015).

A inflamação metabólica induzida por dieta que resulta em aumento dos níveis de citocinas inflamatórias tanto sistemicamente quanto nos tecidos-alvo também resulta em outros fenômenos celulares, tais como resistência à insulina, resistência à leptina e estresse do retículo endoplasmático (ERS)(Won *et al.*, 2009). Rapidamente, o retículo endoplasmático (*ER*) pode detectar níveis

aumentados de lípides e a fim de restaurar a homeostase protéica no ER dispara uma cascata de sinalização complexa denominada unfolded protein response (UPR), a qual aumenta a expressão de proteínas envolvidas na maquinaria de dobra de proteínas, diminuindo assim a tradução de proteínas a serem dobradas, bem como enviando-as para o citosol para serem degradas pelo sistema ubiquitina-proteassomo (Ron e Walter, 2007). Entretanto, esta sinalização UPR também dispara uma cascata de eventos de morte celular quando os mecanismos homeostáticos não são restabelecidos apos algum tempo (Lee e Ozcan, 2014). Dentro deste contexto, estudos subsequentes demonstraram que a ativação de vias de sinalização UPR e ERS tem um papel predominante no desenvolvimento de resistência à insulina induzida por dieta e DM2 (Ozcan et al., 2004). Além disso, atenuação do ERS com o uso de chaperonas químicas promove melhora na sensibilidade à insulina em camundongos obesos (Ozcan et al., 2006), de modo que diferentes abordagens para modular o ERS podem ser utilizadas no futuro no tratamento de várias doenças metabólicas(Lee e Ozcan, 2014).

Após o ERS, a ativação do TLR4 foi também descrita como um mecanismo celular responsável pelas alterações promovidas pela inflamação metabólica induzida por dieta (Velloso et al., 2015). O TLR4 é um receptor da imunidade inata que responde inicialmente a lipopolissacarídeos (LPS) da membrana de bactérias gram-negativas. Entretanto, estudos haviam demonstrado que ácidos graxos de cadeia longa presentes na dieta também seriam capazes de ativar a transdução de sinal do TLR4, o qual é capaz de promover resistência à insulina e transdução de genes de cascatas inflamatórias. Junto a isso, alterações de permeabilidade intestinal e de da microbiota decorrentes da obesidade podem resultar em níveis séricos aumentados de LPS, o que, junto com os ácidos graxos provenientes da dieta, são capazes de ativar TLR4, em um estado conhecido como endotoxemia metabólica (Velloso et al., 2015; Boutagy et al., 2016). Mais recentemente, a quinase protéica R (PKR) também foi identificada como capaz de promover inflamação metabólica de baixo grau. O excesso de ácidos graxos provenientes da dieta e que inicia a resposta de ERS leva à ativação da PKR e a uma consequente ativação das vias inflamatórias JNK e IKK(Nakamura et al., 2010; Velloso et al., 2015).

ARTICLE IN PRESS



Figura 3. Fator Nuclear kappa B (NFKB) liga obesidade à resistência à insulina (Catrysse e Van Loo, 2017). A figura ilustra as principais vias metabólicas afetadas pela ativação da proteína serina quinase IKK. *AGE, advanced glycation end products* (produtos de glicação avançada); *RAGE, receptor dos* produtos de glicação avançada; *LPS, Lipopolysaccharides* (*lipolissacarídeos*); *II-1B, interleucina 1-beta; IL1R, receptor de II-1B; TNF-a, fator de necrose tumoral-alfa; TNFR1, receptor de TNF; FFA, free fatty acids* (ácidos graxos livres); *IRS, insulin receptor substrate (receptor de insulina); ER, endoplasmic reticulum (retículo endoplasmático); TLR4, toll-like receptor tipo 4* (*receptor do tipo toll 4*); S6K1, proteína S6 quinase 1; mTOR, Mammalian Target of Rapamycin, alvo da rapamicina em mamíferos; IKK, IkB quinase; PKC, proteína quinase C; SOCS3, Suppressor of cytokine signaling 3 (supressor da sinalização de citocinas); PTP1B, Protein tyrosine phosphatase 1B (proteína tirosina fosfatase 1B).

A inflamação subclínica desencadeada pelo consumo de HFD e pelo desenvolvimento da obesidade afeta tecidos e células metabolicamente ativos e responsivos a insulina, tais como os adipócitos, musculatura estriada, fígado e hipotálamo(Hotamisligil, 2017). Em cada um destes tecidos, além de promover resistência a ação da insulina (e da leptina, no caso do hipotálamo) a inflamação contribui para a progressiva instalação de alterações funcionais nas células afetadas. Acredita-se que o tecido adiposo é o primeiro órgão afetado durante o desenvolvimento da obesidade, como consequência da rápida expansão da sua massa para acomodar o excesso de nutrientes, o que resulta em ER, estresse oxidativo e no recrutamento de células imunes para o tecido adiposo, como macrófagos inflamatórios M1, neutrófilos e linfócitos. Este microambiente inflamatório secreta várias citocinas e contribui para o estado inflamatório local e para a inflamação sistêmica (Catrysse e Van Loo, 2017). Uma das consequências funcionais da ativação de vias inflamatórias é o comprometimento da função mitocondrial do tecido adiposo (Crewe et al., 2017).

1.2. Características dos adipócitos e alterações da função mitocondrial induzida pela obesidade e inflamação

De maneira simplificada, o equilíbrio energético de organismos vivos segue a primeira lei da termodinâmica, representada graficamente na Figura 4. Neste sistema, muito embora seja uma simplificação excessiva do que ocorre fisiologicamente, o tecido adiposo funciona simultaneamente como um órgão de estoque e como sinalizador, gerando sinais que tem por objetivo integrar respostas que participam do controle da ingestão alimentar e do gasto energético.



Figura 4. Homeostase energética depende da balança entre ingestão calórica e gasto energético. Embora a ingestão calórica seja inteiramente devido ao consumo de alimento, o gasto energético tem mais componentes, incluindo metabolismo basal, atividade física e termogênese adaptativa. Adaptado de (Rosen e Spiegelman, 2006).

Em mamíferos, há três tipos de tecido adiposo: o tecido adiposo branco (*WAT- White adipose tissue*), que atua como órgão de estoque energético; o tecido adiposo marrom (*Brown adipose tissue – BAT*), cuja função é contribuir para a estabilidade térmica de organismos homeotérmicos através de termogênese adaptativa (Nadal *et al.*, 2017); e o tecido adiposo bege que pode funcionar tanto estocando lipides com participando da termogênese adaptativa.

O papel classicamente descrito do tecido adiposo branco envolve acumular energia na forma de triglicérides a fim de formar uma reserva energética que possa liberar ácidos graxos para serem usados como substrato energético em condições de privação alimentar. Desta forma, o tamanho do estoque aumenta durante períodos de balanço energético positivo, e declina nos períodos em que o gasto energético supera a ingesta (Trayhurn e Beattie, 2001). Além disso, as adaptações de gasto energético e de controle neural da fome e da busca por alimentos são constantes e visam defender um *set point* energético de excesso de peso, ou seja, o sistema sofre adaptações contínuas para preservar os estoques energéticos obtidos durante períodos de balanço energético positivo (Abizaid *et al.*, 2006; Rosen e Spiegelman, 2006).

Estruturalmente, o adipócito branco é formado por um único *droplet* lipídico, tem baixo conteúdo citoplasmático e baixa densidade mitocondrial. Ainda assim, embora tenha uma baixa massa mitocondrial, a mitocôndria desempenha papel central na biologia do adipócito branco. Por exemplo, um

time course sincrônico de eventos celulares de biogênese mitocondrial e de adipogênese indica importante participação das mitocondrias na diferenciação dos adipócitos (De Pauw et al., 2009). Durante a diferenciação de célulastronco mesenquimais em adipócitos há um aumento sequencial na expressão de fatores transcricionais tais como cAMP responsive element- binding protein (CREB), CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) family members, and peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) e PPAR coactivator 1 (PGC-1), os quais controlam a expressão de numerosos genes envolvidos no metabolismo lipídico e na biogênese mitocondrial, tornando pouco provável uma correlação fraca entre a biogênese e o gasto energético (De Pauw et al., 2009). Similarmente, durante a diferenciação de adipócitos 3T3-L1 há um aumento concomitante na expressão de proteínas mitocondriais após o quarto dia de indução das células, com um remodelamento mitocondrial a partir de um aumento de enzimas da maquinaria energética, como piruvato carboxilase, acil-CoA sintase, acil-CoA desidrogenase, além de um aumento na taxa basal de consumo de oxigênio (Wilson-Fritch et al., 2004; Si et al., 2007). Sustentando essa hipótese, Tormos e colaboradores demonstraram que o incremento no metabolismo mitocondrial a partir da produção de espécies reativas de oxigênio, especificamente através do complexo III, é um evento celular crucial para a diferenciação dos adipócitos, sobretudo de maneira dependente de mTORC1 (Tormos et al., 2011). Além do mais, durante a diferenciação de préadipócitos é necessário um grande fluxo de ATP para manter processos lipogênicos que tem grande custo energético para a célula. Há necessidade ainda de se gerar acetil-CoA a partir da glicólise para a síntese de ácidos graxos, bem como glicerol-3-fosfato para a síntese de triglicérides e sua incorporação no droplet lipídico (Nye et al., 2008).

Durante o desenvolvimento de obesidade e diabetes mellitus tipo 2, ocorre uma hipertrofia dos adipócitos para acomodar uma maior disponibilidade de nutrientes. Como visto acima, o desenvolvimento dos adipócitos é acoplado a biogênese mitocondrial, de modo que a inibição da respiração celular por rotenona, por exemplo, resulta no comprometimento da diferenciação de préadipócitos e consequente na diminuição da expressão de fatores transcricionais como *PGC-1beta, PPARgamma, CAAT/enhancer binding* protein alpha (C/EBPalpha), além de acúmulo anormal de triglicérides e menor síntese de ATP, sugerindo que um dano mitocondrial possa inibir o processo de diferenciação dos adipócitos (Lu et al., 2010). De fato, durante uma maior exposição a excesso de nutrientes, há uma diminuição na disponibilidade de ATP nos adipócitos e um acúmulo concomitante de NADH, bem como um desvio metabólico na célula para um fenótipo de maior acúmulo lipídico, menor biogênese mitocondrial e maior síntese glicolítica de ATP. Tais alterações resultam em lipotoxicidade e subsequente contribuem para a instalação da resistência à insulina (Kusminski e Scherer, 2012). Dentro deste contexto, em adipócitos de camundongos ob/ob (com obesidade grave em decorrência de uma mutação no gene da leptina) há uma diminuição importante na quantidade de transcritos gênicos de proteínas mitocondriais (Wilson-Fritch et al., 2004), bem como, disfunção mitocondrial, com diminuída biogênese, perda de potencial de membrana e geração de quantidades significativas de espécies reativas de oxigênio. Fenótipo similar é desencadeado em adipócitos 3T3-L1 tratados com altos níveis de ácidos graxos (Gao et al., 2010; Kusminski e Scherer, 2012).

De maneira oposta ao *WAT*, o BAT é capaz de promover gasto energético por termogênese adaptativa que se deve à transformação de energia química em energia térmica envolvida em processos metabólicos (Rolfe e Brand, 1997). As mitocôndrias do BAT diferem das de outros tecidos fundamentalmente por primariamente dissipar o potencial de membrana acumulado na cadeia transportadora de elétrons na forma de calor, ao invés de sintetizar ATP, o que resulta no aumento de gasto energético em mamíferos. A proteína desacopladora 1 (*uncoupled protein 1 – UCP1*) é a proteína determinante das propriedades termogênicas únicas do BAT. A UCP1 catalisa o vazamento de prótons através da membrana mitocondrial interna e dissipa o gradiente eletroquímico criado na cadeia transportadora de elétrons que resultaria na síntese de ATP pela ATP sintase. Deste modo, a oxidação de substratos é desacoplada da síntese de ATP (Figura 5) e o transporte de H⁺ para a matriz mitocondrial libera calor.



Figura 5. Sinalização adrenérgica e ativação aguda da termogênese induzida por UCP1. À esquerda, norepinefrina (NE) liberada nos terminais

simpáticos do adipócito após estímulo fisiológian (fria au alimentação) ativa através de proteínas G acopladas ao receptor b dependente de AMP cíclico (cAMP) que culr quinase A (PKA), a qual por sua vez fosforila a liberando ácidos graxos dos estoques lipídico graxos livres se ligam na UCP1 para ativá-la, c dos nucleotídeos purínicos. Beta3 - recepto proteína G acoplada ao receptor; AC, adenilato A; HSL, lipase hormônio-sensível. Adaptado de (



A atividade da UCP1 é o grande catalisador

atividade é finamente regulada nos adipócitos marrons predominantemente por meio de estímulos adrenérgicos, como mostrado na Figura 5. Outros mecanismos potencialmente envolvidos na regulação da UCP1 são menos conhecidos, particularmente o efeito de ácidos graxos. Assim, estudos recentes indicam que a UCP1 pode ser ativada por ácidos graxos que regulam o transporte de H+; e, inibida por nucleotídeos como ATP e ADP, num mecanismo dependente do pH (Klingenberg, 2017). Sucintamente, exceto o modelo extremo em que os ácidos graxos (FA) não estariam envolvidos (Matthias et al., 1999), há três modelos para explicar como os FA podem estar envolvidos no transporte de H⁺ pela UCP1(Klingenberg, 2017): (a) um modelo alostérico em que FA se liga a um ânulo lipídico da UCP1 e tal mudança na sua conformação permite o transporte de H⁺; (b) FA seriam um buffer de H+, à

medida que funcionariam como um grupo aceptor/doador de prótons no canal central da UCP1; (c) a UCP1 atuaria como um *shuttle* aniônico, visto que os FA poderiam se ligar à UCP1 carregados de H⁺ obtidos no citosol e ao se ligarem, liberariam H⁺ para a matriz (Klingenberg e Echtay, 2001; Shabalina *et al.*, 2004).

Além dos mecanismo intrínsecos que favorecem a atividade termogênica, o BAT é ricamente vascularizado, de modo que a dissipação do calor é bastante eficiente. Em termos anatômicos, em roedores, descreveram-se a existência de pelo menos 17 sítios de tecido adiposo, divididos em três tipos celulares: (a) o BAT clássico, o qual se concentra nas áreas interescapular, cervical, periaórtica, peri-renal e mediastinal; (b) o WAT, principalmente na região epididimal; e em meio ao WAT existe os (c) adipócitos marrons recrutáveis (adipócitos bege), principalmente em região inguinal e interescapular (De Jong *et al.*, 2015). Quanto a origem ontogênica, as células progenitoras dos adipócitos marrons clássicos partilham a mesma origem que as células musculares, isto é, são de uma linhagem positiva para o fator miogênico (Myf5⁺), enquanto as células bege derivam de precursores Myf5⁻, assim como os adipócitos brancos (Chu e Gawronska-Kozak, 2017).

Notadamente, de maneira similar ao que ocorre com o tecido adiposo branco, tem sido sugerido que inflamação associada à obesidade pode comprometer a função mitocondrial do BAT, uma vez que sua atividade é inversamente proporcional ao IMC em humanos (Cypess *et al.*, 2009). Além do mais, a atividade do BAT – novamente, em humanos - não está claramente sob controle das adaptações metabólicas da exposição a ácidos graxos (*overfeeding*)(Peterson *et al.*, 2017), como está nos camundongos (Mahdaviani *et al.*, 2017). Assim, estudos funcionais do BAT em humanos e em camundongos podem não representar modelos superponíveis, sendo necessária cautela na intepretação dos achados.

De todo modo, tem sido demonstrado que há um aumento na expressão de fator de necrose tumoral no tecido adiposo marrom em modelos experimentais de obesidade (*tumor necrosis factor* α - (*TNF*- α)(Kern *et al.*, 1995). Nisoli e colaboradores demonstraram que camundongos geneticamente obesos (ob/ob) com deficiência na sinalização de *TNF*- α têm uma diminuição na apoptose de

adipócitos marrons. Em seguida, demonstraram que o tratamento com *TNF-a* recombinante induziu de maneira dose-dependente a expressão de β 3-adrenorreceptores em adipócitos marrons e no BAT, o que traduziria uma piora na resposta adrenérgica adaptativa induzida pela obesidade. Por fim, no BAT de camundongos obesos com deficiência na sinalização de *TNF-a* há preservação da express*ão de UCP1 e* β 3-adrenorreceptores (Nisoli *et al.*, 2000).

Pierre e colaboradores demonstraram que camundongos TLR4 KO são protegidos do estresse de retículo induzido por dieta rica em gordura (Pierre et al., 2013). Entretanto, a ativação de TLR4 induzida por HFD no adipócito tem um papel dicotômico mais complexo: a ausência de TLR4 no adipócito promove uma piora dos efeitos negativos do remodelamento no WAT ao mesmo tempo em que protege o animal de uma piora na sensibilidade global à insulina após desafio com HFD (Tao et al., 2017). Uma vez que a inflamação também tem um papel positivo no remodelamento saudável do tecido adiposo (Jeffery et al., 2015), e considerando uma resposta dicotômica do TLR4 no WAT, duvidas surgiram quanto as potenciais consequências da ativação de TLR4 no BAT. Estudos subsequentes demonstraram que a ativação da sinalização de TLR4 induzida por dieta rica em gordura ou induzida por LPS é capaz de piorar a termogênese adaptativa através de mecanismos que envolvem estresse de retículo endoplasmático(Okla et al., 2015). O tratamento com LPS provocou uma piora no core de temperatura basal dos camundongos, o que deve refletir um menor gasto energético basal, e também um menor gasto energético pelo BAT interescapular, além de uma diminuição da expressão basal do conteúdo protéico de UCP1. Após o estímulo com frio, o grupo tratado com LPS teve uma piora no incremento da UCP1 em relação ao grupo controle, bem como uma ativação aberrante dos mecanismos de autofagia e dos marcadores de estresse de retículo endoplasmático (CHOP, GRP78/BiP e fosforilação da JNK). Como o tratamento com LPS promoveu uma diminuição na fosforilação de CREB (cAMP response element-binding protein - CREB), investigou-se ainda o processo de browning, a respiração mitocondrial e a biogênese mitocondrial em cultura primária de adipócitos humanos após tratamento com um agonista de cAMP. Como esperado, o

tratamento foi capaz de induzir browning, respiração celular e estresse de retículo, mas a resposta foi reduzida aos níveis basais quando houve préincubação com LPS. Subsequentemente, demonstraram que os adipócitos primários em cultura tratados simultaneamente com LPS e cAMP apresentaram uma supressão da degradação lisossomal induzida por cloroquina, o que sugeria um aumento no fluxo autofágico. Demonstraram ainda que em adipócitos primários de camundongos CHOP KO a ativação de TLR4 não piorava o browning e a biogênese mitocondrial. Por fim, demonstrarm que em camundongos wild-type o tratamento com PBA, uma chaperona química que inibe o estresse de ER, foi capaz de inibir a alteração do browning induzida pela ativação de TLR4. Assim, os autores concluem que a ativação de TLR4 promove piora na termogênese adaptativa através de estresse de ER (Okla et al., 2015). Da mesma forma, corroborando esses achados, Bae e demonstraram colaboradores que а expressão de receptores de reconhecimento de padrão (PRR) como TLR2, TLR4, NOD1 e NOD2 assim como citocinas inflamatórias estão aumentados no BAT de camundongos expostos a HFD. Além disso, a ativação de TLR4, NOD1 e NOD2 em adipócitos marrons induz a expressão de citocinas inflamatórias via MAPK e NF-kB, além de suprimir parcialmente a respiração mitocondrial e a expressão de UCP1(Bae et al., 2014), corroborando com a hipótese de que a resposta inflamatória induzida por HFD pode promover danos à capacidade termogênica do BAT.

1.3 Localização do tecido adiposo marrom em humanos e sua função

Até pouco antes de 2007, embora houvesse evidências raras e pouco referenciadas de sua presença em humanos adultos (Simon, 1950; Sutherland *et al.*, 1952), havia um conhecimento consensual de que o BAT em humanos era ativo apenas em recém-nascidos, tinha uma função de controle térmico e perdia sua atividade precocemente ao longo dos primeiros anos de vida. Assim, tornou-se um dogma central a não existência de BAT ativo em adultos humanos, o que significava que seres humanos adultos não faziam termogênese *nonshivering*, ou que essa termogênese dependente de mecanismos adrenérgicos ocorreria através de outros mecanismos (Cannon e

Nedergaard, 2004; Nedergaard *et al.*, 2007). Em 2009, três estudos publicados simultaneamente confirmaram a existência de BAT ativo em humanos adultos utilizando tomográfica computadorizada associada a detecção de emissão de pósitrons(Cypess *et al.*, 2009; Van Marken Lichtenbelt *et al.*, 2009; Virtanen *et al.*, 2009).

Na medicina nuclear, são usados radiotraçadores de atividade celular glicolítica para localizar tumores. O mais utilizado é a 2-[¹⁸F]-fluoro-2-deoxiglicose, que é captada na célula por membros da família dos transportadores de glicose independentes de sódio (GLUT). Uma vez no ambiente intracelular, a 2-[¹⁸F]-fluoro-2-deoxi-glicose é fosforilada pela hexoquinase e não pode facilmente deixar a célula. Assim, devido a sua marcação com ¹⁸F, pode ser detectada por sua emissão de pósitrons. Desde 2002, evidências sutis de captação de glicose radio-marcada em região cervical e em região supraclavicular bilateralmente durante exames para avaliação de neoplasias foram interpretadas como artefatos de captação muscular, em pacientes com suposta contratura muscular por causa do estresse. Posteriormente, foi visto que o tecido tinha densidade de gordura e a captação indesejada foi batizada de USA-fat (uptake of FDG in supraclavicular area)(Barrington e Maisey, 1996; Nedergaard et al., 2007). Por fim, em 2009, foi identificado que o BAT era ativo, inversamente proporcional ao IMC e recrutável pelo frio em adultos humanos (Cypess et al., 2009; Van Marken Lichtenbelt et al., 2009; Virtanen et al., 2009), o que revigorou a busca pelo entendimento de sua fisiologia e mecanismos moleculares de regulação na esperança de que possa contribuir para a homeostase do peso corporal e assim possa ser um importante alvo terapêutico para o tratamento de obesidade e diabetes (Leitner et al., 2017). Sua localização, como sugerido pelo acrônimo USA-fat, é muito similar aos roedores, com maior volume de tecido metabolicamente ativo na região supraclavicular e cervical, e uma quantidade razoável de tecido recrutável como indicado na Figura 6. Subsequentemente, estudos definiram a assinatura genética do BAT em humanos e detalhes anatômicos de sua distribuição. Cypess e colaboradores demonstraram que no BAT cervical de humanos há uma capacidade energética similar ao BAT de roedores e através de uma análise de cluster identificaram-se os principais marcadores genéticos do BAT cervical profundo (UCP1, ZIC1, LHX8), do BAT mais superficial, que tinha características de tecido adiposo bege (TNFRSF9, TMEM26, and SHOX2) e os marcadores de tecido adiposo branco (MPZL2, HOXC9, EBF3, FBXO31, e LEP)(Cypess *et al.*, 2013). Em seguida, foi demonstrado que aclimatação aguda ao frio recruta BAT em humanos, promove termogênese *nonshivering* e ainda pode promover uma melhora na sensibilidade à insulina em indivíduos diabéticos por maior captação da glicose no BAT, definindo o papel do BAT como provável alvo terapêutico (Van Der Lans *et al.*, 2013; Hanssen *et al.*, 2015).



Figura 6. Distribuição e atividade do BAT humano. A. Distribuição do BAT em 6 regiões; B. Média de gordura ativa e inativa por região ; Quantidade total de tecido ativo e inativo entre magros e obesos. Adaptado (Leitner *et al.*, 2017).

1.4 Relevância fisiológica da termogênese regulada por fatores metabólic no gasto energético total do organismo

A termogênese que ocorre no tecido adiposo marrom é um processo

transformação de energia química presente final dos anos 1970 tal processo foi correlac ganho de peso em roedores (Cannon e N criou um corolário: uma vez que a termogên em animais com obesidade genética e (animais estaria atrofiado (Trayhurn *et al.*, 1 eficiência metabólica aumentada em decorr (Himms-Hagen e Desautels, 1978). O conceito de que animais geneticamente obesos seriam hipometabólicos persistiu por décadas. De tal forma que contribuiu consideravelmente de modo negativo para uma visão simplificadora da patogênese da obesidade de acordo com a qual o indivíduo obeso seria incapaz de controlar a ingestão alimentar por razoes comportamentais. Assim como uma série de outros mitos sobre obesidade este ainda persiste em algumas circunstâncias (Casazza *et al.*, 2013).

A homeostase energética é finamente regulada, de modo que discretas alterações no peso são acompanhadas por discretas alterações na ingestão calórica e no gasto energético. Perda de peso resultando em um novo peso que esteja 10% abaixo do peso normal é acompanhada por uma redução no gasto energético em torno de 10%. Da mesma forma, se há um aumento de peso que resulte num novo peso 10% acima do peso normal este será acompanhado de um aumento proporcional no gasto energético (Leibel *et al.*, 1995).

Essa precisão da homeostase energética é mantida ao longo do tempo com uma acurácia superior a 99,5%. Em um exemplo clássico, Schwartz exemplifica o fenômeno com dados de uma coorte sueca. Se um indivíduo de 75kg que nunca foi obeso com uma dieta padrão de cerca de 2500 kcal por dia consome 27 kcal/dia a mais do que gasta (menos que 1% de *mismatch*), ele ganharia ao fim de 1 ano, 1,1kg (Schwartz, 2012). Nesta coorte, o ganho anual era de apenas 0,33kg/ano, e ocorreu de modo persistente ao longo dos 10 anos, o que indica que havia um *matching* com mais de 99,5% de acurácia entre a ingesta e o gasto energético(Norberg *et al.*, 2011).

Um componente chave deste sistema é a leptina. Secretada pelos adipócitos em razão direta da massa corporal, ela funciona como um verdadeiro adipostato e promove um feedback negativo no cérebro para regular a ingesta energética (Schwartz *et al.*, 2000). De modo similar, em condições de perda de peso, a sinalização da leptina promove um balanço energético positivo atuando no núcleo arqueado do hipotálamo a fim de aumentar a ingesta calórica (Schwartz *et al.*, 2000).

O núcleo argueado do hipotálamo é o principal centro com neurônios que detectam sinais como a leptina e os integram com outro sinais periféricos [(grelina, insulina, glicose, GLP-1 (glucagon-like peptide-1)]. Os neurônios mais bem estudados que controlam o balanço energético são neurônios desta região expressando neuropeptídeo Y (NPY), o neurotransmissor inibitório ácido yaminobutírico (GABA) e AgRP (agouti-related peptide). Tais neurônios são ativados em condições de jejum e perda de peso, situações em que os níveis séricos de leptina e insulina são diminuídos e promovem o estímulo alimentar (Woods et al., 1998). Trabalhos recentes demonstraram que a ativação célulaespecífica de neurônios AgRP fornece um estímulo robusto para comer, o qual inclusive persiste durante a alimentação (Steculorum et al., 2016). Adjacentes a esse grupo de neurônios, há outras células que expressam próopiomelanocortina (POMC) e liberam o neuropeptídeo anorexigênico hormônio estimulante α -melanocítico, o qual sinaliza para receptores melanocortina-4 (MC4 R) de neurônios downstream do núcleo paraventricular do hipotálamo e tronco cerebral (Schwartz et al., 2017). Durante o estado alimentado, níveis elevados principalmente de leptina e insulina disparam a atividade do sistema melanocortinérgico downstream aos neurônios POMC inibem е 0 comportamento alimentar (Figura 7).



Figura 7. Neurocircuitos hipotalâmicos e do tronco cerebral que regulam a ingesta calórica e o gasto energético em resposta a sinais da leptina. Embora a leptina reduza ingesta alimentar e peso corporal através de ações em ambos os sítios, neurônios do núcleo arqueado parecem ativamente integrar sinais de ambos os lados da equação do balanço energético, embora o controle da ingesta e do gasto energético por neurônios do trato solitário possam ser distintos e separados. DMH, núcleo dorsomedial; LHA, área hipotalâmica lateral; LepRb, receptor de leptina; PVN, núcleo paraventricular; VMH, núcleo hipotalâmico ventromedial. *Adaptado de J Clin Invest. 2011 Jun 1; 121(6): 2152–2155(Williams e Schwartz, 2011).*

Além de controlarem a ingestão de alimentos, os neurônios do hipotálamo regulam o gasto energético por meio de diferentes mecanismos como a regulação da atividade física e a regulação da termogênese (Kooijman et al., 2015). Em roedores identificaram-se grupos de neurônios hipotalâmicos que controlam o tônus simpático do BAT (Shi et al., 2013). Tais neurônios respondem não apenas a variações na disponibilidade de substrato energético no organismo, desencadeando assim respostas de termogênese adaptativa a dieta (Dodd et al., 2015), como também a variações térmicas, resultando no desencadeamento de termogênese induzida pelo frio (Cannon e Nedergaard, 2004). Portanto, o organismo dispõe de um sistema homeostático hipotalâmico que integra sinais da periferia e "defende" a manutenção do peso corporal. Desta forma, ao perder peso por dieta, ocorre a redução dos níveis sistêmicos de leptina e insulina, o que dispara uma sinalização orexigênica nos neurônios NPY/AgRP e inibe a sinalização da melanocortina controlada pelo POMC, de modo a induzir a ingestão alimentar e diminuir o gasto energético até a recuperação do peso (Schwartz, 2012). Em paralelo ocorre redução do gasto energético por termogênese, pelo menos em parte como consequência da redução da atividade do BAT. Por outro lado, quando há ganho de peso em decorrência de uma aumento da ingestão alimentar, os sinais hipotalâmicos levam a uma redução da fome acompanhado de um aumento da termogênese. Em parte, tais adaptações fisiológicas são bem ilustradas pelos resultados do estudo DPP (Diabetes Prevention Program), no qual se notou que após uma perda inicial de peso, ocorria um subsequente ganho de peso ao longo dos anos até que ao fim de dez anos não havia mudança significativa entre os grupos tratados com metformina, placebo ou exercício físico (Figura 8). Tal fenômeno torna-se ainda mais evidente quando se considera o período de seguimento após randomização para avaliar desfechos de saúde geral (Figura 8E)(Knowler *et al.*, 2009).



Figura 8. Desenvolvimento de diabetes e mudança de peso desde a randomização para o DPP (Diabetes Prevention Program). Todos os participantes (A), aqueles entre 25-44 à randomização (B), 45-59 (C), mais de 60 (D); desde arrolamento no DPPOS (Diabetes Prevention Program Outcome Study) para todos os participantes (E), 25-44 (F), 45-59 (G) e mais de 60 (H). Adaptado de (Knowler *et al.*, 2009).

Como notado anteriormente, variações do peso resultam em variações no mesmo sentido do gasto energético (Leibel *et al.*, 1995); entretanto, não se sabe com certeza, até que ponto existe proporcionalidade entre os dois parâmetros. Ao longo dos últimos 50 anos ocorreram varias quebras de conceito que contribuíram para que chegassemos ao conhecimento atual a respeito da associação entre massa corporal e homeostase energética. Assim, o paradigma sugerido nos anos 1970 por Himms-Hagen de que o tecido adiposo marrom seria atrofiado em animais com obesidade genética, não foi confirmado(Himms-Hagen e Desautels, 1978). Outro conceito confrontado por estudos recentes diz respeito ao estado metabólico de camundongos geneticamente obesos, como o ob/ob; acreditava-se que a leptina poderia controlar o peso não apenas por reduzir a fome mas também por estimular a termogênese (Halaas et al., 1995). Tal conceito tinha por base estudos observacionais que propunham a associação entre ausência de leptina, hipometabolismo e inativação do BAT (Ashwell et al., 1985; Kaiyala et al., 2015). Atualmente, o paradigma ganhou novas interpretações: o camundongo obeso não apresenta uma piora da capacidade oxidativa concomitante ao aumento de peso, pelo contrário, o BAT teria um aumento nas suas funções (Mahdaviani et al., 2017). Entretanto, o sistema não é tão linear e novos estudos vêm contribuindo para explicar o problema. Há evidências demonstrando que em camundongos há piora na função termogênica do BAT após períodos prolongados de dieta, o que seria consequência da ativação do TLR4 pela inflamação sistêmica de baixo grau (Okla et al., 2015). Junto com isto, em seres humanos, de fato, o indivíduo obeso parece ter BAT menos ativo e menos recrutável que o indivíduo magro (Cypess et al., 2009; Van Marken Lichtenbelt et al., 2009; Leitner et al., 2017).

1.5 Imunidade inata e tecido adiposo marrom

Uma vez que a inflamação sistêmica de baixo grau decorrente da obesidade pode contribuir para uma disfunção mitocondrial no tecido adiposo, e que indivíduos obesos têm uma atividade do tecido adiposo marrom comprometida, existe justificativa para que se proponha que sinais inflamatórios possam interferir diretamente com a estrutura e função do BAT.

O recrutamento do BAT depende do estímulo adrenérgico crônico pelo sistema nervoso simpático (Cannon e Nedergaard, 2004). Uma série de fatores têm sido implicados no controle da expressão da UCP1 e no recrutamento de

subpopulações de células entremeadas no tecido adiposo branco para induzir o fenótipo termogênico (Mo et al., 2017). Além disso, estudos recentes demonstraram que a ativação dos adipócitos bege pode depender não apenas de sinais adrenérgicos mas também de outros estímulos externos para gerar calor (Wu et al., 2013). Dentre os mecanismos potencialmente envolvidos na regulação do BAT, a inflamação tem sido estudada com particular interesse uma vez que durante o desenvolvimento da obesidade ocorre o estabelecimento de um processo inflamatório sistêmico de baixa intensidade (Hotamisligil, 2017). No tecido adiposo de mamíferos magros existem macrófagos residentes que apresentam fenótipo do tipo 2 (M2). O ganho de peso resulta na gradual mudança do fenótipo destes macrófagos para o tipo 1 (M1), estado caracterizado pela secreção de citocinas inflamatórias. Nesta circunstância o aumento da atividade inflamatória local promove o recrutamento de outras células inflamatórias tais como linfócitos Th1, células NK, células NKT, eosinófilos, neutrófilos e mastócitos (Guilherme et al., 2008; Lumeng e Saltiel, 2011). Portanto, durante a progressão da obesidade, observa-se a gradual redução da atividade de células do sistema imune com padrão alternativo tipo 2 para um padrão francamente inflamatório do tipo 1 (Uhm e Saltiel, 2015). Este conceito resultou na elaboração de hipótese segundo a qual, diferentes perfis inflamatórios no tecido adiposo poderiam impactar na atividade termogênica dos adipócitos (Osório, 2014).

Rao e colaboradores demonstraram que o exercício físico induz o *splicing* alternativo do coativador 1A do PPAR, Pgc1a4, produzindo um fenótipo magro e com alta capacidade termogênica. Por meio de abordagens de proteômica identificaram uma miocitocina – a meteorina-like, como responsável pelo fenótipo. A meteorina-like é liberada pelo músculo após o exercício e ativa os eosinófilos a liberarem IL-4, que ativa o eixo IL-4/IL-13 nos macrófagos que subsequentemente liberam norepinefrina e controlam a capacidade termogênica do tecido adiposo (Rao *et al.*, 2014). Este estudo reforçou a hipótese que diferentes espectros da resposta inflamatória podem ter efeitos bastante distintos sobre o controle do BAT.

Entretanto, não está claro quais são as consequências da atividade inflamatória sistêmica de moderada/elevada magnitude sobre a atividade e morfologia do BAT. Neste estudo aventamos a hipótese que a falta da citocina anti-inflamatória clássica IL10 teria impacto no BAT por promover um estado inflamatório sistêmico de grande magnitude.

2 Objetivos gerais

Avaliar o impacto da deficiência de IL10 e da inflamação sistêmica sobre a função e morfologia do BAT.

2.1 Objetivos específicos

2.1.1 Avaliar a relação entre a expressão de IL10 e marcadores de termogênese em humanos utilizando bioinformática

2.1.2 Avaliar a relação entre a expressão de IL10 e marcadores de termogênese em camundongos utilizando bioinformática

2.1.3 Avaliar a morfologia do BAT em camundongos KO para IL10

2.1.4 Avaliar a ultraestrutura e função das mitocôndrias do BAT de camundongos KO para IL10.

2.1.5 Avaliar a relação entre marcadores inflamatórios/antiinflamatórios sistêmicos e a atividade de BAT em humanos obesos.

3 Metodologia

3.1 Camundongos

Camundongos C57/BL6J foram obtidos do CEMIB/UNICAMP. Camundongos B6.129P2-II10tm1Cgn/J, também conhecidos como IL10 KO, foram obtidos do Centro de Bioterismo/USP sendo originalmente da Jackson Laboratories. Os camundongos provenientes foram alimentados e aclimatados de acordo com as regulamentações da Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC). No estudo foram usados apenas camundongos machos de 8 a 12 semanas aclimatados a 22 graus Celsius em um ciclo claro de 12h e ciclo escuro de 12h, com livre acesso a água e ração. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de

Ética no Uso de Animais (CEUA em anexo) da UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brasil. Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos em acordo com as normas e guias do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA). Animais foram sacrificados por deslocamento cervical após anestesia intraperitoneal com xilazina (10mg/kg) e quetamina (120 mg/kg), para obtenção de amostras do BAT interescapular ou fígado.

3.2 Cultura de células

Pré-adipócitos marrons foram gerados como descrito previamente(Pan *et al.*, 2009) e diferenciados conforme publicações prévias(Aune *et al.*, 2013). Os pré-adipócitos foram colocados em meio de indução após alcançarem 95% de confluência em meio completo (DMEM contendo soro fetal bovino 10%). A indução foi promovida com DMEM contendo soro fetal bovino 10%, 0.5 mM isobutilmetilxantina, 1 mM dexametasona, 20 nM insulina, rosiglitazona 0.5 μ M e 1 nM T3 por 2 dias. Após a indução as células foram colocadas em um meio de manutenção contendo DMEM e soro fetal bovino a 10% com 20 nM insulina, rosiglitazona 1 μ M e 1 nM T3. Em geral, as células alcançavam diferenciação completa em adipócitos maduros preenchidos com múltiplos droplets lipídicos após 6-7 dias da indução. A diferenciação das células MEF (ATCC) foi alcançada por manter as células em meio completo DMEM enriquecido com soro fetal bovino 10% por dois dias.

3.3 Immunoblotting

A análise do *immunoblotting* foi realizada como em (Shabalina *et al.*, 2014). As proteínas foram preparadas a partir de extratos teciduais e 50 µg de proteína total foram aplicadas em géis SDS-PAGE de 8 ou 15%, transferidas em aparato semi-dry para uma membrana de nitrocelulose (Milipore), a qual foi incubada por 30 minutos com uma solução de bloqueio contendo albumina bovina sérica a 5%. As membranas foram incubadas overnight a 4°C com o anticorpo primário diluído em tampão TBS-Tween-20 (20mM Tris-HCI, pH 7.5, 500 mM de NaCl, 0.05% Tween 20). Após a
incubação com o anticorpo primário, os *blots* foram lavados e incubados com uma solução de anticorpo secundário conjugado a peroxidase *horseradish* com uma diluição de 1:5000 e depois revelado usando um kit para detecção de quimiolumenescência (*Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent*).

3.4 Análise de expressão gênica

As amostras de tecido assim que ressecadas foram preparadas usando TRIzol® conforme orientações do fabricante para extração de RNA do tecido. O reagente TRIzol (InVitrogen, São Paulo, Brasil) foi aplicado para homogeneização dos tecidos utilizando um "Polytron-Agregate" (Kinematica, Littau/Luzern, Suíça) por 30s na velocidade máxima. O homogenato foi centrifugado e o conteúdo total de RNA foi isolado segundo instruções do fabricante. Após quantificação por espectrofometria a integridade do RNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose. cDNA será preparado de 20 ng de RNA usando o kit TagMan PCR Master Mix (Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante. Para a quantificação relativa dos genes alvo das vias inflamatórias foi utilizado o sistema TaqManTM (Applied Biosystems). As análises foram realizadas em duplicata contendo: 4 µL de cDNA, 0,625 µL da solução com primers e sonda, 1,625 µL de água e 6,25 µL de TaqMan Universal PCR Master Mix 2x. Para controle endógeno e normalização da expressão do gene alvo foi utilizado o gene GAPDH. Os ciclos foram pré-estabelecidos em: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. O Software SDS System 7500 (Applied Biosystems) foi utilizado para a obtenção dos valores de expressão gênica. Os primers foram obtidos da Invitrogen (Life Technologies).

3.5 Isolamento de mitocôndrias

O BAT interescapular foi coletado em *pool* de 3 camundongos e colocado em gelo contendo o meio 1 (250 nM sacarose, 10mM Hepes e 1nM de EGTA). As preparações do camundongo WT e IL10 KO foram realizadas em paralelo. O BAT foi finamente cortado com tesouras e homogeneizado em um homogeneizador do tipo Potter. Durante o processo de isolamento, foi mantido no gelo. As mitocôndrias foram isoladas por centrifugação diferencial. Os homogenatos foram centrifugados a 8500 g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante resultante, contendo gordura, foi descartado. O *pellet* foi ressuspendido no meio 1 gelado e centrifugado a 800 g por 10 minutos. O *pellet* mitocondrial resultante foi ressuspendido no meio 2 gelado (contendo 100 mM de KCl, 20 mM de Hepes, 1mM EDTA, 0,6% de albumina livre de ácidos graxos) e centrifugado novamente a 8500g por 10 minutos. O *pellet* final foi ressuspendido no meio. A concentração de proteínas mitocondriais foi medida usando o método Bradford com albumina como standard. Adaptado de (Shabalina *et al.*, 2010)

3.6 Consumo de oxigênio

Consumo de oxigênio foi medido usando um eletrodo do tipo Clark (Oroboros) em um tampão 100mM KCI, 50mM MOPS, 1mM EGTA, 5mM KH_2PO_4 e BSA 0,1% em um pH de 7,4. A solução foi agitada continuamente na câmara com agitador magnético. O consumo de oxigênio foi medido na presença do substrato de interesse: piruvato + malato (Complexo I). Subsequentemente, foi adicionado 1mM de GDP e 4 mM de FCCP.

3.7 Mitotracker ex vivo e em células

A sonda fluorescente tetrametilrosamina, seletiva para mitocôndria, foi obtida da Molecular Probes® (Mitotracker® Orange CMTMRos – M7510) e as amostras foram processadas segundo orientação do fabricante. Uma alíquota estoque de 1mM foi preparada em DMSO. Para marcar as mitocôndrias, a amostra de tecido adiposo marrom interescapular *ex vivo* do camundongo foi cortada em fragmentos mínimos com uma tesoura antes de ser incubada com a sonda molecular; por sua vez, as células simplesmente foram incubadas com a sonda, a qual atravessa a membrana plasmática por difusão e fica concentrada em mitocôndrias ativas, com a característica de não serem facilmente lavadas após dissipação do potencial de membrana, nem mesmo após a fixação da célula.

Sumariamente, as células ou o tecido foram plaqueados em câmaras de 35/10 mm, em 4 compartimentos e fundo de vidro, e posteriormente foram incubados com MitoTracker Orange (200 nM) no meio de crescimento DMEM *high glucose* previamente aquecido a 37°C, não enriquecido com soro, durante 45 minutos. Depois de coradas, a solução foi trocada por PBS pré-aquecido e as células foram observadas em um microscópio de fluorescência a fim de avaliar se haviam atingido a fluorescência adequada. Cuidadosamente, o PBS foi removido e substituído por meio de crescimento pré-aquecido contendo paraformoldeído 4% à 37°C por 15 minutos. Depois da fixação, as células foram lavadas várias vezes em PBS e guardadas para posterior obtenção de imagens e análise morfométrica.

3.8 Respirometria

Os marcadores fisiológicos de gasto energético (consume de oxigênio, produção de CO2, gasto energético basal e atividade ambulatorial) foram obtidos um sistema de calorimetria de circuito aberto LE405 Gas Analyzer (Panlab – Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA), calibrado conforme orientações do fabricante. Camundongos foram aclimatados por sete dias no sistema e depois os dados foram obtidos por mais 24 horas.

3.9 Tomografia por emissão de pósitrons em camundongos

As imagens foram adquiridas e processadas usando o equipamento ALBIRA, um micro PET/SPECT/CT para obtenção de imagens de alta qualidade in vivo em animais de pequeno porte (Bruker® Corporation, Massachussetts, USA) e analisados usando a estação de trabalho PMOD, também da Bruker®. O radiotraçador (18F)-FDG foi obtido no Instituto de Pesquisa e Energia Nuclear (IPEN, Sao Paulo, Brazil). Camundongos foram previamente expostos ao frio de 4 graus Celsius por 12 horas, após o que foram anestesiados com isoflurano 2% e foram injetados no seio venoso retroorbitário com 5 MBq of [18F]fluoro-d-glicose ([18F]FDG). Camundongos foram mantidos anestesiados durante o período de biodistribuição do radiotraçador de 60 minutos. A tomografia computadorizada foi realizada como uma aquisição de baixa dose de radiação com 80 kVp, 160 µA, e

1024 projections, durante 0.8s por rotação da TC, *pitch* 4.0 – 5.0 mm, campo de 71.3mm e uma velocidade de scan de 24.6 mm/s. O PET scan foi realizado imediatamente depois da TC sem modificar a posição do camundongo, sempre na direção craniocaudal. Depois de 60 minutos de distribuição de [18F]FDG, a captação de imagens metabólicas foi obtida em 40 minutos. As imagens de PET foram reconstruídas usando o PMOD workstation no LabPET. As imagens foram calibradas em bequerels por mL ao escanear um cilindro-fantasma. Regiões de interesse (ROI) foram desenhadas nos cortes da TC e reconstruídas em volumes 3D para medir densidades e captação de cada tecido desejado. As imagens foram processadas e convertidas em SUV (standardized values uptake) ajustado pelo peso corporal de cada animal e sobrepostas com as imagens anatômicas para medir a captação de [18F]FDG no BAT.

3.10 Imagem de tempo de vida da fluorescência (FLIM – fluorescence

lifetime imaging microscopy).

Após a coleta do iBAT, os diferentes fragmentos foram rapidamente lavados e mantidos em PBS a 37°C. A autofluorescência do tecido foi identificada ao microscópio confocal LSM780 NLO. Como primeiro parâmetro de análise, foi obtido o espectro de excitação/emissão da fluorescência endógena, utilizando a ferramenta 'lambdascan', e este espectro foi submetido à deconvolução espectral, para identificação dos principais componentes fluorescentes presentes nas células. Este procedimento visou identificar qual a contribuição para o par NADH/FAD na emissão em λ =430nm. A seguir, o tempo de vida da fluorescência foi determinado, utilizando o acessório TCSPC (Time- Correlated Single Photon

Counting). As curvas obtidas para o tempo de vida da fluorescência foram analisadas no software SPCImage (Becker and Hickl), procurando identificar

diferentes componentes de acordo com estudos publicados anteriormente(Adur *et al.*, 2012).

3.11 Temperatura retal e do BAT

A medida de liberação térmica infravermelho na região interescapular foi obtida utilizando uma câmera de detecção infravermelha (FLIR T450sc, FLIR Systems, Inc. Wilsonville, USA) para fazer imagens de superfície de cada animal com uma resolução de 320 × 240 pixels e uma sensibilidade térmica de <40 mK @ +30 °C (+ 86 °F). As imagens foram apresentadas na paleta arco-íris com alto contraste usando o software livre FLIR Tools IR.

3.12 Microscopia eletrônica de transmissão

Para análise estrutural das mitocôndrias, fragmentos do tecido adiposo obtidos dos camundongos WT e IL10 KO foram dissecados, fixados com 2,5% glutaraldeído em tampão de cacodilato 0.1 M (pH 7.2) e estocados 2 horas no mesmo fixador a -4 graus Celsius. As amostras foram pós-fixadas com ósmio em tampão de imidazol 0.2 M (pH 7.5) e então desidratadas e incluídas em Durcupan ACS (Fluka, Steinheim, Switzerland). Cortes ultrafinos foram obtidos, contrastados com acetato de uranilo e citrate de chumbo, sendo depois examinados em microscópio de transmissão eletrônica Tecnai G2 Spirit Twin (FEI, Hillsboro, OR) operado a 80 kV. As imagens foram adquiridas usando Gatan Orius SC1000B camera (Pleasanton, CA, USA). Densidade mitocondrial, tamanho e morfologia foram analisados usando ImageJ.

3.13 Indivíduos humanos

Serão selecionados 15 pacientes do Ambulatório de Obesidade do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas de acordo com os seguintes critérios. Inclusão: os pacientes foram selecionados para cirurgia bariátrica de acordo com os critérios do *National Institutes of Health (NIH) Consensus Development Panel* em 1991,⁵³ sendo homens ou mulheres entre 18 e 50 anos de idade, com índice de massa corpórea maior ou igual a 40kg/m² e peso corpóreo menor que 150kg; teste negativo para HIV, hepatite B e C, *Cannabis*, heroína, morfina, cocaína, benzodiazepínicos e anfetaminas. Exclusão: diabetes mellitus ou pré-diabetes, segundo os critérios do American Diabetes Association;⁵⁴ qualquer condição anormal

que possa interferir com os resultados do estudo conforme julgamento do pesquisador; doença inflamatória ou infecciosa aguda ou crônica; hipertireoidismo; doença neurológica, psiquiátrica, gastrointestinal, respiratória, renal, hepática ou cardíaca relevantes; tabagismo, qualquer consumo de álcool ou de drogas ilícitas; doação de sangue ou transfusão nos últimos 3 meses; uso de anti-inflamatórios não-esteroidais ou corticóides; neoplasias, gestação, níveis de enzimas hepáticas superiores ao limite superior da normalidade; e participação atual em outro estudo investigativo.

3.14 Procedimento cirúrgico

Pacientes serão submetidos à cirurgia bariátrica pela técnica de *bypass* gástrico em Y-de-Roux (cirurgia de Capella), conforme previamente descrito.⁵⁵ Todos os pacientes do grupo tratamento serão operados pela equipe de cirurgia bariátrica do Hospital das Clinicas da Universidade Estadual de Campinas em protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (CAAE: 31865314.2.0000.5404 – em anexo). Após a cirurgia, os pacientes serão seguidos mensalmente com suporte clínico e nutricional, sendo, juntamente com os controles, após oito meses submetidos à nova coleta de sangue e a novo F-FDG PET/CT-scan.

3.15 Calorimetria indireta

A mensuração da taxa metabólica basal foi realizada em dois momentos, antes e após a exposição ao frio nos periodos pré- e pós-operatório. Houve jejum por 8 horas e, antes do início, os voluntários permaneceram em repouso em uma maca por trinta minutos. A seguir, foram feitas as medidas de consumo de oxigênio (VO₂) e produção de dióxido de carbono (VCO₂) a cada 60 segundos, durante 35 minutos, por meio do analisador de gases Medgraphics VO2000. A medida da TMB (em kcal/min) durante um minuto foi obtida pela equação descrita por Weir (1949): Total de kcal = $3,9 \times VO_2 +$ $1,1 \times VCO_2$. As medidas obtidas nos cinco primeiros minutos foram desprezadas, e a média dos últimos 30 minutos multiplicada por 1440 para obter a TMB em 24 horas.

3.3 Absorciometria por dupla emissão de raios-X (DXA)

Esse exame foi realizado uma vez na visita pré-operatória e uma vez em uma visita pós-operatória, bem como nos camundongos, onde indicado. A massa corpórea magra, gordura corpórea total e androide foram mensuradas por DXA, utilizando o iDXA GE Lunar com o software Encore (versão 14.10.022) com o CoreScan fornecido pelo fabricante (GE Medical Systems). CoreScan é um método automatizado para segmentar a gordura corporal total em gordura subcutânea e gordura visceral dentro da região androide. A estimativa da gordura visceral com este software é aprovada para uso clínico por ter alta correlação com o método padrão-ouro, a tomografia computadorizada. A calibração automática do aparelho é realizada diariamente durante a duração do estudo com um phantom de partes moles, e três vezes por semana utilizando um phantom espinhal, ambos fornecidos pelo fabricante (para densidade mineral óssea). O coeficiente de variação aceitável para o phantom de espinha foi de 1,5%. Não houve mudança de software ou hardware do aparelho planejadas no período. Os indivíduos foram escaneados seguindo protocolos de imagem e posicionamento seguindo The Official Positions of the International Society for Clinical Densitometry: Acquisition of Dual-Energy X-Ray Absorptiometry Body Composition and Considerations Regarding Analysis and Repeatability of Measures (2013), e no mesmo modo de configuração (para medida espessa nos pacientes obesos). CoreScan foi utilizado para calcular a massa de tecido adiposo visceral estimada e a distribuição de gordura corpórea.

3.16 Bioinformática

Análises de correlação foram realizadas a partir de dados de BAT e fenótipos (fenótipos BXD publicados)de famílias de camundongos BXD como previamente publicado(Andreux *et al.*, 2012), e dados de mRNA de tecido adiposo humano (*GTEXv5 Human adipose tissue RefSeq (Sep15) RPKM log2*) ou sangue total de humanos (INIA whole blood Affy MoGene 1.0 ST (nov 2010), gerados como parte do *Genotype-Tissue Expression (GTEx) project* (www.genenetwork.org)(Consortium, 2013). Todos os dados estão disponíveis em GeneNetwork (www.genenetwork.com). Heatmaps foram criados usando GENE-E (The Broad Institute).

3.17 Clamp euglicêmico hiperinsulinêmico

Após jejum mínimo de 12h, serão instalados dois acessos venosos com cateter flexível, sendo o primeiro retrógrado em veia antecubital para coleta de sangue e a segunda no antebraço, próximo ao cotovelo, para infusões. A mão onde será puncionada a veia antecubital permanecerá aquecida em torno de 50°C em caixa aquecida ou manta térmica elétrica para "arterialização" do sangue venoso. Os cateteres serão mantidos pérvios através da infusão de 1 ml de solução salina após cada coleta. Os testes seguiram a técnica proposta por DeFronzo e colaboradores(Defronzo et al., 1979). O exame consiste na infusão contínua de insulina (40 mU/m2/min), após dose maior com decréscimo exponencial nos primeiros 10 minutos (priming), a fim de atingir hiperinsulinemia em torno de 100mU/L (600pmol/L) após a primeira hora. Mantém-se a glicemia com daqueles obtidos em jejum (variação < 5-10%) através de infusão de glicose a 10% em taxa variável. As infusões são reguladas por bombas eletrônicas de infusão contínua. A partir de sangue venoso coletado a cada 5 minutos, a glicemia é determinada em aparelho analisador de glicose YSI 2700 Biochemistry Analizer (Yellow Springs Inc., Yellow Springs, OH, USA), possibilitando ao observador ajustar a infusão de glicose. Cada exame tem duração prevista de 5h, sendo 1h de período basal, 1h para atingir o equilíbrio, 2h para avaliação do estado de equilíbrio (steady state) e 1h para observação do paciente após término da infusão insulínica. Após o período experimental, uma refeição é oferecida ao participante do estudo. Amostras de sangue serão coletadas nos tempos -20, 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 min, centrifugadas e os soros congelados imediatamente a -30°C. o índice de sensibilidade à insulina é a utilização de glicose (glucose disposal) calculada a partir da taxa de infusão de glicose exógena (GIR, glucose infusion rate) durante o período do clamp, e corrigida pelas modificações da glicemia (considerando-se o volume de distribuição corporal da glicose de 250 ml/kg de peso corporal). Os valores de utilização da glicose são ajustados para o peso corporal total (GIR, medida pela unidade umol/min/kg) ou, preferencialmente, pela massa magra (valor de M, medida por umol/min/kgMM onde kgMM = quilograma de massa magra). Os períodos considerados devem ser de 30 a 60 min, após a primeira hora, nos quais se mantenha um estado de equilíbrio (variação de GIR menor que 5 a 10%). Os tempos mais utilizados são 80 a 120 min e 120 a 180 min. Em estados patológicos relacionados à resistência à insulina normalmente há atraso no incremento de GIR; por isso, prefere-se o intervalo entre 120 e 180 min (GIR120-180 min, M120-180 min) ou 150 e 180 min (GIR150-180min, M150-180 min). O principal estado de equilíbrio utilizado neste estudo será 120 a 180 min. O principal índice utilizado neste estudo será M120-180 min, doravante chamado simplesmente M ou valor de M. GIR120-180 min, doravante chamado simplesmente GIR. Serão calculados também índices derivados de M ajustados respectivamente para a glicemia ou para a insulinemia no estado de equilíbrio do teste: MCRg [glucose metabolic clearance rate, ou taxa de depuração metabólica da glicose, calculada por M/(glicemia média no estado de equilíbrio)] e M/I [M/(insulinemia média no estado de equilíbrio)].

3.18 Tomografia por emissão de pósitrons em humanos

Imagens foram obtidas utilizando Siemens Somatom Emotion Duo Biograph (Siemens Medical Solutions, Chicago, IL) e analisadas usando a estação Syngo VB10B WinNT 4.0, da Siemens. Pacientes e controles permanecerão em uma sala preparatória com roupas leves (0.49 clo, que é uma unidade de resistência térmica do vestuário) e expostos ao frio de 18°C por uma hora, depois do que receberão uma injeção intravenosa do radiotraçador (4.0MBq/Kg de 18F-FDG) e permanecerão confortavelmente em repouso em posição supina até as imagens serem obtidas. As imagens da TC serão obtidas com baixa dose de radiação, com 130kV, 50-80mA, cortes de 4.0 a 5.0 mm, com campo de visão de 500 mm e uma velocidade de scan de 24.6mm/s, sendo em seguida realizado o PET em direção craniocaudal, no modo três dimensões, em cinco a sete posições no leito para cobrir as áreas mais comuns de se encontrar gordura marrom, 4.0 min/posição no leito. As imagens foram analisadas por um *staff* especialista em medicina nuclear e pelo pesquisador utilizando o software Fiji®. Foram consideradas BAT ativo áreas de pelo menos 4 mm com densidade de tecido adiposo (-250 a -50 Unidades Hounsfield) e SUV máximo de ao menos 1.5 g/ml. A atividade do BAT de cada região é calculada pela média do SUV (SUV^{mean}) vezes o volume da região desejada, expressa em kilobecquerels.

3.19 Estatística

Na avaliação de inflamação sistêmica, utilizaremos o teste t de Student para comparar as médias de atividade inflamatória sistêmica antes e depois da perda de peso. Utilizaremos o coeficiente de correlação (r) de Spearman para avaliar a correspondência entre a atividade do tecido adiposo marrom e a atividade inflamatória sistêmica. O teste exato de Fisher será empregado para estudar a ativação do tecido adiposo marrom detectada pelo (¹⁸F)-FDG PET/CT-scan nas duas populações. O teste de Mann-Whitney será utilizado para testar as variáveis não-normalmente distribuídas entre os dois grupos estudados. Análise multivariada será utilizada para tentar entender o valor do escore inflamatório (AIS) para predizer indução de tecido adiposo marrom após a cirurgia. A associação entre atividade do tecido adiposo marrom e AIS serão testados por co-variáveis regressão logística tendo como idade. medidas antropométricas, resistência à insulina e IMC. Nas análises, o valor de p < p0,05 será considerado estatisticamente significativo.

4 **RESULTADOS**

4.3 Abnormal mitochondrial structure and function in IL10 deficiency

Abnormal mitochondrial structure and function in IL10 deficiency

José C. de-Lima-Júnior^{1,2}, Gabriela F. Souza^{1,2}, Alexandre M. Assis^{1,2}, Rodrigo S. Gaspar^{2,3}, Joana M. Gaspar^{1,2}, Andréa L. Rocha⁴, Danilo L. Ferrucci⁴, Tanes I Lima², Sheila C. Victório^{1,2}, José C. Pareja⁵, Sérgio Q. Brunetto⁶, Celso D. Ramos^{2,7}, Bruno Geloneze^{2,5}, Marcelo A. Mori⁴, Beatriz T. Costa-Carvalho⁸, Eduardo R. Ropelle^{2,3}, Lício A. Velloso^{1,2}*

Affiliations:

¹Laboratory of Cell Signaling, Department of Internal Medicine, University of Campinas, Campinas, São Paulo, 13084-970, Brazil

²Obesity and Comorbidities Research Center, University of Campinas, Campinas, São Paulo, 13084-970, Brazil

³ CEPECE - Research Center of Sport Sciences, School of Applied Sciences, University of Campinas, Limeira, SP, Brazil⁻

⁴ Department of Biochemistry and Tissue Biology, Institute of Biology, University of Campinas, Campinas, SP 13083-970, Brazil⁻

⁵ Laboratory of Investigation in Metabolism and Diabetes (LIMED)/Gastrocentro, Department of Surgery, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, 13081-970, Brazil.

⁶Biomedical Engineering Center, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP

⁷ Department of Radiology, University of Campinas, Campinas, São Paulo, 13084-970, Brazil.

⁸ Division of Allergy-Immunology and Rheumatology, Department of Pediatrics, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

*To whom correspondence should be addressed: <u>lavelloso.unicamp@gmail.com</u>

One Sentence Summary: Deficiency of IL10 and systemic inflammation promote severe structural and functional damage to brown adipose tissue mitochondria.

Abstract

Inflammation is the most relevant mechanism linking obesity with insulinresistance and metabolic disease. It impacts on the structure and function of tissues and organs involved in metabolism such as the liver, pancreatic islet and the hypothalamus. The brown adipose tissue has emerged as an important component of whole body energy homeostasis controlling energy expenditure through the regulation of thermogenesis. However, little is known about the impact of systemic inflammation on the structure and function of the brown adipose tissue. Here we show that IL10 knockout mice, a model of systemic inflammation, presents severe structural abnormalities of brown adipose tissue mitochondria, which are round-shaped with loss o cristae structure, increase fragmentation and increased proportion of fusion-deficient short form of OPA1, a protein involved in mitochondria dynamics. IL10 deficiency leads to newborn cold intolerance and impaired UCP1-dependent respiration. The reduction of systemic inflammation with an anti-TNF - monoclonal antibody partially rescues the structural but not the functional abnormalities of brown adipose tissue mitochondria. Using bioinformatics analysis we show that both in humans and mice, IL10 transcripts correlate with mitochondrial, lipid metabolism and caspase gene expression. Thus, IL10 and systemic inflammation play a central role in the regulation of brown adipose tissue by controlling mitochondrial structure and function.

Introduction

The brown adipose tissue (BAT) is regarded as an important potential target for approaches aimed at treating obesity and some of its comorbidities, particularly type 2 diabetes (T2D) (1-3). Upon stimulation by cold or *ac*-adrenergic drugs, for example, the mitochondria-rich BAT increases glucose and fatty acid uptake, which are employed in uncoupled respiration generating heat instead of ATP, and thus, increasing whole body energy expenditure (4, 5). Studies have identified a number of factors that are physiologically related to increased BAT activity, such as cold-exposure, leanness, youth, physical activity and the female gender (6, 7). Conversely, in pathological conditions such as obesity and T2D not only the base-line BAT activity is low but the capacity of inducing its activity by different approaches is impaired (8, 9).

Currently, there are 55 on going clinical trials aimed at developing new strategies to stimulate BAT activity in obesity (Supplemental Table 1). Among the studies evaluating drugs that are expected to increase BAT activity there are are adrenergic, GLP1, PPAR and thyroid hormone agonists. Surprisingly, none of the clinical trials aim at dampening inflammation as an approach to stimulate BAT.

In obesity, the systemic subclinical inflammatory activity that results from the activation of an innate immune response in metabolically relevant tissues is a major determinant for the development of insulin resistance (10, 11). Studies have shown that in BAT, the development of insulin resistance impairs thermogenesis (12, 13) and impairs whole-body glucose homeostasis (14). Moreover, while in obese non-diabetic subjects undergoing massive body mass reduction there is an increase of BAT (9, 15), the same is not true for obese diabetic patients, and the magnitude of insulin resistance stands as an important factor related to these different outcomes (8).

In order to determine the importance of systemic inflammation in BAT physiology and pathology, we employed interleukin-10 (IL10) knockout mice, which present a deregulated control of interferon-gamma (IFN-gamma producing CD4-T lymphocytes leading to an exacerbated Th1 activity (16). We show that, not only systemic inflammation impacts on BAT morphology and

function but also IL10, per se, can act directly in BAT promoting morphological integrity and stimulating its thermogenic activity.

Results

IL10 is associated with BAT function and oxygen consumption in humans In order to explore the hypothesis that systemic IL10 levels correlate with BAT function, we employed transcriptome-based bioinformatics analysis to examine the correlation between IL10 and blood transcripts using human databases that included 175 subjects(17). IL10 correlated positively with mitochondrial and lipid metabolism genes (Fig. 1A), as well as genes involved in mitochondrial dynamics (Fig. 1B-1C). In adipose tissue, IL10 transcripts correlated positively with mitochondrial, lipid metabolism and caspase pathway related transcripts (Fig. 1D). Adipose tissue IL10 also correlated with some mitochondrial dynamics genes, particularly Opa1 and Mfn2 (Fig. 1E-1F). Next, we evaluated a group of obese non-diabetic subjects submitted to bariatric surgery (Suppl. Fig. 1). Blood IL10 levels underwent a reduction eight months after surgery (Fig. 1G), when body mass was reduced by 25% (Suppl. Table 2); this was accompanied by a reduction of whole body energy expenditure (Fig. 1H). Before surgery, there were positive correlations between IL10 and whole body energy expenditure (Fig. 1I) and IL10 and standardized uptake value (SUV) in the supraclavicular region (Fig. 1J), whereas after surgery both correlations were lost (Fig. 1K-1L). Pre- and post-surgery blood IL10 levels were not correlated with whole body glucose tolerance, as evaluated by euglycemichyperinsulinemic clamp (Fig. 1M-1N).

IL10 correlates with BAT metabolism and mitochondria related transcripts in mice

Next, we performed bioinformatics analysis employing a dataset of BAT transcripts from distinct mice strains (Andreux 2012). There were positive correlations between BAT IL10 and mitochondrial, NAD replenisher, lipid

metabolism and caspase/ubiquitin related transcripts (Fig. 2A). In addition, using a public gene expression dataset from C57/BL6 mice, we demonstrate that adipose tissue IL10 and STAT3 expressions were stimulated shortly after the treatment with the 3-adrenergic agonist CL-316,243 (18) (Fig. 2B). However, the acute treatment of mice with IL10 increased neither BAT temperature nor O₂ consumption (Suppl. Fig 2A-2E). In addition, in an immortalized BAT adipocyte cell line, acute treatment with IL10 did not modify PKA substrate phosphorylation (Suppl. Fig. 2F-2G).

Reduced whole body IL10 leads to cold intolerance

At base-line (room temperature 22±1°C), IL10 KO mice presented lower BAT temperature (Fig. 2C-2D) and lower whole-body energy expenditure per leanmass than wild-type mice (Fig. 2E). However, BAT weight, BAT total protein, BAT protein density, BAT total UCP1 and UCP1 adjusted for total BAT protein were similar to control (Suppl. Fig. 3A-3E). In addition, there were no differences in CL-316,243-stimulated changes in BAT temperature and whole body O₂ consumption (Suppl. Fig. 3F-3G). Upon cold exposure (4°C), IL10 KO mice presented 50% mortality after 6 h (Fig. 2F). This was not accompanied by changes in BAT and tail temperature (Fig. 2G-2H). In newborn wild-type C57/BL6 mice, the immunoneutralization of IL10 resulted in 100% mortality after 5 h cold-exposure (Fig. 2I), which was accompanied by reduced BAT and tail temperature (Fig. 2J-2K). In order to determine if IL10 deficiency could affect diet-induced thermogenesis, we fed mice on a high-fat diet for four weeks and evaluated parameters related to energy-expenditure; as shown in Suppl. Fig. 4A there was no difference in whole-body O₂ consumption as well as no differences in BAT Pgc1 and Ucp1 transcripts (Supp. Fig. 4B-4C).

Impaired base-line and UCP1-dependent BAT mitochondrial respiration in IL10 KO mice

In order to determine in vivo thermogenic response, mice were exposed to cold (4oC) for 2 h and then submitted to a PET/CT scan. There was no difference in [18F]-FDG uptake by iBAT between WT and IL10 KO mice (Suppl. Fig. 5A). In addition, using an in vivo three-dimensional multiphoton image stacks, we

showed that mean lifetime of FAD and NADH were longer in IL10 KO BAT, which resulted in no difference in the redox potential of NADH (Suppl. Fig. 5B-5E). As stated by Feldmann (11), there are three types of thermogenic response: basal energy expenditure, UCP1-dependent and UCP1-independent thermogenesis. Although we performed tests that indirectly analyzed BAT adaptive response, there were responses preserved as in PET-CT and redox ratio. Thus, to address the effects of IL10 absence on mitochondrial function in BAT, we performed oxygen consumption measurement in isolated mitochondria; complex I-driven respiration (pyruvate + malate) under state 2 (Fig. 3A) as well as under state 3u (Fig. 3A) and UCP1-dependent respiration (Fig. 3A) were all impaired in IL10 KO mice. Otherwise, there were no changes in phosphorylative respiration, either coupled to maximal ATP synthesis (state 3ADP) (Fig. 3D), or after inhibition of ATP synthase (State 4oligo) (Fig. 3A). The expression of TFAM and OXPHOS complex proteins were similar between IL10 KO and wild-type mice (Suppl. Fig. 6A-6B). Respiration was not affected in mitochondria isolated from the liver of IL10 KO mice (Suppl. Fig. 6C). Because IL10 KO mice present a base-line inflammatory phenotype with elevated TNF alpha blood levels, which could potentially affect BAT mitochondria function, we treated mice for two weeks with an anti-TNFa therapeutic monoclonal antibody (Infliximab) and evaluated mitochondrial function. As depicted in Figure 3B, the immunoneutralization of TNF alpha did not modify basal, maximal and UCP1 dependent mitochondrial respiration (Fig. 3C) in wild-type and IL10 KO mice. Together, these data show that IL10 KO mice present reduced UCP1dependent and maximal capacity of the respiratory chain in BAT mitochondria that are not modified by the inhibition of TNFa.

Changes in transcript expression of mitochondrial genes in rodent and human IL10-related genetic defects

A transcriptome analysis (RNAseq) was performed in samples obtained from the BAT of IL10 KO mice and respective controls (Fig. 3D-3G). As shown in Fig. 3D, there was a major impact of IL10 deficiency in the whole transcriptome of mice BAT. In functional cluster analysis, organelle membrane and mitochondria inner membrane transcripts were amongst the most important groups of BAT genes undergoing differential regulation related to IL10 deficiency (Fig. 3E-3G). In order to provide an additional clinical proof-of-concept for the experimental evidence of IL10/inflammation-dependent abnormalities of BAT mitochondria, we performed a whole-blood transcriptome analysis of two female siblings that are homozygous for a synonymous mutation located at the last base pair of exon 4 of the IL10RA gene (homozygous: c537G>A: p.T197T splicing). This pathogenic mutation (9) alters the splice donor site resulting in two different mRNA splice products: i, an 18 bp deletion of the 3' end of exon 4; ii, a product lacking exon 4 (170 bp). The girls had a genetic diagnosis made early on life because of a severe intestinal inflammatory condition compatible with Crohn's disease. The parents were also evaluated as controls. Similarly to the finding in BAT of IL10 KO mice, IL10 signaling defect in humans was accompanied by a major change in blood transcript expression (Fig. 3H). Mitochondrial outer membrane transcripts were amongst the most important cluster of genes modified by the IL10RA defect (Fig. 3I-3K). A number of mitochondria dynamics-related transcripts were similarly regulated in BAT of IL10 KO mice and blood of humans with mutation of the IL10RA gene (Fig. 3L).

IL10 KO mice have abnormal structural mitochondria organization and dynamics shifted toward fission

Analysis of mitochondria ultrastructure under transmission electron microscopy showed that BAT mitochondria of IL10 KO mice presented an aberrant structure with a round shape and complete disorganization of cristae (Fig. 4A). This was not observed in muscles, which presented mitochondria with normal shape and cristae in IL10 KO mice (Supp. Fig. 7A-7B). Again, because of the potential involvement of systemic inflammation in the abnormalities of BAT mitochondria in IL10 KO mice, we treated mice with Infliximab and evaluated BAT mitochondria morphology; in this case, despite the fact the most mitochondria remained with a round shape, cristae organization was mostly corrected (Fig. 4A). Next, we counted mitochondria in images obtained from transmission electron microscopy; there were changes neither in mitochondrial number (Fig. 4B) nor in total mitochondria area (Fig. 4C); however, the individual area per

mitochondria was increased in IL10 KO mice (Fig. 4D). The determination of major and minor mitochondrial axis (aspect ratio) confirmed the rounder shape of IL10 KO mice BAT mitochondria, suggesting mitochondrial fragmentation (Fig. 4E). In addition, IL10 KO mice presented a major reduction in BAT mitochondria cristae density (Fig. 4F) accompanied by a reduction in cristae number (Fig. 4G), which is consistent with the decreased overall respiratory capacity. The treatment with Infliximab partially rescued most of the morphological abnormalities in the BAT mitochondria of IL10 KO mice (Fig. 4B-4G). Because IL10 loss was accompanied by fragmentation of BAT mitochondria, we evaluated the effects of immunoneutralization of IL10 on OPA1, which is a protein involved in cristae ultrastructure integrity; as shown in Figure 4H there were no changes in the total protein amounts of MFN2 and the long and short forms of OPA1; however, there was an increase in the ratio short/long OPA1 forms indicating an increased proportion of fusion-deficient short form (Fig. 4I). To further explore the role of IL10 in the regulation of proteins involved in BAT mitochondrial dynamics, we acutely treated an immortalized BAT adipocyte cell line with either IL10 or an immunoneutralizing IL10 antibody; as shown in Figures 4J-K, IL10 immunoneutralization resulted in the increase of the proportion of fusion-deficient short form of OPA1. Finally, MEFs expressing dsRed-Mito were treated either with an immunoneutralizing IL10 antibody or with rotenone and mitochondria network was evaluated; as show in Figures 4L-4Q, the immunoneutralization of IL10 led to an increased mitochondria fragmentation (Fig. 4L-4O) and a reduction in the aspect ratio (Fig. 4P) and the form factor (degree of branching) (Fig. 4Q).

Discussion

Systemic low-grade inflammation is a hallmark of obesity and is regarded as the most important mechanism linking obesity and insulin resistance (10, 11). Studies have provided strong experimental and clinical evidence to support a role for inflammation in the dysfunction of most tissues/organs with important involvement in metabolism, which are structurally and functionally affected during the course of obesity (19). This can be exemplified and illustrated by

changes in structure (steatosis/fibrosis/cirrhosis) and function (abnormal lipid and glucose metabolism) in the liver (20, 21) as well as changes in structure (gliosis/loss of blood-brain barrier integrity) and function (abnormal control of food intake) in the hypothalamus in obesity (22-24). The BAT has emerged as a promising target for the treatment of obesity because of its involvement in the thermal regulation of endothermic organisms producing heat at the expense of energy (25). However, the role of inflammation in the putative structural and functional abnormalities of BAT in obesity is still a matter of investigation.

Here, we employed an animal model of chronic systemic inflammation to evaluate potential changes in BAT structure and function. IL10 KO mice are widely used in studies aimed at evaluating the impact of inflammation on distinct organs and systems (16, 26). They present increased circulating levels of inflammatory cytokines and abnormal regulation of both innate and adaptive immune responses (16, 27). The potential involvement of anomalous systemic immune regulation caused by abnormalities of the IL10 system in insulin resistance and obesity has been previously evaluated in experimental and clinical/epidemiological studies (28, 29). In humans, undisputedly high level of evidence was provided by the demonstration that a low capacity to produce IL10 is associated with insulin resistance and metabolic syndrome (29). In rodents the beneficial effects of IL10 protecting against insulin resistance has been demonstrated by different approaches which, taken together, suggest that IL10 can act directly improving insulin action, and indirectly, controlling inflammation and consequently attenuating insulin resistance (28, 30-32).

Before evaluating the structural and functional aspects of BAT in IL10 KO mice we used bioinformatics to ask if IL10 transcript levels would correlate with the transcripts of proteins intimately related to BAT function and/or thermogenic activity. For that, we took advantage of large public transcript databases that have been previously used to study other metabolic questions (33, 34). Both, in humans and mice, we found direct correlation of IL10 with mitochondria function, mitochondria dynamics and lipid metabolism, which strongly supported our working hypothesis. In order to seek for further clinical support for our hypothesis, we evaluated a group of obese patients undergoing bariatric surgery. Obesity is one of the most important factors contributing to low BAT activity in humans (9, 15, 35, 36). Upon reduction of body mass, BAT activity increases in association with both the attenuation of insulin resistance and reduction of systemic inflammation (8, 9, 15). Here, we showed that before surgery, there was a correlation between IL10 and BAT activity; however, after body mass reduction this association was lost. This finding further suggests that both IL10 and systemic inflammation play combined roles in the control of BAT in humans.

In IL10 KO mice, the most remarkable finding was that virtually all mitochondria visualized under transmission electron microscopy presented a round shape with severe damage of the cristae. This aspect suggests mitochondrial swelling, which is an abnormality known to occur in conditions such as cancer (37), chronic liver disease (38), exposure to certain pharmacological agents (39) and poisoning (40); and, the causes could be changes in transition permeability (41) and Ca²⁺ overload (42). The homeostasis of mitochondrial volume is essential for preserving the structural integrity of the organelle and depending on the magnitude and persistence of stimuli leading to this alteration, it can be accompanied by changes in mitochondrial function (43).

We performed a number of experiments to evaluate different aspects of BAT mitochondrial function in IL10 KO mice. First, we demonstrated that genetic disruption of IL10 resulted in lower BAT temperature when mice were maintained at room temperature; and, reduced thermogenic capacity when mice were exposed to cold. This phenotype was, to a certain degree, similar to the one described for UCP1 deficient mice (44). Despite the fact that UCP1 expression was not affected, the BAT mitochondria from IL10 KO mice presented a defect of base-line and UCP1-dependent respiration. Abnormal mitochondria cristae structure and defective respiration associated with thermogenic instability have been reported in mice lacking components of the mitochondria fusion/fission machinery, particularly affecting OPA1 (45). The total OPA1 protein expression was not altered in IL10 KO mice; however, we found an increase in the ratio short/long forms of OPA1. Moreover, in the human bioinformatics analysis the expression of IL10 in the adipose tissue was

correlated with OPA1, further suggesting that IL10 system controls, either directly or indirectly mitochondrial dynamics.

OPA1 is a GTPase that plays an important role in the control of mtDNA stability, mitochondrial fusion and cristae integrity (46, 47). It has been shown that the balance between short and long forms of OPA1 is essential for the coordinated maintenance of both structure and function of mitochondria (48). The complete deletion of OPA1 leads to severe functional and structural abnormalities of mitochondria, and the expression of either long or short isoforms can rescue the energetic defect independently of the structural abnormality (48, 49). However, in order to obtain a completely normal mitochondrial phenotype, both at the structural and functional levels, the balance between short and long forms must be achieved (48). However, it is currently unknown to what degree inflammation and IL10 abnormal function can impact on OPA1.

In the context of our experimental model, we asked if the structural and functional abnormalities of BAT mitochondria were due to the lack of IL10 activity, systemic inflammation, or a combination of both. For that, we employed three distinct strategies; i, the immunoneutralization of TNF - using a monoclonal antibody (Infliximab) which is approved for clinical use in inflammatory diseases, such as rheumatoid arthritis and Crohn's disease (50, 51); ii. treatment of mice and cells with exogenous IL10: iii. immunoneutralization of IL10 in wild-type mice and cells. As a whole, our experiments showed that the immunoneutroalization of TNF - had a significant effect on BAT mitochondria morphology, partially rescuing the cristae defect phenotype; however, it resulted in no change in mitochondrial respiration. The immunoneutralization of IL10 resulted in thermogenic instability, mitochondrial fragmentation and increase of the proportion of fusion-deficient short form of OPA1. However, the treatment with IL10 alone was not capable of changing either the function or the structure of mitochondria. Taken together, these findings reinforce the role of a combined action of IL10 and inflammation in the development of BAT mitochondria abnormalities.

In summary, this is the first study showing that BAT mitochondria are severally damaged at the structural and functional levels in IL10 deficiency. Both IL10 deficiency, per se, and systemic inflammation, which is originated as a result of the immune imbalance resulting from the lack of IL10 act in combination to damage the mitochondria. We propose that abnormal activity of the IL10 system may contribute to defects in energy metabolism in medical conditions on which systemic inflammation is patent.

Materials and Methods

Overview of the experimental procedure

After pre-screening, subjects were submitted to nutritional evaluation, body composition, and psychological evaluation in the bariatric surgery outpatient clinic. Once they were included in the surgery group, we performed (¹⁸F)-FDG-PET/CT-scan, dual x-ray absorptiometry (DXA), hyperinsulinemic-euglycemic clamp, indirect calorimetry and blood collection. Roux en-Y Gastric Bypass (RYGB) was performed by the same surgeon, similarly to previous study of our group(8). An open biopsy was performed during the RYGB in the supraclavicular in order to obtain a sample of brown adipose tissue below the superficial cervical fascia. One year after RYGB, the volunteers were submitted to new cervical biopsy in the same site.

PET/CT Image analyses in humans

Images will be acquired and processed using a Siemens Somatom Emotion Duo Biograph (Siemens Medical Solutions, Chicago, IL) and analyzed using a Syngo VB10B WinNT 4.0 station, also from Siemens. (¹⁸F)-FDG will be obtained from the Nuclear and Energy Research Institute (IPEN, Sao Paulo, Brazil). Patients and controls will be admitted to a preparatory exam room wearing light clothing (0.49 clo) and exposed for 1.0 h to 17-18°C. An intravenous injection of 4.0 MBq/kg of (¹⁸F)-FDG will be given and the patients will remain in the preparatory exam room for an additional 1.0 h before images were acquired. The CT part of the PET/CT study will be performed as a low-dose acquisition with 130 kV, 50–80 mA, 0.8 s per CT rotation, pitch 4.0–5.0

mm, field of view of 500 mm and a scan speed of 24.6 mm/s. The PET scan will be performed immediately after the CT scan without changing the position of the patient, always in the craniocaudal direction from head to proximal thighs. Images will be acquired in five to seven bed positions, 4.0 min/bed position. Active brown/beige adipose tissue will be considered present when there is radiopharmaceutical uptake corresponding to at least 2.0 maximal standardized uptake value (SUV) in areas with the CT density of adipose tissue (-250 to -50 Hounsfield units). Based on these parameters the subjects will be scored negative or positive for the presence of active brown/beige adipose tissue. In addition, SUV will be also obtained from the right arm deltoid muscle. Maximal SUV will be always employed in all comparisons. Then, PET/CT images were reconstructed into voxels of 1.5 x 1.5 x 1.5 mm for metabolic image and of 1.0 x 1.0 x 1.5 mm for CT images. The PET images with a resolution of 5-mm were imported into ImageJ for image processing, along with low-dose CT images. The free PET/CT plug-in was developed for BAT evaluation by Beth Israel Deaconess Medical Center. Specific CT and PET ranges were set up to localize fat (-300 to -10 HU) and active brown fat (18 F-FDG uptake (g/mL) > 1.5)(52). Initially, active brown fat was quantified as SUV normalized to total body mass.

Euglycemic insulin clamp technique

The hyperinsulinemic-euglycemic clamp was performed as stated previously(53).

Dual x-ray absorptiometry

Whole-body and regional body composition will be estimated by using DXA (software version encore 10.0; Lunar iDXA, Madison, WI). The system software provide the mass of lean soft tissue, fat, and bone mineral for both the whole body and specific regions. With the use of specific anatomic landmarks, the legs and arms are defined by this method as the soft tissue extending from a line drawn through and perpendicular to the axis of the femoral neck and angled with the pelvic brim to the phalange tips and the soft tissue extending from the center of the arm socket to the phalange tips, respectively. DXA will be also used to provide descriptive measures of total-body fat across the 2 subject groups(54).

Indirect calorimetry in humans

Indirect calorimetry will be performed using a Vmax system (Yorba Linda, CA, USA) automated gas analysis system. After an equilibration period of 10 min, the average gas exchange rates recorded over the two 30-min steady-state periods (90–120) will be used to calculate rates of glucose oxidation, lipid oxidation, and respiratory exchange ratio (RER) and resting energy expenditure (REE) as previously described(55).

Bioinformatic analysis.

Correlation analyses were performed from data on BAT and phenotypes (BXD Published Phenotypes) from families of BXD inbred mice as previously published(34), and data on adipose tissue mRNA of human individuals (GTEXv5 Human adipose tissue RefSeq (Sep15) RPKM log2) or whole-blood mRNA of human individuals (INIA whole blood Affy MoGene 1.0 ST (Nov10)), generated as part of of the Genotype-Tissue Expression (GTEx) project (www.genenetwork.org)(17). All accessible on GeneNetwork. Heatmaps were created using GENE-E (The Broad Institute, www.broadinstitute.org/cancer/software/GENE-E/).

RNA sequencing (RNA-Seq)

Libraries were prepared using TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit (Illumina). Sequencing was performed at the Bioinformatics section of the Life Sciences Core Facility (LaCTAD), part of the University of Campinas (UNICAMP), using the HiSeq. 2500 (Illumina), which resulted in ~20 million reads per sample. Reads were analysed for quality, filtered and trimmed using FASTQC. Available: https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/) (56) and Trimmomatic (57). Reads were aligned using Bowtie2 software (for Homo Sapiens)(58) and TopHat to mm9 version of the mouse genome(59). Differentially expressed genes (DEGs) were identified using DESeq2 software(60). Gene Ontology analysis was performed using DAVID 6.8 Beta(61). Heatmaps were created using GENE-E software (http://www.broadinstitute.org/cancer/ software/GENE-E/index.html).

Mice

C57 / BL6J mice were obtained from CEMIB / UNICAMP. B6.129P2-II10tm1Cgn / J mice, also known as IL10 KO, were obtained from University of São Paulo (USP), but originally from Jackson Laboratories. The mice were fed and acclimated according to the regulations of the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC). In the study, only 8-12 week male mice acclimatized at 22 degrees Celsius were used in a light cycle of 12 hours and a dark cycle of 12 hours with free access to water and diet. All animal procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee at UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil. All the experimental procedures were conducted in accordance with guides of the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and the National Council of Animal Experimentation (CONCEA). Animals were sacrificed by cervical dislocation after intraperitoneal anesthesia with xylazine (10 mg / kg) and ketamine (120 mg / kg) to obtain interscapular BAT.

PET/CT image analyse in mice

Images will be acquired and processed using ALBIRA, a small animal PET/SPECT/CT in vivo imaging system (Bruker® Corporation, Massachussetts, USA) and analyzed using a PMOD workstation, also from Bruker®. (18F)-FDG will be obtained from the Nuclear and Energy Research Institute (IPEN, Sao Paulo, Brazil). Mice will be anesthetized with 2% isoflurane and will be injected in the venous sinus with 5 MBq of 2-deoxy-2-[18F]fluoro-d-glucose ([18F]FDG). Mice will be keep awake and exposed at 4 °C during uptake period of 60 minutes. The computed tomography will be performed as a low-dose acquisition with 80 kVp, 160 μ A, and 1024 projections, during 0.8s per CT rotation, pitch 4.0 – 5.0 mm, field of view of 71.3mm and a scan speed of 24.6 mm/s. The PET scan will be performed immediately after the CT scan without changing the position of the mice, always in the craniocaudal direction from head to proximal thighs. After 60 minutes of [18F]FDG uptake, PET scans were started for a total

duration of 40 min. PET scans will be reconstructed using the PMOD in LabPET software and images will be calibrated in Bq per mL by scanning a phantom cylinder. Regions of interest (ROI) will be drawn on surrounding slices on CT scans and reconstructed as three-dimensional volumes to measure densities and uptake of each desired tissue. Then, PET images will be processed and converted into standardized uptake values (SUVs) adjusted by body weight of each animal and superimposed on the CT anatomical image to measure [18F]FDG uptake in the indicated tissue.

In vivo Multiphoton Redox and Fluorescence Lifetime Imaging (FLIM)

Before imaging, the mice were anesthetized with an intraperitoneal injection of a mixture of ketamine (200mg / kg), xylazine (5mg / kg) and diazepam, and the interscapular BAT was dissected rapidly and then minced into very small fragments in a chambered coverglass for acquiring images. The multiphoton images were obtained with the Zeiss LSM780-NLO com Becker&Hickl Photon Counting at the University of Campinas. The source was a titanium sapphire laser. A FLIM image z-stack was collected from the same tissue volume at 890-nm excitation. Single photon counting was accomplished at a rate of 5×10^4 photons per second. We used SPCImage software (Becker and Hickl) to evaluate the fluorescence lifetime decay curves. The redox ratio was calculated dividing FAD fluorescence intensity by NADH fluorescence intensity, pixel by pixel, using ImageJ.

Mitotracker labeling and morphology

The mitochondrial selective tetramethylrosamine fluorescence probe was purchased from Molecular Probes® (Mitotracker® Orange CMTMRos-M7510) and the samples were processed according to the manufacturer's guidance. A stock aliquot of 1mM was prepared in DMSO. To label the mitochondria, the sample of ex vivo interscapular brown adipose tissue from the mouse was cut into minimal fragments with scissors before being incubated with the molecular probe; in turn, the cells were simply incubated with the probe, which passes through the plasma membrane by diffusion and is concentrated in active mitochondria, with the characteristic of not being easily washed after dissipation of the membrane potential, not even after the fixation of the cell. Briefly, the cells or tissue were plated in 35/10 mm chambers in 4 compartments and glass bottom, and then incubated with MitoTracker Orange (200 nM) in DMEM highglucose growth medium preheated to 37 degrees Celsius, not enriched with serum, for 45 minutes. After staining, the solution was changed to pre-warmed PBS and the cells were observed in a fluorescence microscope to assess if they had reached the appropriate fluorescence. Carefully, the PBS was removed and replaced by preheated growth medium containing 4% paraformoldehyde at 37 degrees Celsius for 15 minutes. After fixation, the cells were washed several times in PBS and stored for further imaging and morphometric analysis.

Cell culture

Brown immortalized preadipocytes were developed as previously described(62). The preadipocytes were differentiated after grown adipocytes to 95-97% confluence in complete medium following standard protocol (DMEM containing 10% FBS, 0.5 mM isobutylmethylxanthine, 1 mM dexamethasone, 20 nM insulin, rosiglitazone 0.5 μ M and 1 nM T3 for 2 days, then followed by 5–7 days of incubation with DMEM containing 10% FBS, 20 nM insulin, rosiglitazone 1 μ M and 1 nM T3)(63). The differentiation of MEF cells (ATCC) was achieved by maintaining the cells with DMEM containing 10% FBS for 2 days.

Quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted from mouse BAT by using TRIzol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations. The cDNA synthesis was performed using 2.0 µg of total RNA according the manufacturer's instructions (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Life Technologies). Each PCR contained 25–40 ng of reverse-transcribed RNA, 0.25 µl of each specific primer, Taqman Universal master mix (Life Technologies), and RNAse-free water to a 10 µl final volume. Real time PCR analysis of gene expression was carried out

in an ABI Prism 7500 sequence detection system (Applied Biosystems). Primers were purchased from Applied Biosystems or Integrated DNA Technologies. Relative gene expression was normalized to that of GAPDH in all samples according to the $\Delta\Delta$ Ct method. Real-time data were analyzed using the Sequence Detector System 1.7 (Applied Biosystems). The nucleotide sequences of the primers are: Pgc-1 α - Forward primer (5'-3') AGCCGTGACCACTGACAACGAG and Reverse primer (5'-3') GCTGCATGGTTCTGAGTGCTAAG: Ucp1 Forward primer (5'-3') GGCCTCTACGACTCAGTCCA (5'-3')and Reverse primer TAAGCCGGCTGAGATCTTGT.

Rectal temperature and interscapular brown adipose tissue thermal release

To evaluate core temperature we performed the measurements using a digital thermometer (BAT-7001H, Clifton, NJ, USA) in combination with a copper-constantan thermocouple rectal probe (RET-3) obtained from Physitemp Instruments (Clifton, NJ, USA). The probe was petroleum jelly-lubricated before being positioned in the rectum at 2-2.5 cm for 1 second. Measurements were taken every hour after exposure to cold. For the detection of interscapular brown adipose tissue thermal release, an infrared (IR) camera (FLIR T450sc, FLIR Systems, Inc. Wilsonville, USA) was employed to obtain surface images of each mouse with an IR resolution of 320×240 pixels and a Thermal sensitivity / NETD of <40 mK @ +30 ° C (+ 86 ° F). Images were presented in rainbow high contrast form available in the color palette of the free software FLIR Tools IR.

Protein extraction and Immunoblotting

Following dissection, mouse brown adipose tissue were homogenized in RIPA lysis buffer [150 mM NaCl, 50 mM Tris, 5 mM EGTA, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate (DOC), 0.1% sodium dodecyl sulphate (SDS), supplemented with protease inhibitors]. The resulting homogenate was then centrifuged at 16,100 x g for 15 min, and the supernatant was stored at -80 °C until use. The protein concentration of each sample was determined by the biuret reagent protein assay. The samples were denatured by adding Laemmli

buffer (0.5 M Tris, 30% glycerol, 10% SDS, 0.6 M DTT, 0.012% bromophenol blue) and heating for 5 min at 95 °C. Equal amounts of protein were loaded onto the gel and proteins were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), using 4%–15% gels. Then, proteins were transferred electrophoretically to nitrocellulose membranes. Thereafter, the membranes were blocked for 1 h at room temperature in Tris-buffered saline (137 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.6) containing 0.1% Tween-20 (TBS-T) and 5% low-fat milk, followed by incubation with the primary antibody pJAK1 (Abcam, ab 47435), UCP-1 (Abcam, #10983), or II-10R (Santa Cruz Biotecnology, #sc987)] overnight at 4 °C. After washing for 1 h in TBS-T with 0.5% low-fat milk, the membranes were incubated for 2 h at room temperature with the respective horseradish peroxidase (HRP)-linked secondary antibody (1:5,000; GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), prepared in TBS-T with 1% low-fat milk. For protein detection, the membranes were processed using the Clarity western ECL Substrate (ECL; BioRad), and images were acquired in Image Quant LAS4000 (GE Healthcare, Life Sciences). Additionally, the membranes were reprobed and tested for β -tubulin (Sigma, #T5168) or β -actin (Abcam, #ab8227) as a loading control. Image J 1.48v (National Health) was used for digital quantification of band intensity.

BAT mitochondria isolation:

Interscapular brown adipose tissue (BAT) depots were pooled from 3 mice and placed in ice-cold medium 1, containing 250 mM sucrose, 10 mM Hepes and 1 mM EGTA, and freed of white fat and. Preparations from wild-type and IL10 KO mice were made and run in parallel. The brown adipose tissue was finely minced with scissors and homogenized in a Potter homogenizer. Throughout the isolation process, tissues were kept in ice. Mitochondria were isolated by differential centrifugation. Brown adipose tissue homogenates were centrifuged at 8 500 g for 10 min at 4 °C. The resulting supernatant, containing floating fat, was discarded. The pellet was resuspended in ice-cold medium 1. The resulting supernatant was centrifuged at 8500 g for 10 min. The resulting mitochondrial pellet was resuspended in ice-cold medium 2, containing 100 mM

KCI, 20 mM Hepes (pH 7.2), 1 mM EDTA, 0.6% fatty-acid-free BSA and centrifuged at 8500 g for 10 min. The final mitochondrial pellets were resuspended in the same medium. The concentration of mitochondrial protein was measured using the Bradford method with BSA as a standard. Adapted from (64).

Oxygen consumption

Oxygen consumption rates were monitored using a Clark-type oxygen electrode coupled to a high-resolution Oroboros respirometry system at 37 °C(65). Brown-fat mitochondria (0.0625 mg protein/ml) were incubated in a medium consisting of 125 mM sucrose, 20 mM Hepes (pH 7.2), 2 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 4 mM KP, 0.1% fatty-acid-free BSA. Respiratory activity of mitochondria was measured in the presence of 5 mM pyruvate plus 3 mM malate. UCP1-linked respiration was measured as the difference between the initial respiration rate and the residual respiration following addition of 1 mM GDP. Maximal oxygen consumption rates were obtained by addition of CCCP to a final concentration of 4 μ M–5 μ M.

Electron microscopy

For ultrastructural analysis of mitochondria, fragments of the adipose tissue obtained from wild type and IL10 mice were dissected, fixed with 2.5% glutaraldehyde in cacodilate buffer 0.1 M (pH 7.2) and stored 2 hours in the same fixative at -4°C. The specimens were post fixed with osmium in imidazol buffer 0.2 M (pH. 75), and then dehydrated and embedded in Durcupan ACS (Fluka, Steinheim, Switzerland). Ultrathin cross sections were collected on formvar coated copper grids, contrasted with uranyl acetate and lead citrate, and examined in a Tecnai G2 Spirit Twin (FEI, Hillsboro, OR) transmission electron microscope operated at 80 kV. Images were acquired using a Gatan Orius SC1000B camera (Pleasanton, CA, USA). Mitochondria density, size and morphology was analyzed using ImageJ as seen in (66).

Metabolic phenotyping and locomotor activity. The physiological markers of energy expenditure (O_2 consumption, CO_2 production, RER, heat

rate, and ambulatory activity) were measured using an open circuit calorimeter system, the LE405 Gas Analyzer (Panlab – Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA), which was calibrated as recommended by the manufacturer. Mice were acclimated for 24 h in the apparatus, and thereafter, data were recorded for 24 h (light and dark periods).

Statistical Analyses

Data display the average of three independent experiments, unless indicated. Error bars display standard error of the mean (SEM). Statistical significance was calculated based on two-tailed unpaired student's t-test for two-group comparisons. Two-way ANOVA was used for multiple-group comparisons (Sidak's multiple comparison test). Kendall rank correlation was used for nonparametric human data. P-value less than 0.05 was considered significant in the study. The sample size of mice and cells experiments were settled based on our experience. The sample size of human protocol was determined based on previous results from our group and also by a statistical power of 0.8 using GPower software. We excluded cervical brown adipose tissue biopsies from humans for poor quality of planned western blots exploring IL10 pathway. The graphs were performed using GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA).

Supplementary materials

Supplementary figure 1. Flow diagram of volunteers Supplementary figure 2. No acute thermogenic response to IL10 treatment.

Supplementary figure 3. IL10 KO mice have preserved thermogenic capacity.

Supplementary figure 4. IL10 KO mice have preserved diet-induced thermogenesis.

Supplementary figure 5. Assesment of iBAT glycolysis using ¹⁸F-

FDG PET/CT and analysis of metabolic status using FLIM.

Supplementary figure 6. Analysis of OXPHOS complex proteins and liver mitochondria respiration.

Supplementary Table 1. Clinical trials on going targeting brown

adipose tissue

Supplementary Table 2. Unadjusted baseline and 1-year follow-up for clinical variables

References and Notes:

1. Lopez M. EJE PRIZE 2017: Hypothalamic AMPK: a golden target against obesity? Eur J Endocrinol. 2017;176(5):R235-R46.

2. van den Berg SM, van Dam AD, Rensen PC, de Winther MP, Lutgens E. Immune Modulation of Brown(ing) Adipose Tissue in Obesity. Endocr Rev. 2017;38(1):46-68.

3. Sidossis L, Kajimura S. Brown and beige fat in humans: thermogenic adipocytes that control energy and glucose homeostasis. J Clin Invest. 2015;125(2):478-86.

4. Lopez M, Nogueiras R, Tena-Sempere M, Dieguez C. Hypothalamic AMPK: a canonical regulator of whole-body energy balance. Nat Rev Endocrinol. 2016;12(7):421-32.

5. Ramseyer VD, Granneman JG. Adrenergic regulation of cellular plasticity in brown, beige/brite and white adipose tissues. Adipocyte. 2016;5(2):119-29.

6. Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. N Engl J Med. 2009;360(15):1509-17.

7. van Marken Lichtenbelt WD, Vanhommerig JW, Smulders NM, Drossaerts JM, Kemerink GJ, Bouvy ND, et al. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. N Engl J Med. 2009;360(15):1500-8.

8. Rodovalho S, Rachid B, De-Lima-Junior JC, van de Sande-Lee S, Morari J, Carvalho HM, et al. Impairment of body mass reduction-associated activation of brown/beige adipose tissue in patients with type 2 diabetes mellitus. Int J Obes (Lond). 2017;41(11):1662-8.

9. Rachid B, van de Sande-Lee S, Rodovalho S, Folli F, Beltramini GC, Morari J, et al. Distinct regulation of hypothalamic and brown/beige adipose tissue activities in human obesity. Int J Obes (Lond). 2015;39(10):1515-22.

10. Velloso LA, Folli F, Saad MJ. TLR4 at the Crossroads of Nutrients, Gut Microbiota, and Metabolic Inflammation. Endocr Rev. 2015;36(3):245-71.

11. Hotamisligil GS. Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders. Nature. 2017;542(7640):177-85.

12. Mercer SW, Trayhurn P. Effects of ciglitazone on insulin resistance and thermogenic responsiveness to acute cold in brown adipose tissue of genetically obese (ob/ob) mice. FEBS Lett. 1986;195(1-2):12-6.

13. Mercer SW, Trayhurn P. The development of insulin resistance in brown adipose tissue may impair the acute cold-induced activation of thermogenesis in genetically obese (ob/ob) mice. Biosci Rep. 1984;4(11):933-40.

14. Guerra C, Navarro P, Valverde AM, Arribas M, Bruning J, Kozak LP, et al. Brown adipose tissue-specific insulin receptor knockout shows diabetic phenotype without insulin resistance. J Clin Invest. 2001;108(8):1205-13.

15. Vijgen GH, Bouvy ND, Teule GJ, Brans B, Hoeks J, Schrauwen P, et al. Increase in brown adipose tissue activity after weight loss in morbidly obese subjects. J Clin Endocrinol Metab. 2012;97(7):E1229-33.

16. Rennick DM, Fort MM. Lessons from genetically engineered animal models. XII. IL-10-deficient (IL-10(-/-) mice and intestinal inflammation. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2000;278(6):G829-33.

17. Consortium G. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. Nat Genet. 2013;45(6):580-5.

18. Granneman JG, Li P, Zhu Z, Lu Y. Metabolic and cellular plasticity in white adipose tissue I: effects of beta3-adrenergic receptor activation. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2005;289(4):E608-16.

19. Hotamisligil GS. Foundations of Immunometabolism and Implications for Metabolic Health and Disease. Immunity. 2017;47(3):406-20.

20. Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, Cerrelli F, Lenzi M, Manini R, et al. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. Hepatology. 2003;37(4):917-23.

21. Beraza N, Malato Y, Vander Borght S, Liedtke C, Wasmuth HE, Dreano M, et al. Pharmacological IKK2 inhibition blocks liver steatosis and initiation of non-alcoholic steatohepatitis. Gut. 2008;57(5):655-63.

22. Ignacio-Souza LM, Bombassaro B, Pascoal LB, Portovedo MA, Razolli DS, Coope A, et al. Defective regulation of the ubiquitin/proteasome system in the hypothalamus of obese male mice. Endocrinology. 2014;155(8):2831-44.

23. Cavadas C, Aveleira CA, Souza GF, Velloso LA. The pathophysiology of defective proteostasis in the hypothalamus - from obesity to ageing. Nat Rev Endocrinol. 2016;12(12):723-33.

24. Ramalho AF, Bombassaro B, Dragano NR, Solon C, Morari J, Fioravante M, et al. Dietary fats promote functional and structural changes in the median eminence blood/spinal fluid interface-the protective role for BDNF. J Neuroinflammation. 2018;15(1):10.

25. Schrauwen P, van Marken Lichtenbelt WD. Combatting type 2 diabetes by turning up the heat. Diabetologia. 2016;59(11):2269-79.

26. Nakagome K, Dohi M, Okunishi K, Komagata Y, Nagatani K, Tanaka R, et al. In vivo IL-10 gene delivery suppresses airway eosinophilia and hyperreactivity by down-regulating APC functions and migration without impairing the antigen-specific systemic immune response in a mouse model of allergic airway inflammation. J Immunol. 2005;174(11):6955-66.

27. Rennick D, Davidson N, Berg D. Interleukin-10 gene knock-out mice: a model of chronic inflammation. Clin Immunol Immunopathol. 1995;76(3 Pt 2):S174-8.

28. Cintra DE, Pauli JR, Araujo EP, Moraes JC, de Souza CT, Milanski M, et al. Interleukin-10 is a protective factor against diet-induced insulin resistance in liver. J Hepatol. 2008;48(4):628-37.

29. van Exel E, Gussekloo J, de Craen AJ, Frolich M, Bootsma-Van Der Wiel A, Westendorp RG, et al. Low production capacity of interleukin-10 associates with the metabolic syndrome and type 2 diabetes : the Leiden 85-Plus Study. Diabetes. 2002;51(4):1088-92.

30. Kim HJ, Higashimori T, Park SY, Choi H, Dong J, Kim YJ, et al. Differential effects of interleukin-6 and -10 on skeletal muscle and liver insulin action in vivo. Diabetes. 2004;53(4):1060-7.

31. Hong EG, Ko HJ, Cho YR, Kim HJ, Ma Z, Yu TY, et al. Interleukin-10 prevents diet-induced insulin resistance by attenuating macrophage and cytokine response in skeletal muscle. Diabetes. 2009;58(11):2525-35.

32. Nishimura S, Manabe I, Takaki S, Nagasaki M, Otsu M, Yamashita H, et al. Adipose Natural Regulatory B Cells Negatively Control Adipose Tissue Inflammation. Cell Metab. 2013.

33. Schughart K, consortium S. SYSGENET: a meeting report from a new European network for systems genetics. Mamm Genome. 2010;21(7-8):331-6.

34. Andreux PA, Williams EG, Koutnikova H, Houtkooper RH, Champy MF, Henry H, et al. Systems genetics of metabolism: the use of the BXD murine reference panel for multiscalar integration of traits. Cell. 2012;150(6):1287-99.

35. Villarroya F, Cereijo R, Villarroya J, Giralt M. Brown adipose tissue as a secretory organ. Nat Rev Endocrinol. 2017;13(1):26-35.

36. Granneman JG. Renaissance of brown adipose tissue research: integrating the old and new. Int J Obes Suppl. 2015;5(Suppl 1):S7-S10.

37. Arismendi-Morillo G. Electron microscopy morphology of the mitochondrial network in human cancer. Int J Biochem Cell Biol. 2009;41(10):2062-8.

38. Grattagliano I, Russmann S, Diogo C, Bonfrate L, Oliveira PJ, Wang DQ, et al. Mitochondria in chronic liver disease. Curr Drug Targets. 2011;12(6):879-93.

39. Dalla Via L, Garcia-Argaez AN, Martinez-Vazquez M, Grancara S, Martinis P, Toninello A. Mitochondrial permeability transition as target of anticancer drugs. Curr Pharm Des. 2014;20(2):223-44.

40. Proudfoot AT. Aluminium and zinc phosphide poisoning. Clin Toxicol (Phila). 2009;47(2):89-100.

41. Rasola A, Bernardi P. Mitochondrial permeability transition in Ca(2+)dependent apoptosis and necrosis. Cell Calcium. 2011;50(3):222-33.

42. Giorgi C, Baldassari F, Bononi A, Bonora M, De Marchi E, Marchi S, et al. Mitochondrial Ca(2+) and apoptosis. Cell Calcium. 2012;52(1):36-43.

43. Kaasik A, Safiulina D, Zharkovsky A, Veksler V. Regulation of mitochondrial matrix volume. Am J Physiol Cell Physiol. 2007;292(1):C157-63.

44. Enerback S, Jacobsson A, Simpson EM, Guerra C, Yamashita H, Harper ME, et al. Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. Nature. 1997;387(6628):90-4.

45. Quiros PM, Ramsay AJ, Sala D, Fernandez-Vizarra E, Rodriguez F, Peinado JR, et al. Loss of mitochondrial protease OMA1 alters processing of the GTPase OPA1 and causes obesity and defective thermogenesis in mice. EMBO J. 2012;31(9):2117-33.

46. Belenguer P, Pellegrini L. The dynamin GTPase OPA1: more than mitochondria? Biochim Biophys Acta. 2013;1833(1):176-83.

47. Vidoni S, Zanna C, Rugolo M, Sarzi E, Lenaers G. Why mitochondria must fuse to maintain their genome integrity. Antioxid Redox Signal. 2013;19(4):379-88.

48. Del Dotto V, Mishra P, Vidoni S, Fogazza M, Maresca A, Caporali L, et al. OPA1 Isoforms in the Hierarchical Organization of Mitochondrial Functions. Cell Rep. 2017;19(12):2557-71.

49. Zanna C, Ghelli A, Porcelli AM, Karbowski M, Youle RJ, Schimpf S, et al. OPA1 mutations associated with dominant optic atrophy impair oxidative phosphorylation and mitochondrial fusion. Brain. 2008;131(Pt 2):352-67.

50. Ungar B, Kopylov U. Advances in the development of new biologics in inflammatory bowel disease. Ann Gastroenterol. 2016;29(3):243-8.

51. Smolen JS, Landewe R, Bijlsma J, Burmester G, Chatzidionysiou K, Dougados M, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2016 update. Ann Rheum Dis. 2017;76(6):960-77.

52. Leitner BP, Huang S, Brychta RJ, Duckworth CJ, Baskin AS, McGehee S, et al. Mapping of human brown adipose tissue in lean and obese young men. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017;114(32):8649-54.

53. DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. Am J Physiol. 1979;237(3):E214-23.

54. Kim J, Wang Z, Heymsfield SB, Baumgartner RN, Gallagher D. Totalbody skeletal muscle mass: estimation by a new dual-energy X-ray absorptiometry method. Am J Clin Nutr. 2002;76(2):378-83.

55. Frayn KN. Calculation of substrate oxidation rates in vivo from gaseous exchange. J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol. 1983;55(2):628-34.

56. Andrews S. FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data 2010 [Available from: http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/.

57. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics. 2014;30(15):2114-20.

58. Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. Ultrafast and memoryefficient alignment of short DNA sequences to the human genome. Genome Biol. 2009;10(3):R25.

59. Trapnell C, Pachter L, Salzberg SL. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. Bioinformatics. 2009;25(9):1105-11.

60. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. Genome Biol. 2014;15(12):550.

61. Huang dW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. Nat Protoc. 2009;4(1):44-57.

62. Mori MA, Thomou T, Boucher J, Lee KY, Lallukka S, Kim JK, et al. Altered miRNA processing disrupts brown/white adipocyte determination and associates with lipodystrophy. J Clin Invest. 2014;124(8):3339-51.

63. Aune UL, Ruiz L, Kajimura S. Isolation and differentiation of stromal vascular cells to beige/brite cells. J Vis Exp. 2013(73).

64. Shabalina IG, Ost M, Petrovic N, Vrbacky M, Nedergaard J, Cannon B. Uncoupling protein-1 is not leaky. Biochim Biophys Acta. 2010;1797(6-7):773-84.

65. Hütter E, Unterluggauer H, Garedew A, Jansen-Dürr P, Gnaiger E. Highresolution respirometry--a modern tool in aging research. Exp Gerontol. 2006;41(1):103-9.
66. Sood A, Jeyaraju DV, Prudent J, Caron A, Lemieux P, McBride HM, et al. A Mitofusin-2-dependent inactivating cleavage of Opa1 links changes in mitochondria cristae and ER contacts in the postprandial liver. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014;111(45):16017-22.

67. Gelman A, Shalizi CR. Philosophy and the practice of Bayesian statistics. Br J Math Stat Psychol. 2013;66(1):8-38.

Acknowledgments: The authors thank Erika Roman, Gerson Ferraz and Marcio Cruz for technical collaboration in the study. Joseane Morari for your assistance in RNA extraction from whole blood. Rodrigo Carraro for your assistance in one experiment involving animal treatment. We thank the staff of the Life Sciences Core Facility (LaCTAD) from State University of Campinas (UNICAMP), for the Cell Biology analysis. We thank the access to equipment and assistance provided by the National Institute of Science and Technology on Photonics Applied to Cell Biology (INFABIC) at the State University of Campinas; INFABIC is co-funded by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (08/57906-3) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (573913/2008-0)" Funding: The study was supported by grants from the São Paulo Research Foundation (2013/07607-8) and Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Cientifico. Author contributions: Here describe the contributions of each author (use initials) to the paper. Competing interests: The authors declare no conflict of interest.



Figure 1. IL10 is associated with mitochondrial genes and BAT function.

a, Heatmap of the correlation between whole-blood II-10 mRNA levels and mitochondrial/lipid metabolism genes.

b, Whole-blood transcripts of mitochondrial dynamics-related genes.

c, Correlation graphs between mitochondrial dynamic-related genes and II-10 mRNA in whole-blood.

d, Heatmap of the correlation between mitochondrial, lipid and caspase genes and II-10 mRNA levels in adipose tissue from healthy humans (GN, n = 175).

e, Heatmap of the correlation between II-10 mRNA and mitochondrial dynamicsrelated genes in adipose tissue from healthy humans.

f, Correlation plots of mitochondrial dynamics-related genes and II-10 in adipose tissue from healthy humans (n = 175).

Perioperative serum levels of IL-10 (**g**) and energy expenditure (**h**) in patients undergoing RYGB (n=12).

i, Correlation of serum IL10 levels and energy expenditure in obese individuals before RYGB.

j, Correlation of serum IL10 levels and BAT activity in obese individuals before RYGB.

k, Correlation of serum IL10 levels and energy expenditure in obese individuals after RYGB.

I, Correlation of serum IL10 levels and BAT activity in obese individuals after RYGB.

m, Correlation of serum IL10 levels and insulin sensitivity in obese individuals before RYGB.

n, Correlation of serum IL10 levels and insulin sensitivity in obese individuals after RYGB (n=12).



Figure 2. IL10 deficiency promotes cold intolerance.

a, Correlation graph of expression levels of mitochondrial, NAD replenisher, lipid metabolism and caspase/ubiquitin pathways related transcripts in mice BAT.

b, Heatmap of the expression levels of II10, II10ra, II10rb and Stat3 in

subcutaneous mice adipose tissue after short-term treatment of b3-adrenergic agonist CL-316,243 during 1, 3 or 6 days.

c-d, Basal surface infrared thermography analysis from iBAT temperature of WT and IL10KO mice housed at 22°C.

e, Energy expenditure (W) per animal is plotted against lean body mass (measured by dual energy X-ray absorptiometry).

f, Percent survival of 10-week-old male mice challenged with cold (n = 6 per genotype). **g-h**, Infrared thermography analysis.

g, Surface iBAT temperature of 10-week-old male mice challenged with cold.

h, Tail temperatures obtained 0.5 cm from the tail base.

i, Percent survival of 4-week-old male mice treated during 2 weeks with serum (40 ng per mice) or anti-II10 (40ng per mice) challenged with cold (n = 6 per genotype).
j-k, Infrared thermography analysis.

j, Surface iBAT temperature of 4-week-old male mice treated during 2 weeks with serum (40ng per mice) or anti-II10 (40ng per mice) challenged with cold.

k, Tail temperatures obtained 0.5 cm from the tail base from 4-week-old male mice treated during 2 weeks with serum (40ng per mice) or anti-II10 (40ng per mice) challenged with cold.



Figure 3. IL10 KO mice have impaired UCP1-dependent respiration and ...

a-e, Quantification of complex I-driven (in the presence of 5 mM pyruvate plus 3 mM malate) oxygen consumption rates (OCR) in brown-fat isolated mitochondria from wild type (WT) and IL10 KO mice under different respiratory states.

a, Complex I-driven respiration under state 2 quantifies no-ATP synthesisrelated respiration (proton leak)

b, State 3u quantifies maximal respiration induced by FCCP.

c, UCP1-dependent OCR quantifies GDP-inhibitable rates in relation to initial respiration rates.

d, State 3 quantifies OCR coupled to maximal ATP synthesis.

e, State 4oligo quantifies rate of basal non-phosphorylating oxygen consumption after oligomycin.

f, Quantification of complex I-driven (pyruvate-malate) oxygen consumption rates (OCR) in brown-fat isolated mitochondria from wild type (WT) and IL10 KO mice treated with saline or infliximab during 2 weeks under different respiratory states. State 2 quantifies no-ATP synthesis-related respiration (proton leak). -UCP1-dependent OCR quantifies initial respiration rates after GDP and state 3u quantifies maximal respiration induced by FCCP.

g, UCP1-dependent OCR quantifies GDP-inhibitable rates in relation to initial respiration rates. Bar graphs show average \pm SEM per experiment (n= 3 - pool of 3 mice per group). * represents significance using Student's t-test, unpaired, p< 0.05.





a. Representative BAT TEM-image of sphere-shaped mitochondria in IL10KO mice versus wild-type (WT) and IL10 KO mice treated with infliximab (100 μg in 100 μl saline/dose, i.p.,twice a day) during two weeks.

b-g. Effect of IL10 absence (KO mice), saline ((100 μ I/dose, i.p., twice a day) and infliximab treatment (100 μ g in 100 μ I saline/dose, i.p.,twice a day, during two weeks) on mitochondria number, mitochondria area, mitochondria shape (aspect ratio – ratio between major and minor axis), cristae density and cristae number.

h. Representative Western blot measuring Opa1 and Mfn2 in total lysates from BAT-IL10-KO (KO) male mice and wild type (WT). BAT, brown adipose tissue

i. Densitometry quantification of Opa1 short form to longer form. N = 5 per group.

j. Representative Western blot measuring Opa1 in total lysates from immortalized brown adipocyte cell line treated with either recombinant IL10 or an immunoneutralizing IL10 antibody.

k. Densitometry quantification of Opa1 short form to longer form. N = 3 per group.

I. MEF expressing mito-DsRed and imaged after treatment with DMSO, anti-IL10 (10µg/mL) or rotenone (500nM) during 12h.

m-o. Plots of aspect ratio against form factor calculated from the image L.

p-q Means ± SEM of aspect ratio (p) and form factor (q) obtained from the data in (I) quantified in (m-o). N = 70 cells in total. Statistical analysis was performed using ordinary one-way ANOVA.

Supplementary Materials:



Supplemental Figure 1. Flow diagram of volunteers





Alfa-tubulin

Supplemental Figure 2. No acute thermogenic response to IL10 treatment.

Male WT mice were treated with saline, IL-10 recombinant (10 μ g/kg/dose) or the β_3 -agonist CL316,243 (1mg/kg/day) to evaluate acute thermogenic response after IL10.

a.Representative surface infrared iBAT temperature image before and after indicated treatment.

b.Surface infrared iBAT temperature before and after indicated treament.

c.Surface infrared iBATdelta temperature before and after indicated treament.

d.Whole body O₂ consumption before and after indicated treament.

e.Nonshivering thermogenesis calculated from (d) data.

f.Acute treatment of immortalized primary brown adipocyte precursor cells. Western blot representative image measuring Phospho-(Ser/Thr) PKA Substrates after indicated treatments.

g.Densitometry quantification of Phospho-(Ser/Thr) PKA Substrates normalized by alfa tubulin. N = 3 per condition. Ordinary one-way ANOVA was performed.



Supplementar Figure 3. IL10 KO mice have preserved thermogenic capacity.

a.Wet tissue weight of BAT.

b.iBAT total protein content

c.iBAT protein density

d.UCP1 per mg of tissue

e.UCP1 total content per depot calculated as B multiplied by C. WT was normalized to 1. Representative western blot image measuring UCP1. N = 4 per condition.

f.BAT thermogenic capacity analysis using CL-induced thermogenesis test in awake animals. Increase above the baseline iBAT temperature or VO₂ consumption after CL were depicted in (f) and (g), respectibvely. Data indicate means \pm SEM. N = 4 mice per condition. Student's unpaired t-test was performed. * p< 0.05



Supplemental Figure 4. IL10 KO mice have preserved diet-induced thermogenesis.

a.Effect of high-fat diet on oxygen consumption (VO₂) in awake male WT mice. N = 4.

b.Effect of high-fat diet on PGC-1 α mRNA levels in awake male WT mice and IL10KO mice. N = 5 per condition.

c.Effect of high-fat diet on Ucp1 mRNA levels in awake male WT mice and

IL10KO mice. N = 5 per condition. Data indicate means \pm SEM. *p \leq 0.05; **p \leq 0.01; ***p \leq 0.001, Statistical analysis was performed using Student's unpaired t test.





PET/CT and analysis of metabolic status using FLIM.

a, Representative image and quantification of 2h cold-stimulated iBAT ¹⁸F-FDG uptake (SUVmax) in WT and IL10 KO mice.

b, Representative fluorescence lifetime imaging obtained using ex vivo iBAT from WT and IL10 KO mice.

c, FLIM of autofluorescent NADH

d, FLIM of autofluorescent FAD

e, Reduction-oxidation pair NADH:NAD+ (redox ratio) between WT and IL10 KO mice.

In (a), n = 4. In (b)–(e), n = 5. Data indicate means \pm SEM. **p \leq 0.01. Statistical analysis performed using Student's unpaired t test.



Supplemental Figure 6. Analysis of OXPHOS complex proteins and liver mitochondria respiration.

a, Representative Western blot image of OXPHOS complex proteins and TFAM in iBAT from WT and IL10 KO mice. N = 4 per condition.

b, Densitometry quantification of TFAM normalized by alfa-tubulin. N = 4 per condition.

c, Quantification of complex I-driven (pyruvate-malate) oxygen consumption rates (OCR) in liver isolated mitochondria from wild type (WT) and IL10 KO mice. State 2 quantifies no-ATP synthesis-related respiration (proton leak). State 3 quantifies OCR coupled to maximal ATP synthesis. State 4oligo quantifies rate of basal non-phosphorylating oxygen consumption after oligomycin and state 3u quantifies maximal respiration induced by FCCP.

Bar graphs show average \pm SEM per experiment (n= 3 - pool of 3 mice per group). Statistical analysis was performed using Student's t-test, unpaired, p< 0.05.

Supplemental table 1. Clinical trials on going targeting brown adipose tissue

Study title	Identifier	Intervention
Longitudinal Follow-up of Brown Adipose Tissue Function and Structure	NCT01985503	Observational
The Effects of Capsinoids on Brown Adipose Tissue Activation in Obesity	NCT03110809	Capsinoid vs placebo
Study of the Effect of Vagus Nerve Stimulation on Human Brown Adipose Tissue Activity	NCT01491282	Enabling and disabling vagal nervous system
STAGES Trial: Study of Adiposity, Growth and Endocrine Stages	NCT01460784	Observational
Dopaminergic Effects on Brown Adipose Tissue	NCT02428933	Bromocriptine
<u>CB1 Receptors in Human</u> Brown Adipose Tissue	NCT02941172	Observational
Brown Adipose Tissue and Body Mass Index	NCT02173834	Observational
Detection of Brown Adipose Tissue by Magnetic Resonance Imaging (BAT_PET/MRI)	NCT02237872	Observational
Secretin Activates Human <mark>Brown</mark> Adipose Tissue.	NCT03290846	Secretin
Effects of b3-Adrenergic Receptor Agonists on Brown Adipose Tissue	NCT01783470	Mirabegron
The Detection and Factors of Brown Adipose Tissue in Different Locations of Adults	NCT01387451	Observational
Hyperpolarized Xenon-129 Magnetic Resonance Imaging and Spectroscopy of Brown Fat: Healthy Adult Volunteer Pilot Study	NCT02220426	Observational

Mirabegron and <mark>Brown Adipose</mark> Tissue	NCT03012113	Mirabegron
The Incidence and Factors of Brown Adipose Tissue in Chinese	NCT01381042	Observational
<u>The Incidence,Factors,and</u> Importance of Brown Adipose Tissue in Chinese Adults	NCT01387438	Observational
Exenatide and Brown Adipose Tissue (exe01)	NCT03002675	Exenatide
Adenosine and A2A Receptors in Human Brown Adipose Tissue	NCT03327168	Adenosina
<u>The Role of Brown Adipose</u> Tissue in Triglyceride Clearance in <u>People</u>	NCT02786251	Observational
Activation of Cervical and Upper Thoracic <mark>Brown Adipose Tissue</mark> in Humans Via Beta-adrenergic Stimulation	NCT01015794	Ephedrine Hydrochloride
Brown Adipose Tissue Activity and Age	NCT02130154	Observational
Influence of Liraglutide, a GLP-1 Receptor Agonist, on Brown Adipose Tissue (BAT) Activity in Humans	NCT02718950	Liraglutide
Brown Fat <u>Activity and Bariatric</u> Surgery	NCT03168009	Bariatric surgery
Brown Adipose Tissue <u>Activity in</u> Pre- and Postmenopausal Women	NCT02927392	Leuprolide acetate
<u>The Effect of</u> Brown Adipose Tissue <u>Activation on Insulin</u> <u>Sensitivity in Humans</u>	NCT01791114	Observational
GLP-1 Agonism Stimulates Browning of Subcutaneous	NCT02170324	Exenatide

<u>White</u> Adipose Tissue in ObesityMen		
Effects of Sleep Restriction on BAT Activation in Humans	NCT02770118	Sleep deprivation
Calorie Restriction Retards the Aging Process	NCT01508091	Calorie restriction
<u>Monounsaturated Fatty Acids</u> and Brown/Beige Adipose Tissue in Humans	NCT03024359	Extra virgin olive oil
Brown Adipose Tissue <u>Activity and</u> Thyroid Hormone	NCT02499471	Levothyroxine therapy
Enhancement of Brown Adipose Tissue Function Via Chronic Pharmacological Treatment	NCT02236962	Placebo, Ephedrine and pioglitazone
Activating Brown Adipose Tissue Through Exercise	NCT02365129	Exercise training
<u>A Role for</u> Brown Adipose Tissue <u>in</u> Postprandial Thermogenesis?	NCT01974778	Meal
Studying the Effect of Capsinoids on Brown FatUsing Infrared Thermal Imaging.	NCT01961674	Capsinoid/placebo and rice
BRown Fat Activity Measurement With Infrared imaginG tHermography andThermogenesis - the BRIGHT Study	NCT02790255	Observational
Chronic Intermittent Cold Exposure on Weight Loss	NCT01312090	Whole-body cryotherapy
Efficacy of Pharmacological Stimulation of BAT and WAT in Lean and Obese Young Adults	NCT02354807	Mirabegron
Effects of Hyperthyroidism on Amount and Activity of Brown Adipose Tissue	NCT02133040	Observational
Collection of Human Tissue Samples From the	NCT02274805	Observational

Neck Region for Characterization of Its Molecular and Biochemical Signatures		
Effects of Estrogen Deficiency on Energy Expenditure	NCT01846728	Estrogen supression
Leipzig Adipose Tissue Childhood Cohort	NCT02208141	Observational
Human Brown Adipose Tissue and Mitochondrial Respiration	NCT03111719	Observational
Cold Stress Stimulate the Browing of Subcutaneous White Adipose in Healthy Adults	NCT02159144	Cold stress
Brown Fat Activation Study	NCT02919176	Mirabegron and pioglitazone
Nicotinamide Riboside and Metabolic Health	NCT02835664	Nicotinamide Riboside (Niagen)
Sildenafil Activates Browning of White Adipose and Improves Insulin Sensitivity	NCT02524184	Sildenafil
Energy Expenditure Responses to Different Temperatures	NCT01568671	Different temperatures
<u>Cold Induced Activation of Brown</u> Adipose Tissue in Humans	NCT03096535	Cold stress
Correlation of Irisin and Adipokine Levels With Body Mass Index and Risk Factors for Metabolic Syndrome in Hispanic Children	NCT02320110	Observational
Physiological Responses and Adaptation of Brown Adipose Tissue to Chronic Treatment With Beta 3-Adrenergic Receptor Agonists	NCT03049462	Mirabegron
A Cold Physical Treatment to Manage Insulin Resistance	NCT02852759	Selective Cold treatment and Electroacupuncture

Supplemental Table 2. Unadjusted baseline and 1-year follow-up for clinical variables

Variable	Before surgery	After surgery
Age, yr	36.2	37.5
E 1 0/	(32.7 – 39.8)	(34.0 – 41.1)
Female sex, %	100	100
Weight, kg	108.41	80.48***
Mean (95% CI)	(100.66 – 116.16)	(76.85 – 84.11)
Change from baseline, %		-25.90
//		<i>/</i>
Mean (95% Cl)		(-30.54
	04 50	21.26)
Glucose, mg/dL	91.56	//./2***
Mean (95% CI)	(82.78 – 100.34)	(71.27 – 84.19)
Insulin, mUI/mL	17.21	4.69**
Mean (95% Cl)	(11.05 – 23.39)	(2.88 – 6.51)
M-value 120-180	2.95	7.13**
	(0.00 0.00)	
	(2.30 - 3.60)	(5.30 - 8.98)
SUV, g/mL	2.88	4.65
Mean (95% Cl)	(-0.60 – 7.33)	(0.68 – 8.64)
LDL cholesterol. mg/dL	107	75.73*
Mean (95% Cl)	(85.80 – 128.20)	(54.88 - 96.59)
HDL cholesterol, mg/dL	45	51.73
	<i>/</i>	
Mean (95% CI)	(40.11 – 49.90)	(40.59 – 62.88)
Triglycerides, mg/dL	83.11	66
Mean (95% Cl)	(53.69 – 112.54)	(47.57 – 84.43)
Total cholesterol, mg/dL	169.78	139.55*
Mean (95% Cl)	(149.85 – 189.70)	(117.88 – 157.22)
CRP, mg/dL	18.33	4.09**
Mean (95% Cl)	(-14.63 – 51.28)	(-2.14 – 10.30)

All patients were submitted to RYGB. The sample size does not include data from patients who lost follow-up. We performed Wilcoxon matched-pairs signed rank test. No adjustments were performed for multiple comparisons. To convert glucose to millimoles per liter, multiplies by 0.01129. To convert cholesterol to millimoles per liter, multiplies by 0.02586. To convert triglycerides to millimoles per liter, multiplies by 0.02586. To convert triglycerides to millimoles per liter, multiplies by 0.01129. CI, confidence interval; SUV, standardized uptake value; LDL, low-density lipoprotein; HDL, high-density lipoprotein. *p<0.05, **p<0.01, **p<0.001

5 DISCUSSÃO GERAL

A termogênese tem um papel central na evolução dos animais homeotérmicos pois permite a ocupação de nichos ecológicos onde ocorram temperaturas extremas, ampliando assim seu acesso a alimento(Blix, 2016). Sob uma perspectiva médica, estudos desenvolvidos ao longo da ultima década colocaram órgãos e sistemas envolvidos com a regulação da termogênese, particularmente o BAT, numa posição de potencial interesse como alvos para o tratamento da obesidade, diabetes e outras condições metabólicas, uma vez que como consequência da termogênese existe consumo de energia e portanto regulação nos estoques de lipides e carboidratos no organismo(Rosen e Spiegelman, 2006). A termogênese é regulada principalmente por meio do sistema nervoso simpático através da liberação de norepinefrina nos terminais simpáticos do BAT. Assim, uma estratégia para recrutar BAT com finalidade terapêutica seria a utilização de fármacos com atividade agonista da sinalização adrenérgica(Schrauwen e Van Marken Lichtenbelt, 2016). Entretanto, num estudo clinico em que se testou um composto com atividade 3-adrenergica foram observados efeitos adversos principalmente cardiovasculares, resultando numa redução do otimismo quanto ao possível uso clinico desta classe de drogas(Cypess et al., 2015). Com este conceito em mente, pesquisadores tem buscado avanços na caracterização dos mecanismos regulatórios da atividade do BAT com o objetivo de desenvolver estratégias mais seguras para o tratamento de doenças metabólicas. Estudos recentes têm sugerido que o browning e a atividade do BAT requerem sinais imunes de células da imunidade inata tipo 2 (Nussbaum et al., 2013; Van Den Berg et al., 2017), uma vez que macrófagos M2 poderiam representar hipoteticamente uma fonte extra de noradrenalina(Nguyen et al., 2011; Hui et al., 2015; Liu et al., 2015). Tais estudos tem impulsionado a busca pela caracterização do cross-talk imunometabólico e a regulação do BAT e da termogênese de uma forma geral(Man et al., 2017). Neste contexto, Rao e

colaboradores demonstraram que macrófagos M2 são capazes de sintetizar noradrenalina de novo, e de modo parácrino induzir a sinalização adrenérgica nos adipócitos brancos e marrons circunvizinhos induzindo lipólise e termogênese (Qiu et al., 2014; Rao et al., 2014). Além disso, identificaram, uma nova substancia, meteorina-like, produzida por adipócitos após estímulo pelo frio, a qual também foi implicada na indução de termogênese nonshivering (Rao et al., 2014). Outra célula imune, célula linfoide da imune inata tipo 2 (ILC2), foi descrita como capaz de induzir ativação de macrófagos alternativamente ativados através da sinalização do receptor IL4R e promover browning (Brestoff et al., 2015). Similarmente, também através da ativação alternativa de macrófagos, a adiponectina parece ter um papel no controle do browning após estímulo pelo frio (Hui et al., 2015). Por fim, de forma similar, a restrição calórica pode induzir browning através da sinalização de citocinas tipo-2 (Fabbiano et al., 2016). Assim, considerando que componentes da resposta imune estão envolvidos na síntese de novo de catecolaminas, na lipólise e na termogênese nonshivering, nós aventamos a hipótese de que IL10 poderia ter um papel crucial no controle do gasto energético. Além disso, como a IL10 tem um papel muito importante na contra-regulação de respostas inflamatórias, aventamos a hipótese de que, durante a deficiência de IL10, circunstancia na qual ocorre um estimulo potente da atividade inflamatória, a termogênese pelo BAT poderia ser comprometida.

A fim de avaliar a participação da IL10 no recrutamento do tecido adiposo marrom em humanos, avaliamos pacientes obesos submetidos à cirurgia bariátrica, uma vez que em tais pacientes ocorre recrutamento de BAT e redução da atividade inflamatória subclínica associada a obesidade (Rodovalho *et al.*, 2017). Os paciente foram submetidos a PET/CT e a medida do gasto energético no pré- e pós-operatório. Houve, como esperado, um recrutamento significativo de BAT após a cirurgia, com aumento no volume de tecido em todos os sítios. Antes da cirurgia, houve relação direta entre níveis sanguíneos de IL10 e atividade de BAT, porem apos a cirurgia, quando houve perda considerável de peso, a relação foi perdida. Este resultado sugeriu que não apenas a quantidade de IL10 mas também a atividade inflamatória sistêmica poderiam atuar controlando a atividade de BAT em humanos.

Uma vez que o principal sinal para o recrutamento do BAT é o estímulo adrenérgico, avaliamos o efeito do tratamento com um agonista adrenérgico sobre a transcrição de genes envolvidos com a resposta a IL10; para tal, utilizamos dados de transcriptoma de camundongos disponibilizados publicamente e empregamos analise por bioinformática. Em paralelo ao aumento da atividade de *browning* do tecido bege ocorreu aumento da expressão de II10 e Stat3, o que sugere participação da via IL10/STAT3 na resposta a sinais adrenérgicos em tecidos termogenicamente ativos(Shi *et al.*, 2016). Tal dado sugere que, durante situações em que a termogênese do BAT esta ativada por meio de sinais adrenérgicos, pode ocorrer ativação paralela de vias dependentes de sinais de IL10.

A seguir avaliamos o impacto da deficiência de IL10 e da inflamação sistêmica sobre marcadores da atividade de BAT. Para tal, utilizamos camundongos KO para IL10, modelo frequentemente utilizado para o estudo de doenças inflamatórias crônicas(Kühn et al., 1993). Inicialmente, vimos que mesmo na ausência de IL10 há preservação de termogênese induzida pela dieta, com a expressão de PGC-1 alfa e UCP1, assim como o consumo global de oxigênio similar aos níveis observados nos animais wild-type. Ademais, a capacidade termogênica frente ao estimulo por exposição a baixa temperatura é ao menos parcialmente preservada, uma vez que o conteúdo total de UCP1 e a captação de glicose radiomarcada no BAT interescapular são similares aos observados nos camundongos controle. Entretanto, a deficiência de IL10 resulta uma redução do gasto energético basal, um dos componentes da resposta termogênica, bem como numa piora acentuada da respiração dependente de UCP1 em mitocôndrias isoladas; houve ainda uma redução da respiração desacoplada porem uma preservação da respiração no estado 3. Estes dados são compatíveis com o fato de camundongos IL10 KO apresentarem uma preservação da captação global de glicose pelo BAT.

Coletivamente, nossos dados indicam que IL10 contribui para a respiração basal e para a respiração dependente de UCP-1, bem como com a respiração desacoplada. Nossos estudos falharam em detectar mudanças na termogênese induzida por noradrenalina, como ocorre com os animais *KO* para

100

o receptor de IL4 e para a IL33(Nguyen *et al.*, 2011; Odegaard *et al.*, 2016). Entretanto, era esperado que o KO de IL10 levasse a um fenótipo complexo no que diz respeito ao controle metabólico e da termogênese, uma vez que este modelo não apresenta obesidade espontaneamente, como aquela observada em camundongos *KO* para Tyk2, proteína que faz parte da cascata STAT3. Este camundongo tem atrofia do BAT que se deve ao fato de STAT3 regular diretamente um dos principais promotores de *browning* (Derecka *et al.*, 2012). Outro fato que contribui para a complexidade fenotípica dos camundongos KO para IL10 e a inflamação sistêmica que se mantem quando os camundongos são criados em biotérios convencionais.

Os resultados obtidos no nosso estudo, guando analisados em paralelo aos estudos feitos com camundongos KO para Tyk2 levam ao questionamento a respeito do papel da obesidade no gasto energético global. De acordo com conceitos construídos durante a década de 1970(Himms-Hagen e Desautels, 1978), a obesidade deveria ser invariavelmente acompanhada de um estado hipometabólico. Entretanto, estudos mais recentes vem apresentado resultados que confrontam esse conceito. Jan Nedergaard e seus colaboradores dissecaram as adaptações fisiológicas do camundongo ob/ob, deficiente de leptina e com obesidade espontânea grave. Diferentemente do que era anteriormente proposto, camundongos ob/ob não apresentam atrofia do BAT, e tem capacidade termogênica total preservada, conforme medido pela UCP1 total interescapular, e pelas respostas a estímulos adrenérgicos(Fischer et al., Tais características são também encontradas no camundongo 2016). deficiente em IL10 foco do nosso estudo. Um fenótipo interessante do camundongo ob/ob é a sua intolerância ao frio; quando exposto a baixa temperatura, camundongos ob/ob apresentam queda progressiva da temperatura corporal podendo resultar em morte (Fischer et al., 2016). Assim, investigamos se a deficiência de IL10 poderia interferir com o controle da estabilidade térmica em animais expostos a baixa temperatura. Animais IL10 KO adultos apresentaram uma maior mortalidade após seis horas de exposição aguda ao frio. Porem muito mais acentuada foi a mortalidade de camundongos wild-type jovens nos quais a IL10 foi imunoneutralizada, sugerindo que a IL10 tem um papel importante na estabilidade térmica durante uma fase da vida em

que a adaptação a variações ambientais da temperatura ainda estão se desenvolvendo.

Dentre todos os resultados obtidos neste estudo, aquele que tem maior impacto devido a sua magnitude visual é a anormalidade estrutural das mitocôndrias do BAT nos camundongos IL10 KO. Mitocôndrias arredondadas e com intensa desorganização da estrutura e distribuição de cristas são vistas em condições que levam ao inchamento mitocondrial, como em exposição a alguns tipos venenos, ou alguns fármacos, ou ainda em células neoplásicas(Wai e Langer, 2016). Além da intensa desorganização estrutural, ha grande alteração da rede de mitocôndrias no interior dos adipócitos do BAT, o que sugere que ha aumento da fragmentação destas organelas. Tanto o tratamento com IL10 como a redução da atividade inflamatória com uso do anticorpo monoclonal anti-TNFa foram capazes de resgatar, pelo menos em parte, as alterações estruturais das mitocôndrias do BAT; porém, somente o tratamento com IL10 foi capaz de resgatar o déficit funcional das mitocôndrias. Tais dados sugerem que as anomalias expressivas da arquitetura e função das mitocôndrias do BAT em camundongos com deficiência de IL10 se devem a uma combinação da falta desta citocina antiinflamatoria e da presença da inflamação sistêmica.

Ao explorar os mecanismos potencialmente envolvidos na desorganização estrutural e fragmentação das mitocôndrias do BAT em animais deficientes em IL10, notamos o aumento na isoforma curta da OPA1, proteína chave na organização estrutural da arquitetura das cristas mitocondriais. Perda global da OPA1 causa fragmentação da rede mitocondrial, desorganização das cristas e piorada capacidade respiratória, o que é parcialmente resgatado com a reexpressão da proteína (Del Dotto *et al.*, 2017). A forma da crista é capaz de determinar a eficiência respiratória mitocondrial e o possível link para isso é a montagem de supercomplexos estruturais dos complexos da cadeia respiratória (Cogliati *et al.*, 2013). Devemos ressaltar que a analise por bioinformática havia revelado a relação entre redução de IL10 e mudanças na expressão de Opa1, o que confere maior nível de evidencia para a relação entre a deficiência de IL10 e as alterações mitocondriais aqui descritas.

Interessantemente, como vimos no nosso modelo humano, o indivíduo obeso apresenta piora da atividade do BAT, compatível com outros estudos em que indivíduos obesos apresentam, de fato, uma piora na termogênese induzida pelo frio(Nahon et al., 2017). Certamente é um dado difícil de transpor do modelo murino para o humano, já que no camundongo, muito embora se pensasse que após muitas semanas de dieta-rica em gordura haveria um prejuízo funcional da atividade do BAT, parece não haver. Camundongos após 40 semanas de dieta tem um aumento na capacidade oxidativa do BAT induzida por ácidos graxos, sem mudança no conteúdo de UCP1, ou no conteúdo protéico de proteínas da cadeia transportadora de elétrons(Mahdaviani et al., 2017). Isto é, mesmo obesos, eles preservam a capacidade termogênica e a termogênese induzida pela dieta. Ao contrário do que se pensava, a geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) no BAT, ao invés de um efeito deletério, suporta a resposta termogênica aguda ao provocar alterações no estado redox de tióis de cisteína do BAT. E ao promover tais mudanças de sulfenilação da UCP1, a geração de EROS ativa a UCP1 de maneira similar aos ácidos graxos(Kazak et al., 2017). Além do papel na regulação da geração de EROS, a ausência de UCP1 promove alterações na homeostase mitocondrial do cálcio e promove mudanças na cadeia transportadora de elétrons e na estrutura mitocondrial (Kazak et al., 2017).

6 CONCLUSÃO

Este estudo demonstra pela primeira vez que a IL10 tem papel importante na homeostase energética ao regular a atividade do BAT. Apresentamos variso níveis de evidencia para reforçar este conceito, partindo das analises de grandes bancos de dados de transcriptomica por bioinformática, somados aos daos que obtivemos a partir do estudo de pacientes obesos e fortemente reforçados pelos estudos com camundongos IL10 KO. Concluímos que a IL10, por seu papel relevante na função e estrutura do BAT emerge como potencial alvo terapêutico para obesidade e outros distúrbios metabólicos e que mais estudos são necessários para definira particularidade mecanisticas de seus

REFERÊNCIAS

ABIZAID, A.; GAO, Q.; HORVATH, T. L. Thoughts for food: brain mechanisms and peripheral energy balance. **Neuron,** v. 51, n. 6, p. 691-702, Sep 2006. ISSN 0896-6273. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16982416 >.

ADUR, J. et al. Optical biomarkers of serous and mucinous human ovarian tumor assessed with nonlinear optics microscopies. **PLoS One,** v. 7, n. 10, p. e47007, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23056557</u> >.

AFSHIN, A. et al. Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. **N Engl J Med,** v. 377, n. 1, p. 13-27, 07 2017. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28604169</u> >.

ANDREUX, P. A. et al. Systems genetics of metabolism: the use of the BXD murine reference panel for multiscalar integration of traits. **Cell**, v. 150, n. 6, p. 1287-99, Sep 2012. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22939713</u> >.

ASHWELL, M. et al. Measurement by radioimmunoassay of the mitochondrial uncoupling protein from brown adipose tissue of obese (ob/ob) mice and Zucker (fa/fa) rats at different ages. **FEBS Lett**, v. 179, n. 2, p. 233-7, Jan 1985. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3967754</u> >.

AUNE, U. L.; RUIZ, L.; KAJIMURA, S. Isolation and differentiation of stromal vascular cells to beige/brite cells. **J Vis Exp**, n. 73, Mar 2013. ISSN 1940-087X. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23568137</u> >.

BAE, J. et al. Activation of pattern recognition receptors in brown adipocytes induces inflammation and suppresses uncoupling protein 1 expression and mitochondrial respiration. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 306, n. 10, p. C918-30, May 2014. ISSN 1522-1563. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24627558</u> >.

BARRINGTON, S. F.; MAISEY, M. N. Skeletal muscle uptake of fluorine-18-FDG: effect of oral diazepam. J Nucl Med, v. 37, n. 7, p. 1127-9, Jul 1996.ISSN0161-5505.Disponívelem:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8965182 >.

BLIX, A. S. Adaptations to polar life in mammals and birds. **J Exp Biol**, v. 219, n. Pt 8, p. 1093-105, 04 2016. ISSN 1477-9145. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27103673</u> >.

BOUTAGY, N. E. et al. Metabolic endotoxemia with obesity: Is it real and is it relevant? **Biochimie,** v. 124, p. 11-20, May 2016. ISSN 1638-6183. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26133659</u> >.

BRESTOFF, J. R. et al. Group 2 innate lymphoid cells promote beiging of white
adipose tissue and limit obesity. Nature, v. 519, n. 7542, p. 242-6, Mar 2015.
ISSN 1476-4687. Disponível em: <
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25533952 >.

CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. **Physiol Rev**, v. 84, n. 1, p. 277-359, Jan 2004. ISSN 0031-9333. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14715917</u> >.

CASAZZA, K. et al. Myths, presumptions, and facts about obesity. **N Engl J Med,** v. 368, n. 5, p. 446-54, Jan 2013. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23363498</u> >.

CATRYSSE, L.; VAN LOO, G. Inflammation and the Metabolic Syndrome: The Tissue-Specific Functions of NF-κB. **Trends Cell Biol**, v. 27, n. 6, p. 417-429, Jun 2017. ISSN 1879-3088. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28237661</u> >.

CHU, D. T.; GAWRONSKA-KOZAK, B. Brown and brite adipocytes: Same function, but different origin and response. **Biochimie,** v. 138, p. 102-105, Jul 2017. ISSN 1638-6183. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28467890</u> >.

COGLIATI, S. et al. Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain supercomplexes assembly and respiratory efficiency. **Cell**, v. 155, n. 1, p. 160-71, Sep 2013. ISSN 1097-4172. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24055366 >.

CONSORTIUM, G. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. **Nat Genet,** v. 45, n. 6, p. 580-5, Jun 2013. ISSN 1546-1718. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23715323</u> >.

CREWE, C.; AN, Y. A.; SCHERER, P. E. The ominous triad of adipose tissue dysfunction: inflammation, fibrosis, and impaired angiogenesis. **J Clin Invest**, v.

127, n. 1, p. 74-82, Jan 2017. ISSN 1558-8238. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28045400</u> >.

CRICHTON, P. G.; LEE, Y.; KUNJI, E. R. The molecular features of uncoupling protein 1 support a conventional mitochondrial carrier-like mechanism. **Biochimie,** v. 134, p. 35-50, Mar 2017. ISSN 1638-6183. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28057583 >.

CYPESS, A. M. et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. **N Engl J Med,** v. 360, n. 15, p. 1509-17, Apr 2009. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19357406</u> >.

_____. Activation of human brown adipose tissue by a β3-adrenergic receptor agonist. **Cell Metab**, v. 21, n. 1, p. 33-8, Jan 2015. ISSN 1932-7420. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25565203</u> >.

_____. Anatomical localization, gene expression profiling and functional characterization of adult human neck brown fat. **Nat Med,** v. 19, n. 5, p. 635-9, May 2013. ISSN 1546-170X. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23603815</u> >.

DE JONG, J. M. et al. A stringent validation of mouse adipose tissue identity markers. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 308, n. 12, p. E1085-105, Jun 2015. ISSN 1522-1555. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25898951 >.

DE PAUW, A. et al. Mitochondrial (dys)function in adipocyte (de)differentiation and systemic metabolic alterations. **Am J Pathol**, v. 175, n. 3, p. 927-39, Sep 2009. ISSN 1525-2191. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19700756 >.

DEFRONZO, R. A.; TOBIN, J. D.; ANDRES, R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. **Am J Physiol**, v. 237, n. 3, p. E214-23, Sep 1979. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/382871</u> >.

DEL DOTTO, V. et al. OPA1 Isoforms in the Hierarchical Organization of Mitochondrial Functions. **Cell Rep,** v. 19, n. 12, p. 2557-2571, Jun 2017. ISSN 2211-1247. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28636943</u> >.

DERECKA, M. et al. Tyk2 and Stat3 regulate brown adipose tissue differentiation and obesity. **Cell Metab,** v. 16, n. 6, p. 814-24, Dec 2012. ISSN

1932-7420. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23217260</u> >.

DODD, G. T. et al. Leptin and insulin act on POMC neurons to promote the browning of white fat. **Cell**, v. 160, n. 1-2, p. 88-104, Jan 2015. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25594176</u> >.

FABBIANO, S. et al. Caloric Restriction Leads to Browning of White AdiposeTissue through Type 2 Immune Signaling. Cell Metab, v. 24, n. 3, p. 434-446,Sep2016.ISSN1932-7420.Disponívelem: <</td>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27568549

FISCHER, A. W. et al. Leptin Raises Defended Body Temperature without Activating Thermogenesis. **Cell Rep**, v. 14, n. 7, p. 1621-1631, Feb 2016. ISSN 2211-1247. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26876182</u> >.

GAO, C. L. et al. Mitochondrial dysfunction is induced by high levels of glucose and free fatty acids in 3T3-L1 adipocytes. **Mol Cell Endocrinol,** v. 320, n. 1-2, p. 25-33, May 2010. ISSN 1872-8057. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20144685</u> >.

GUILHERME, A. et al. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 9, n. 5, p. 367-77, May 2008. ISSN 1471-0080. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18401346</u> >.

O.: GUILLEMOT-LEGRIS. MUCCIOLI, G. G. **Obesity-Induced** Neuroinflammation: Beyond the Hypothalamus. **Trends Neurosci**, v. 40, n. 4, p. 237-253. Apr 2017. ISSN 1878-108X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28318543 >.

HALAAS, J. L. et al. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. **Science,** v. 269, n. 5223, p. 543-6, Jul 1995. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7624777</u> >.

HANSSEN, M. J. et al. Short-term cold acclimation improves insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes mellitus. **Nat Med,** v. 21, n. 8, p. 863-5, Aug 2015. ISSN 1546-170X. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26147760</u> >.

HIMMS-HAGEN, J.; DESAUTELS, M. A mitochondrial defect in brown adipose tissue of the obese (ob/ob) mouse: reduced binding of purine nucleotides and a failure to respond to cold by an increase in binding. **Biochem Biophys Res**
Commun, v. 83, n. 2, p. 628-34, Jul 1978. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/212061</u> >.

HIMSWORTH, H. P. Insulin Deficiency and Insulin Inefficiency. **Br Med J,** v. 1, n. 4139, p. 719-22, May 1940. ISSN 0007-1447. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20783080</u> >.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders. **Nature,** v. 542, n. 7640, p. 177-185, 02 2017. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28179656</u> >.

HOTAMISLIGIL, G. S.; SHARGILL, N. S.; SPIEGELMAN, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**, v. 259, n. 5091, p. 87-91, Jan 1993. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7678183</u> >.

HUI, X. et al. Adiponectin Enhances Cold-Induced Browning of Subcutaneous Adipose Tissue via Promoting M2 Macrophage Proliferation. **Cell Metab**, v. 22, n. 2, p. 279-90, Aug 2015. ISSN 1932-7420. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26166748</u> >.

JEFFERY, E. et al. Rapid depot-specific activation of adipocyte precursor cells at the onset of obesity. **Nat Cell Biol**, v. 17, n. 4, p. 376-85, Apr 2015. ISSN 1476-4679. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25730471</u> >.

KAIYALA, K. J. et al. Leptin signaling is required for adaptive changes in food intake, but not energy expenditure, in response to different thermal conditions. **PLoS One,** v. 10, n. 3, p. e0119391, 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25756181</u> >.

KAZAK, L. et al. UCP1 deficiency causes brown fat respiratory chain depletion and sensitizes mitochondria to calcium overload-induced dysfunction. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 114, n. 30, p. 7981-7986, Jul 2017. ISSN 1091-6490. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28630339 >.

KERN, P. A. et al. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. **J Clin Invest,** v. 95, n. 5, p. 2111-9, May 1995. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7738178</u> >.

KLINGENBERG, M. UCP1 - A sophisticated energy valve. **Biochimie,** v. 134, p. 19-27, Mar 2017. ISSN 1638-6183. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27794497</u> >.

KLINGENBERG, M.; ECHTAY, K. S. Uncoupling proteins: the issues from a biochemist point of view. **Biochim Biophys Acta**, v. 1504, n. 1, p. 128-43, Mar 2001. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11239490</u> >.

KNOWLER, W. C. et al. 10-year follow-up of diabetes incidence and weight loss in the Diabetes Prevention Program Outcomes Study. **Lancet**, v. 374, n. 9702, p. 1677-86, Nov 2009. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19878986</u> >.

KOOIJMAN, S.; VAN DEN HEUVEL, J. K.; RENSEN, P. C. Neuronal Control of Brown Fat Activity. **Trends Endocrinol Metab,** v. 26, n. 11, p. 657-68, Nov 2015. ISSN 1879-3061. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26482876</u> >.

KUSMINSKI, C. M.; SCHERER, P. E. Mitochondrial dysfunction in white
adipose tissue. Trends Endocrinol Metab, v. 23, n. 9, p. 435-43, Sep 2012.
ISSN 1879-3061. Disponível em: <
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22784416 >.

KÜHN, R. et al. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. **Cell,** v. 75, n. 2, p. 263-74, Oct 1993. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8402911</u> >.

LEE, J.; OZCAN, U. Unfolded protein response signaling and metabolic diseases. **J Biol Chem,** v. 289, n. 3, p. 1203-11, Jan 2014. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24324257</u> >.

LEIBEL, R. L.; ROSENBAUM, M.; HIRSCH, J. Changes in energy expenditure resulting from altered body weight. **N Engl J Med,** v. 332, n. 10, p. 621-8, Mar 1995. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7632212</u> >.

LEITNER, B. P. et al. Mapping of human brown adipose tissue in lean and obese young men. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 114, n. 32, p. 8649-8654, Aug 2017. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28739898</u> >.

LIU, P. S. et al. Injecting engineered anti-inflammatory macrophages therapeutically induces white adipose tissue browning and improves diet-induced insulin resistance. **Adipocyte**, v. 4, n. 2, p. 123-8, 2015 Apr-Jun 2015. ISSN 2162-3945. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26167415 >.

LU, R. H. et al. Mitochondrial development and the influence of its dysfunction during rat adipocyte differentiation. **Mol Biol Rep,** v. 37, n. 5, p. 2173-82, Jun 2010. ISSN 1573-4978. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19693701</u> >.

LUMENG, C. N.; SALTIEL, A. R. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. **J Clin Invest**, v. 121, n. 6, p. 2111-7, Jun 2011. ISSN 1558-8238. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21633179</u> >.

MAHDAVIANI, K. et al. Mfn2 deletion in brown adipose tissue protects from insulin resistance and impairs thermogenesis. **EMBO Rep**, v. 18, n. 7, p. 1123-1138, Jul 2017. ISSN 1469-3178. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28539390</u> >.

MAN, K.; KUTYAVIN, V. I.; CHAWLA, A. Tissue Immunometabolism: Development, Physiology, and Pathobiology. **Cell Metab**, v. 25, n. 1, p. 11-26, Jan 2017. ISSN 1932-7420. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27693378</u> >.

MATTHIAS, A. et al. The bioenergetics of brown fat mitochondria from UCP1ablated mice. Ucp1 is not involved in fatty acid-induced de-energization ("uncoupling"). **J Biol Chem**, v. 274, n. 40, p. 28150-60, Oct 1999. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10497167</u> >.

MO, Q. et al. Identification and characterization of a supraclavicular brown adipose tissue in mice. **JCI Insight,** v. 2, n. 11, Jun 2017. ISSN 2379-3708. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28570265</u> >.

NADAL, A. et al. Endocrine-disrupting chemicals and the regulation of energy balance. **Nat Rev Endocrinol,** v. 13, n. 9, p. 536-546, Sep 2017. ISSN 1759-5037. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28524168</u> >.

NAHON, K. J. et al. Lower critical temperature and cold-induced thermogenesis of lean and overweight humans are inversely related to body mass and basal metabolic rate. **J Therm Biol,** v. 69, p. 238-248, Oct 2017. ISSN 0306-4565. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29037389</u> >.

NAKAMURA, T. et al. Double-stranded RNA-dependent protein kinase links pathogen sensing with stress and metabolic homeostasis. **Cell**, v. 140, n. 3, p. 338-48, Feb 2010. ISSN 1097-4172. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20144759 >.

NEDERGAARD, J.; BENGTSSON, T.; CANNON, B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 293, n. 2, p. E444-52, Aug 2007. ISSN 0193-1849. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17473055</u> >.

NGUYEN, K. D. et al. Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis. **Nature,** v. 480, n. 7375, p. 104-8, Nov 2011. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22101429</u> >.

NISOLI, E. et al. Tumor necrosis factor alpha mediates apoptosis of brown adipocytes and defective brown adipocyte function in obesity. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 97, n. 14, p. 8033-8, Jul 2000. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10884431</u> >.

NORBERG, M. et al. Self-rated health does not predict 10-year weight change among middle-aged adults in a longitudinal population study. **BMC Public Health,** v. 11, p. 748, Sep 2011. ISSN 1471-2458. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21958199 >.

NUSSBAUM, J. C. et al. Type 2 innate lymphoid cells control eosinophil homeostasis. **Nature,** v. 502, n. 7470, p. 245-8, Oct 2013. ISSN 1476-4687. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24037376 >.

NYE, C. et al. Reassessing triglyceride synthesis in adipose tissue. **Trends Endocrinol Metab**, v. 19, n. 10, p. 356-61, Dec 2008. ISSN 1043-2760. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18929494</u> >.

ODEGAARD, J. I. et al. Perinatal Licensing of Thermogenesis by IL-33 and ST2. **Cell**, v. 166, n. 4, p. 841-854, Aug 2016. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27453471</u> >.

OKLA, M. et al. Activation of Toll-like receptor 4 (TLR4) attenuates adaptive thermogenesis via endoplasmic reticulum stress. **J Biol Chem,** v. 290, n. 44, p. 26476-90, Oct 2015. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26370079</u> >.

OSÓRIO, J. Metabolism: Type 2 immunity at the origin of beige adipocytes. **Nat Rev Endocrinol,** v. 10, n. 8, p. 443, Aug 2014. ISSN 1759-5037. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24958309</u> >.

OZCAN, U. et al. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. **Science,** v. 306, n. 5695, p. 457-61, Oct 2004. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15486293</u> >.

_____. Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. **Science,** v. 313, n. 5790, p. 1137-40, Aug 2006. ISSN 1095-9203. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16931765 >.

PAN, D. et al. Twist-1 is a PPARdelta-inducible, negative-feedback regulator ofPGC-1alpha in brown fat metabolism.Cell, v. 137, n. 1, p. 73-86, Apr 2009.ISSN1097-4172.Disponívelhttps://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19345188>.

PETERSON, C. M. et al. Brown adipose tissue does not seem to mediate metabolic adaptation to overfeeding in men. **Obesity (Silver Spring),** v. 25, n. 3, p. 502-505, Mar 2017. ISSN 1930-739X. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28117556</u> >.

PIERRE, N. et al. Toll-like receptor 4 knockout mice are protected against endoplasmic reticulum stress induced by a high-fat diet. **PLoS One,** v. 8, n. 5, p. e65061, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23741455 >.

QIU, Y. et al. Eosinophils and type 2 cytokine signaling in macrophages orchestrate development of functional beige fat. **Cell**, v. 157, n. 6, p. 1292-308, Jun 2014. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24906148</u> >.

RAO, R. R. et al. Meteorin-like is a hormone that regulates immune-adipose interactions to increase beige fat thermogenesis. **Cell,** v. 157, n. 6, p. 1279-91, Jun 2014. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24906147</u> >.

RODOVALHO, S. et al. Impairment of body mass reduction-associated activation of brown/beige adipose tissue in patients with type 2 diabetes mellitus. **Int J Obes (Lond),** v. 41, n. 11, p. 1662-1668, Nov 2017. ISSN 1476-5497. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28669988</u> >.

ROLFE, D. F.; BRAND, M. D. The physiological significance of mitochondrial
proton leak in animal cells and tissues. **Biosci Rep,** v. 17, n. 1, p. 9-16, Feb
1997. ISSN 0144-8463. Disponível em: <
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9171916 >.

RON, D.; WALTER, P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. **Nat Rev Mol Cell Biol,** v. 8, n. 7, p. 519-29, Jul 2007. ISSN 1471-0072. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17565364</u> >.

ROSEN, E. D.; SPIEGELMAN, B. M. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 847-53, Dec 2006. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17167472</u> >.

SCHRAUWEN, P.; VAN MARKEN LICHTENBELT, W. D. Combatting type 2diabetes by turning up the heat. **Diabetologia**, v. 59, n. 11, p. 2269-2279, Nov2016.ISSN1432-0428.Disponívelem:<</td>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27591854

SCHWARTZ, M. W. An inconvenient truth about obesity. **Mol Metab**, v. 1, n. 1-2, p. 2-4, 2012. ISSN 2212-8778. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24024111</u> >.

SCHWARTZ, M. W. et al. Obesity Pathogenesis: An Endocrine Society Scientific Statement. **Endocr Rev,** v. 38, n. 4, p. 267-296, Aug 2017. ISSN 1945-7189. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28898979</u> >.

_____. Central nervous system control of food intake. **Nature**, v. 404, n. 6778, p. 661-71, Apr 2000. ISSN 0028-0836. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10766253 >.

SHABALINA, I. G. et al. Native UCP1 displays simple competitive kinetics between the regulators purine nucleotides and fatty acids. **J Biol Chem**, v. 279, n. 37, p. 38236-48, Sep 2004. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15208325</u> >.

_____. Uncoupling protein-1 is not leaky. **Biochim Biophys Acta**, v. 1797, n. 6-7, p. 773-84, 2010 Jun-Jul 2010. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20399195</u> >.

_____. ROS production in brown adipose tissue mitochondria: the question of UCP1-dependence. **Biochim Biophys Acta**, v. 1837, n. 12, p. 2017-30, Dec 2014. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24769119</u> >.

SHI, S. Y. et al. JAK2 promotes brown adipose tissue function and is required for diet- and cold-induced thermogenesis in mice. **Diabetologia**, v. 59, n. 1, p. 187-96, Jan 2016. ISSN 1432-0428. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26515423</u> >.

SHI, Y. C. et al. Arcuate NPY controls sympathetic output and BAT function via a relay of tyrosine hydroxylase neurons in the PVN. **Cell Metab**, v. 17, n. 2, p. 236-48, Feb 2013. ISSN 1932-7420. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23395170</u> >.

SI, Y. et al. Effects of forced uncoupling protein 1 expression in 3T3-L1 cells on mitochondrial function and lipid metabolism. **J Lipid Res**, v. 48, n. 4, p. 826-36, Apr 2007. ISSN 0022-2275. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17202129</u> >.

SIMON, H. E. Posterior cervical tumor of brown fat in man; its relationship to the interscapular gland of hibernating animals. **Am J Surg,** v. 80, n. 1, p. 127-30, Jul 1950. ISSN 0002-9610. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15419376</u> >.

SPIEGELMAN, B. M.; HOTAMISLIGIL, G. S. Through thick and thin: wasting, obesity, and TNF alpha. **Cell**, v. 73, n. 4, p. 625-7, May 1993. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8500160</u> >.

STECULORUM, S. M. et al. AgRP Neurons Control Systemic Insulin Sensitivity via Myostatin Expression in Brown Adipose Tissue. **Cell**, v. 165, n. 1, p. 125-138, Mar 2016. ISSN 1097-4172. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27015310 >.

SUTHERLAND, J. C.; CALLAHAN, W. P.; CAMPBELL, G. L. Hibernoma: a tumor of brown fat. **Cancer,** v. 5, n. 2, p. 364-8, Mar 1952. ISSN 0008-543X. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14905423</u> >.

TAO, C. et al. Short-Term Versus Long-Term Effects of Adipocyte Toll-Like Receptor 4 Activation on Insulin Resistance in Male Mice. **Endocrinology**, v. 158, n. 5, p. 1260-1270, May 2017. ISSN 1945-7170. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28323977</u> >.

TORMOS, K. V. et al. Mitochondrial complex III ROS regulate adipocyte differentiation. **Cell Metab,** v. 14, n. 4, p. 537-44, Oct 2011. ISSN 1932-7420. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21982713</u> >.

TRAYHURN, P.; BEATTIE, J. H. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. **Proc Nutr Soc,** v. 60, n. 3, p. 329-39, Aug 2001. ISSN 0029-6651. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11681807</u> >.

TRAYHURN, P.; THURLBY, P. L.; JAMES, W. P. Thermogenic defect in preobese ob/ob mice. **Nature,** v. 266, n. 5597, p. 60-2, Mar 1977. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/840297</u> >.

UHM, M.; SALTIEL, A. R. White, brown, and beige; type 2 immunity gets hot. **Immunity**, v. 42, n. 1, p. 15-7, Jan 2015. ISSN 1097-4180. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25607455</u> >.

VAN DEN BERG, S. M. et al. Immune Modulation of Brown(ing) Adipose Tissue in Obesity. **Endocr Rev,** v. 38, n. 1, p. 46-68, 02 2017. ISSN 1945-7189. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27849358</u> >.

VAN DER LANS, A. A. et al. Cold acclimation recruits human brown fat and increases nonshivering thermogenesis. **J Clin Invest**, v. 123, n. 8, p. 3395-403, Aug 2013. ISSN 1558-8238. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23867626 >.

VAN MARKEN LICHTENBELT, W. D. et al. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. **N Engl J Med,** v. 360, n. 15, p. 1500-8, Apr 2009. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19357405</u> >.

VELLOSO, L. A.; FOLLI, F.; SAAD, M. J. TLR4 at the Crossroads of Nutrients, Gut Microbiota, and Metabolic Inflammation. **Endocr Rev**, v. 36, n. 3, p. 245-71, Jun 2015. ISSN 1945-7189. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25811237</u> >.

VILLARROYA, F. et al. Brown adipose tissue as a secretory organ. **Nat Rev Endocrinol**, v. 13, n. 1, p. 26-35, Jan 2017. ISSN 1759-5037. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27616452</u> >.

VIRTANEN, K. A. et al. Functional brown adipose tissue in healthy adults. **N** Engl J Med, v. 360, n. 15, p. 1518-25, Apr 2009. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19357407</u> >.

WAI, T.; LANGER, T. Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation. **Trends Endocrinol Metab,** v. 27, n. 2, p. 105-17, Feb 2016. ISSN 1879-3061. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26754340</u> >.

WILLIAMS, D. L.; SCHWARTZ, M. W. Neuroanatomy of body weight control:lessons learned from leptin. J Clin Invest, v. 121, n. 6, p. 2152-5, Jun 2011.ISSN1558-8238.Disponívelem:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21606602

WILSON-FRITCH, L. et al. Mitochondrial remodeling in adipose tissue associated with obesity and treatment with rosiglitazone. **J Clin Invest**, v. 114, n. 9, p. 1281-9, Nov 2004. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15520860</u> >.

WON, J. C. et al. Central administration of an endoplasmic reticulum stress inducer inhibits the anorexigenic effects of leptin and insulin. **Obesity (Silver Spring)**, v. 17, n. 10, p. 1861-5, Oct 2009. ISSN 1930-7381. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19543218 >.

WOODS, S. C. et al. Signals that regulate food intake and energy homeostasis. **Science,** v. 280, n. 5368, p. 1378-83, May 1998. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9603721</u> >.

WU, J.; COHEN, P.; SPIEGELMAN, B. M. Adaptive thermogenesis in adipocytes: is beige the new brown? **Genes Dev,** v. 27, n. 3, p. 234-50, Feb 2013. ISSN 1549-5477. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23388824</u> >.

ANEXOS

Anexo 1

Artigo de revisão publicado como parte das atividades desenvolvidas durante o doutorado



Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Agonists (GLP-1RAs) in the Brain–Adipocyte Axis

Bruno Geloneze¹ · José Carlos de Lima-Júnior^{1,2} · Lício A. Velloso²

Published online: 23 February 2017 \circledcirc The Author(s) 2017. This article is published with open access at Springerlink.com

Abstract The complexity of neural circuits that control food intake and energy balance in the hypothalamic nuclei explains some of the constraints involved in the prevention and treatment of obesity. Two major neuronal populations present in the arcuate nucleus control caloric intake and energy expenditure: one population co-expresses orexigenic agouti-related peptide (AgRP) and neuropeptide Y and the other expresses the anorexigenic anorectic neuropeptides proopiomelanocortin and cocaine- and amphetamine-regulated transcript (POMC/CART). In addition to integrating signals from neurotransmitters and hormones, the hypothalamic systems that regulate energy homeostasis are affected by nutrients. Fat-rich diets, for instance, elicit hypothalamic inflammation (reactive activation and proliferation of microglia, a condition named gliosis). This process generates resistance to the anorexigenic hormones leptin and insulin, contributing to the genesis of obesity Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor agonists (GLP-1RAs) have increasingly been used to treat type 2 diabetes mellitus. One compound (liraglutide) was recently approved for the treatment of obesity. Although most studies suggest that GLP-1RAs promote weight loss mainly due to their inhibitory effect on food intake, other central effects that have been described for native GLP-1 and some GLP-1RAs in rodents and humans encourage future

Bruno Geloneze bgeloneze@terra.com.br

¹ Laboratory of Investigation in Metabolism and Diabetes— LIMED, University of Campinas, UNICAMP, Campinas 13084-970, Brazil

² Laboratory of Cell Signaling, Obesity and Comorbidities Research Center, University of Campinas—UNICAMP, Campinas, Brazil clinical trials to explore additional mechanisms that potentially underlie the beneficial effects observed with this drug class. In this article we review the most relevant data exploring the mechanisms involved in the effects of GLP-IRAs in the brain-adipocyte axis.

Key Points

In addition to its well known action in glucose homeostasis GLP-1R can also modulate other important functions in the body, including cardiovascular, imme and nervous, and the control of caloric intake and energy expenditure.

Experimental studies show that GLP-1RA promotes increased activity of brown adipose tissue through the activation of hypothalamic neurons.

GLP-1RA are amongst the most promising agents that can act in the recruitment of brown adipose tissue in humans.

Subcutaneously administered GLP-1RA have established efficacy in the treatment of obesity in adult patients.

1 Introduction

Intestinal hormones have become an important therapeutic target in the management of obesity due to their involvement in energy homeostasis and satiety [1]. Among the intestinal L cell peptides, glucagon-like peptide-1 (GLP-1) has been highlighted because of the success of its recent

∆ Adis

clinical use in the treatment of diabetes mellitus and obesity [2]. GLP-1 receptor (GLP-1R) signaling contributes to increased glucose-dependent insulin secretion, β cell proliferation, islet size, portal glucose sensing, and postprandial lipid metabolism [3]. Moreover, it regulates cardiovascular function, glucose concentration, gut motility, immune function, neuronal physiology and repair, appetite, and energy expenditure, and therefore impacts on body mass control [3].

In addition to its extensively studied actions in peripheral tissues, studies have evaluated the distribution of GLP-1R in the central nervous system (CNS) of rodents, nonhuman primates, and humans, showing that it is widely diffused to multiple CNS neurons including neurons of the arcuate nucleus (ARC), which are crucial for the control of energy balance (Fig. 1) [4, 5]. Accordingly, one of the most remarkable central effects of GLP-1R signaling occurs in neuronal populations involved in the control of caloric intake by promoting anorexigenic effects. Furthermore, the activation of GLP-1R signaling in the ventromedial hypothalamus (VMH) can also control energy expenditure by promoting food intake-independent weight loss by inducing brown adipose tissue (BAT) thermogenesis and browning through a sympathetic drive to BAT [6]. BAT is a thermogenic mammalian organ composed of multilocular adipocytes specialized in generating heat instead of accumulating energy [7]. Besides the action of the GLP-1R agonist (GLP-1RA) on the brain-adipocyte axis, there is also recent evidence that its direct action (independent of its CNS actions) in the white adipose tissue induces browning and enhances the lipolytic capacity and mitochondrial biogenesis [8].

Despite the rapidly increasing understanding of the central regulation of whole-body energy homeostasis, translating this knowledge into more efficient therapies for obesity has proved challenging. Most effort has been directed towards development of anorexigenic drugs [9]; however, compounds that exert additional effects, such as regulation of energy expenditure, are expected to act with larger efficiency. Thus, following the identification of active BAT in adult humans and the demonstration that certain depots of white adipose tissue can undergo browning, there has been recent interest in the development of approaches that induce BAT activity and promote browning [10]. Such strategies have undergone a rapid development due to translational research, with the emergence of new pharmacological agents. Among the new agents, GLP-1RAs are the most promising.

In this review, we focus on the actions of GLP-1RAs in the CNS, with emphasis on the contribution of GLP-1 to reset energy balance by promoting BAT recruitment.

2 Structure and Physiology of Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1)

The incretin hormone GLP-1 is derived from the processing of proglucagon that occurs in ileal L cells and the nucleus tractus solitarius (NTS) [11]. During meals, GLP-1 is secreted in two stages: a first peak occurs approximately 15 min after the beginning of the meal, when food in the stomach and in the initial portions of the intestine stimulates the release of hormones, such as glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP), which acts by vagal pathways to stimulate L cells [12]; a second peak occurs after direct stimulation of L cells by nutrients [13].

The active forms of GLP-1 have a half-life of less than 2 min. Immediately after being secreted, GLP-1 enters the capillaries and is rapidly degraded by dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4). Despite the loss of its insulinotropic effect, the GLP-1 products of DPP-4 catalysis exert other actions, such as suppression of hepatic glucose production and antioxidant activity in the cardiovascular system [14]. The effects of the active forms of GLP-1 are mediated by a G protein-coupled receptor, GLP-1R, which is expressed in several sites, including enteric and vagal nerves, the stomach, pancreas, intestine, and various brain regions [15].

Because of its very short half-life, native GLP-1 cannot be used for therapeutic purposes. The GLP-1RAs are resistant to DPP-4 degradation, have longer halflives, and have been developed for the treatment of patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM) [15]. More recently, they have been used for the treatment of obesity [16]. Among the GLP-1RAs, exenatide is the synthetic version of exendin-4, a molecule identified in the Gila monster salivary gland whose amino acid sequence shares 53% identity with human GLP-1; its relatively short half-life requires twice-daily administration [17]. Lixisenatide is also a synthetic version of exendin-4 that has modifications consisting of the deletion of one proline residue and the addition of six lysine residues at the C-terminal end, which increases its halflife and its binding affinity to GLP-1R. Although lixisenatide is administered once a day, it is still considered a short-acting GLP-1RA [18].

Some of the molecules that are considered to be long-acting GLP-1RAs are briefly described here and in Table 1. Long-acting exenatide is formulated in microspheres of poly-(d,l-lactide-*co*-glycolide) for once-weekly administration [19]. Liraglutide is another long-acting GLP-1RA that is administered once daily. It is identical to the native GLP-1, except for the replacement of lysine with arginine at position 34 and



Fig. 1 Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) action in the central nervous system. The illustration of the whole brain depicts the main regions containing binding sites (GLP-1 receptors [GLP-1R], shown in *blue*) for GLP-1 (shown in *green*): hypothalamus (Hyp), ventral tegmental area (VTA), dorsal raphe nucleus (DR), brainstem (BS), nucleus of the solitary tract (NTS), and area postrema (AP). In the Hyp (*upper box*), GLP-1R has been detected in the paraventricular nucleus (PVN), lateral hypothalamic area (LHA), dorsomedial hypothalamus (DMH), ventromedial hypothalamus (VMH), and arcuate nucleus (ARC). Acting in the Hyp, GLP-1 can increase oxytocin and reduce hypothalamic gliosis (details in the *right-hand side* of the figure). In the ARC (*box in the middle of the figure*), GLP-1 reduces food intake by acting directly in proopiomelanocortin (POMC)/coccaine- and

the attachment of a palmitic acid to lysine at position 26. These modifications result in increased selfassociation, binding to albumin, and a longer half-life [20]. Dulaglutide is a once-weekly GLP-1RA consisting of the fusion of two identical sequences (the N-terminal portion of the native GLP-1) covalently bound by a peptide linker to the Fc component of a modified human immunoglobulin G4 heavy chain [21]. Albiglutide is also a once-weekly GLP-1RA consisting of two copies of a 30 amino acid sequence of modified human GLP-1 (replacement of alanine with glycine at position 8) fused with human albumin [22]. The most relevant metabolic effects expected from the GLP-1RA are summarized in Table 2. amphetamine-regulated transcript (CART) neurons and indirectly in neuropeptide Y (NPT)/agouti-related peptide (AgRP) neurons; the action in NPY/AgRP neurons is believed to occur through a hitherto unidentified γ-aminobutyric acid (GABA)-ergic neuron. In addition, acting in the Hyp, GLP-1 can increase energy expenditure by stimulating brown adipose tissue (BAT) activity and promoting browning of white adipose tissue (WAT) (details in the *bottom righthand side* of the figure). The hypothalamic actions of GLP-1 increasing oxytocin and reducing gliosis can also contribute to reduction of food intake and increasing energy expenditure. In the VTA, GLP-1 can reduce dopamine, which contributes for reduction of nightly palatable foods (details in the *right-hand side* of the figure). \uparrow indicates increase, \downarrow indicates decrease

3 GLP-1 Receptor Agonists (GLP-1RAs) in the Central Nervous System and the Energy Balance in Rodents

GLP-1 is synthesized in NTS neurons that project to GLP-1R-expressing regions, such as the paraventricular nucleus (PVN) and ARC [23]; in the latter, proopiomelanocortin (POMC) neurons are present and it is believed that endogenous GLP-1 induces satiety, affecting both anorexigenic and orexigenic signaling pathways. Activation of GLP-1R in the PVN stimulates the release of oxytocin, which exerts anorexigenic effects [13]. There are also NTS neurons projecting to the ventral tegmental area, which is a reward center. Endogenous GLP-1 acts in GLP-1Rs located

스 Adis

$\label{eq:table_table} \begin{array}{llllllllllllllllllllllllllllllllllll$				
GLP-1-based therapies	Usual dose			
Short-acting GLP-1RAs				
Exenatide twice daily	5.0 µg/10.0 µg [57]			
Lixisenatide once daily	10.0 µg/20.0 µg [58]			

	10 10 10 10
Long-acting GLP-1RAs	
Liraglutide once daily	1.8 mg/3.0 mg ^a [59]
Exenatide once weekly	2.0 mg [60]
Albiglutide once weekly	30.0 mg/50.0 mg [61
Dulaglutide once weekly	0.75 mg/1.5 mg [62]

GLP-1 glucagon-like peptide-1, GLP-1RA glucagon-like peptide-1 receptor agonist

^a Liraglutide was approved as an adjunct treatment for long-term weight management in adults. The recommended dose is 3.0 mg daily, other than the maximum dose of 1.8 mg for the treatment of diabetes

in this region and reduces the intake of highly palatable foods by suppressing mesolimbic dopamine signaling, which controls the pleasure-directed acquisition of food [24].

The GLP-1 derived from intestinal L cells may also communicate with the CNS through GLP-1Rs located in fibers innervating the portal vein or in the vagus nerve. However, the contributions of the peripheral nervous system and the CNS in the mediation of the anorexic effects of the GLP-1RAs is still not completely understood [23]. Experimental studies suggest that liraglutide exerts its anorexigenic but not hypoglycemic effects through CNS receptors, rather than through vagus nerve receptors [25]. Secher et al. [26] showed that liraglutide-dependent weight loss relies on its binding to GLP-1Rs located mainly in POMC/CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) anorexigenic neurons in the ARC, but an indirect inhibitory effect of agouti-related peptide (AgRP) orexigenic neurons via y-aminobutyric acid (GABA)-ergic signaling was also observed.

In addition to the studies demonstrating the central effects of GLP-1 and its analogs on satiety and reduction of energy intake, there are studies showing other central effects of GLP-1 involving BAT. BAT regulates energy expenditure through a process known as adaptive thermogenesis, in which uncoupling protein-1 (UCP1, a BAT marker) uncouples mitochondria respiration to generate heat instead of adenosine triphosphate [7].

Intracerebroventricular (ICV) infusion of native GLP-1 promotes not only a reduction in food intake and body weight, but also an increase in BAT thermogenesis induced by increased sympathetic nervous system (SNS) activity [6]. In addition, the ICV infusion of exendin-4 increases CNS activity, promotes BAT activation and white adipose tissue browning, and increases BAT glucose and triglyceride uptake [27]. Peripheral exendin-4 administration also increases energy expenditure and BAT thermogenesis [28]. Similarly, the ICV infusion of liraglutide stimulates BAT thermogenesis and white adipose tissue browning. These effects depend on the reduction of 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) activity in the VMN [29]. Together, these results suggest that GLP-1R signaling contributes to BAT thermogenic capacity. However, the increase in BAT recruitment apparently does not induce weight loss during long-term subcutaneous treatment with liraglutide in mice (Fig. 1) [30].

In addition to the expression in areas related to satiety, GLP-1R is present in several other areas in the CNS. Glial cells only express GLP-1R when activated, in response to inflammation [31]. Farr et al. [4] evaluated the distribution of GLP-1R in human brains and demonstrated its presence in all neurons of the parietal cortex, in the ARC, PVN, VMN, area postrema, dorsal motor nucleus of the vagus in the medulla oblongata, and in the NTS. They also confirmed the lack of expression of GLP-1R in glial cells [4].

The identification of GLP-1R in other regions of the CNS provided a further advance in the understanding of the role played by GLP-1/serotonin cross-talk in the regulation of homeostatic control of body mass. Anderberg et al. [32] demonstrated that long-term stimulation with GLP-1RAs promoted an increase in the expression of serotonergic receptors in the hypothalamus. In addition, they showed that the 5-hydroxytryptamine 2A (5-HT_{2A}) receptor is crucial for GLP-1RA-induced weight loss after exendin-4 ICV injection, such as peripheral injection of liraglutide in rats. The authors identified that the dorsal raphe nucleus (DR) has serotonergic neurons that secrete serotonin to hypothalamic nuclei and that GLP-1R activation promotes the activity of DR serotonin neurons. Thus, they provided evidence that serotonin is crucial for controlling feeding and weight loss induced by GLP-1R activation [32].

The first studies evaluating the effects of GLP-1 and exendin-4 in neuronal cells demonstrated their ability to promote neurite outgrowth (a similar effect to that observed with the neurotrophic nerve growth factor) and to protect cultured neurons against glutamate-induced apoptosis [33]. Such reports inspired further studies to evaluate the effects of GLP-1RAs in animal models of degenerative neurological diseases.

Parkinson disease is characterized by the degeneration of nigrostriatal dopamine-producing neurons. Intraperitoneal exendin-4 was shown to interrupt and even revert the progression of drug-induced nigrostriatal lesions [34]. In a rodent model of stroke, exendin-4 interrupted microglia infiltration and increased the stem cell proliferation elicited by middle cerebral artery transient occlusion [35].

The ability of exendin-4 and liraglutide administered subcutaneously to promote proliferation of progenitor cells

B. Geloneze et al.

∆ Adis

GLP-1RAs in the Brain-Adipocyte Axis

Biological effects	Clinical benefits/comments
Pancreatic effects	
↑ Insulin and ↓ glucagon secretion (not during hypoglycemia)	There is robust evidence of enhancement of β cell function [63–66]
$\uparrow \beta$ cell proliferation (in rodents)	GLP-1RA preserves the β cell mass and decreases susceptibility to cytokines [67, 68]
$\downarrow \beta$ cell apoptosis (in rodents; needs confirmation in humans)	GLP-1RA protects β cells by suppressing tacrolimus-induced oxidative stress and apoptosis [69, 70]
\downarrow Oxidative stress-induced β cell damage (in rodents)	GLP-1RA treatment decreased ROS production through Nrf2 signaling [71]
↓ Glucagon secretion	The mechanisms are not completely understood. GLP-1 inhibits glucagon secretion through somatostatin-dependent mechanisms [72]
Extra-pancreatic effects	
Cardiovascular protection	GLP-1 promotes a myriad of cardiovascular actions (vasodilatation, plaque stability, decrease platelet aggregation, lipid profiles, ischemic injury, blood pressure, and inflammation) and increases endothelial function and left ventricular function [73, 74]
Delay gastric emptying	A Satiety and improve postprandial glycemia. The deceleration of gastric emptying is subject to rapid tachyphylaxis, which results in an attenuation of the effect on glycemic control after long-term use in humans [75]
Control of ovarian cancer cells proliferation	GLP-1RA inhibited growth of ovarian cancer cells through inhibition of the PI3K/Akt pathway [76]
Inhibition of apoptosis of renal tubular epithelial cells and increased natriuresis	GLP-1RA infusion stimulates natriuretic response [77]; in addition, GLP-1RA impairs apoptosis induced by high glucose in renal tubular epithelial cells [78]
\downarrow Hepatic steatosis and \uparrow hepatic insulin sensitivity	GLP-1RA improves hepatic insulin sensitivity, impairs hepatic glucose production. and inhibits hepatic steatosis [79, 80]
↓ Inflammation	There is GLP-1R mRNA expression in many subpopulations of immune cells such as regulatory T cells and thymocytes, suggesting that GLP-1R signaling has a role in the regulation of immune response [81]
Central effects	
Stimulus of reward centers	↓ Intake of highly palatable foods [82–84]
Stimulatory effect on anorexigenic neurons and inhibitory effect on orexigenic neurons	↑ Satiety and consequent weight loss [26]
Increase brown adipose tissue thermogenesis (in rodent; needs confirmation in humans)	↑ Energy expenditure and consequent weight loss [29]
Neuroprotective action on degenerative diseases, which should be an important use in the coming years	Growing evidence has shown that GLP-1RA has neuroprotective action in NDs. These two reviews assess their promising role as a new treatment for NDs [31, 85]

GLP-1 glucagon-like peptide-1, GLP-1R glucagon-like peptide-1 receptor, GLP-1RA glucagon-like peptide-1 receptor agonist, mRNA messenger RNA, NDs neurodegenerative diseases, Nrf2 nuclear factor erythroid 2-related factor 2, ROS reactive oxygen species, \uparrow indicates decrease

^a It is not the purpose of this review to detail the biological actions of GLP-1 in multiple sites, for which there are recent good reviews [3]

located in the dentate gyrus in the hippocampus has been tested. Both GLP-1RAs further increased progenitor cells proliferation, suggesting that they may be promising drugs for the treatment of neurodegenerative diseases [36]. Lixisenatide administered intraperitoneally has also been shown to increase neurogenesis in the dentate gyrus [37].

Liraglutide was evaluated in a mouse model of Alzheimer disease in an intermediate stage of disease progression; it improved learning and memory and decreased amyloid deposition and chronic inflammation [38]. In another study conducted in mice with Alzheimer disease in the final stage, intraperitoneal liraglutide improved spatial memory, reduced amyloid deposition and inflammation, and increased dentate gyrus neurogenesis, suggesting that, besides exerting preventive effects, this GLP-1RA may reverse some of the key pathological findings of Alzheimer disease. Currently, liraglutide is being evaluated in humans with mild cognitive impairment [39].

A recently published study explored the neuroprotective effects of subcutaneous liraglutide in the ARC neuronal damage (gliosis and upregulation of the pro-apoptotic gene Bax) induced by a high-fat diet (HFD). In addition to

∆ Adis

promoting weight loss, activating POMC anorexigenic neurons, and increasing leptin sensitivity, liraglutide reduced gliosis and increased expression of the anti-apoptotic gene *Bcl2*. These effects could be attributed to treatment with liraglutide and not to weight loss, since they were not observed in the group of animals that lost weight without receiving the GLP-1RA [40]. Similar results of gliosis reduction have been shown after subcutaneous administration of exendin-4 to mice on HFDs [41]. These results demonstrate the potential of GLP-1RAs not only to promote weight loss and metabolic improvement but also to act directly on the hypothalamic inflammation.

4 Clinical Effects in Humans

4.1 Peripheral Effects

In 1998, Flint et al. [42] demonstrated in healthy volunteers that infusion of native GLP-1 during breakfast increased satiety and fullness and reduced the caloric intake in the next meal by 12%. The clinical trials conducted with GLP-IRAs in T2DM patients have demonstrated these beneficial effects. A meta-analysis of 21 clinical studies showed a weighted mean difference in body weight of -2.9 kg (95% confidence interval [CI] -3.6 to -2.2) with the maximum dose of each one of the GLP-IRAs [43]. These positive effects on weight loss together with the experimental evidence suggesting that liraglutide exerts its effects directly in the CNS raise the question of whether GLP-IRAs of higher molecular weights, such as dulaglutide and albiglutide, would be as effective as liraglutide in promoting weight loss [23].

A phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled trial, which was open-label for the comparator liraglutide group, evaluated dulaglutide monotherapy (0.75 mg) versus placebo versus once-daily liraglutide in individuals with T2DM. Despite the positive results regarding glycemic control, in which dulaglutide was superior to placebo and non-inferior to liraglutide, there was no significant weight loss in any group after 26 weeks. This could be explained by the leanness of the Japanese population at the baseline, by the anabolic effect of improved β cell function, or even because of the low dose employed in this trial [44].

Another phase III, randomized, open-label, non-inferiority, head-to-head trial, AWARD-6, evaluated dulaglutide (1.5 mg) versus liraglutide (1.8 mg) in patients with T2DM. The once-weekly dose of dulaglutide was non-inferior to once-daily liraglutide in relation to glycemic control. There was significant weight loss in both groups; however, the magnitude of the body mass reduction was significantly greater in the liraglutide group [45]. Similar results were seen

∆ Adis

in the non-inferiority HARMONY 7 trial, which compared liraglutide versus albiglutide [46]. Thus, two head-to-head trials demonstrated that liraglutide was superior for weight loss. However, the explanation for this is not clear. One possibility is that the difference in efficiency in weight loss is due to a higher uptake of liraglutide in the CNS. Another possibility is the existence of differences in the effect of high molecular weight versus low molecular weight peptides on GLP-1R signaling in the CNS [23]. Experimental evidence indicated that while peptides bound to albumin do not penetrate the CNS, peripheral activation of the GLP-1R system would be coupled to neuronal activation and central effects of gastric emptying and decreased food intake, independent of direct exposure on the CNS [47].

The effects of GLP-1 and its analogs on energy expenditure are still inconsistent [48]. An evaluation of T2DM patients using liraglutide for 4 weeks detected a trend towards an increased basal energy expenditure [49], but this effect was not confirmed in subsequent longer studies [50, 51].

A randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover study investigated the effects of liraglutide 1.8 and 3.0 mg for 5 weeks in obese non-diabetic patients. One-hour gastric emptying was 13 and 23% slower than placebo, respectively. Liraglutide doses similarly increased postprandial satiety and fullness and reduced hunger and prospective food consumption [52]. Additional studies are needed to define the participation of increased energy expenditure on the weight loss induced by GLP-1RAs.

4.2 Brain Effects

Neuroimaging studies have been employed in attempts to explore the central mechanisms of action of GLP-1 and its analogs. Increasing GLP-1 in the postprandial period correlates with the increase in blood flow in brain areas related to satiety, such as the hypothalamus and areas of the prefrontal cortex [53]. De Silva et al. [54] employed functional magnetic resonance imaging (fMRI) and showed that GLP-1 infusion in fasting healthy volunteers of normal weight attenuated neuronal activity in areas related to reward processing and hedonic feeding to the same extent as a meal (Table 3).

fMRI was also used to evaluate the central effects of GLP-1RAs. van Bloemendaal et al. [55] demonstrated that obese subjects presented increased activation in appetite and reward-related brain areas in response to food images. This was attenuated by an intravenous injection of exenatide [55]. Farr et al. [4] treated 21 T2DM patients with increasing doses of liraglutide (up to 1.8 mg) for 17 days. In comparison to placebo, liraglutide reduced activation of the parietal cortex and of insula and putamen (areas

GLP-1RAs in the Brain-Adipocyte Axis

|--|

Compound	Area	Imaging/sample	Comparison	Summary	References
Endogenous GLP-1	Homeostasis	fMRI with food pictures to assess brain activity in reward system areas/ n = 40	Fasted condition vs. fed condition	Dietary intake and the consequent increase in endogenous GLP-1 levels reduced the activation of the insula region comparing diabetic subjects versus lean subjects	[86]
Exenatide	Homeostasis	fMRI with food pictures to evaluate hypothalamic connectivity/ $n = 24$	Responders vs. non- responders after exenatide infusion	Among obese volunteers who had an anorexigenic effect after exenatide, the treatment with exenatide promoted higher hypothalamic connectivity than did placebo	[82]
	Homeostasis	fMRI in response to chocolate milk or tasteless solution to study brain responses to anticipation/ n = 48	Obese individuals with T2DM, and obese individuals and lean individuals with normoglycemia	GLP-1 activation decreased food reward	[84]
	Homeostasis	fMRI with food pictures to evaluate cerebral activity in reward-related brain areas/n = 48	Obese subjects with T2DM, and obese individuals and lean individuals with normoglycemia	Exenatide blunted food-related brain activation in T2DM patients and obese subjects in reward-related brain areas	[55]
	Homeostasis	[(18)F]2-fluoro-2-deoxy-d- glucose-PET/CT/ $n = 15$	Effect of single dose of exenatide on cerebral glucose metabolism	Exenatide increased glucose metabolism in brain areas related to glucose homeostasis, appetite, and food reward	[87]
	Homeostasis	fMRI with food pictures/ n = 20	Obese vs. lean individuals with and without exenatide infusion during the test	Exenatide blunted the fMRI signal in amygdala, insula, hippocampus, and frontal cortex in obese individuals but not in lean individuals	[88]
	Homeostasis	fMRI with food pictures to assess emotional eating and reward system/ $n = 48$	Obese subjects with T2DM, and obese individuals and lean individuals with normoglycemia	Emotional eaters had a modified pattern of responses to food cues in areas of the reward system, and exenatide did not modify those responses	[83]
	Parkinson disease	^[1231] FP-CIT SPECT scans to assess presynaptic dopaminergic deficit/ n = 10	Before and after 12 weeks of exenatide	Exenatide promoted minimal changes in all ganglia subregions in ^[1231] FP- CIT activity ^a	[89]
Liraglutide	Homeostasis	fMRI with food pictures/ n = 21	Individuals with T2DM treated with liraglutide vs. placebo during 17 days	Liraglutide decreased brain activation in parietal cortex and areas of the reward system (insula and putamen) after food cues	[4]
	Homeostasis	fMRI in response to food cues/ $n = 20$	Individuals with T2DM treated with liraglutide vs. placebo during 17 days	Liraglutide reduced activation of the attention- and reward-related insula in response to food cues and this change was positively correlated with increased GIP levels	[90]
	Homeostasis	fMRI in response to food $cues/n = 20$	Obese and diabetic subjects treated with liraglutide or insulin glargine during 12 weeks	Liraglutide promoted reduced responses to food cues in insula and putamen in relation to insulin after 10 days but not after 12 weeks	[91]

fMRI functional magnetic resonance imaging, *GIP* glucose-dependent insulinotropic polypeptide, *GLP-1* glucagon-like peptide-1, *GLP-1RA* glucagon-like peptide-1 receptor agonist, *T2DM* type 2 diabetes mellitus, *f(18)F[2-fluoro-2-deoxy-d-glucose-PET/CT* [18F]-2-fluoro-2-deoxy-d-glucose-positron emission tomography/computed tomography, *¹²³⁰PCTT SPECT* 123 55 1-Fluoropropyl-2-beta-carbomethoxy-3-beta(4-iodophenyl) nortropane/single photon emission computerized tomography
^a GLP-1RAs have demonstrated important effects in pre-clinical models of Parkinson disease and other neurodegenerative diseases not reviewed here [92]

involved in the reward system) in response to pictures of highly palatable foods [4].

The observation that liraglutide promotes relevant weight loss led to the approval of the daily dose of 3.0 mg for the treatment of obesity [16]. The efficacy of liraglutide 3.0 mg was evaluated in T2DM patients with a body mass index (BMI) ≥ 27 kg/m² treated with diet and exercise alone or in combination with antidiabetic drugs. This was a randomized, double-blind study with three arms of treatment: placebo and liraglutide 1.8 and 3.0 mg. The primary endpoints were relative change in weight and the proportion of participants losing ≥ 5 or $\geq 10\%$ of baseline weight at week 56. Weight loss was significantly greater with both doses of liraglutide than with placebo for all three primary endpoints. Weight loss was 6.0% (6.4 kg), 4.7% (5.0 kg), and 2.0% (2.2 kg) with liraglutide 3.0 mg, liraglutide 1.8 mg, and placebo, respectively. A weight loss ${\geq}5\%$ occurred in 54.3, 40.4, and 21.4% of patients, respectively, and a weight loss $\geq 10\%$ occurred in 25.2, 15.9, and 6.7% of patients, respectively. The safety profile was similar to that described in other clinical trials [56].

The efficacy of liraglutide 3.0 mg as an adjunct to diet and exercise was also evaluated in 3731 non-diabetic patients presenting with a BMI \geq 27 (in the presence of dyslipidemia or hypertension) or $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ treated for 56 weeks. The primary endpoints were the change in body weight and the proportions of patients losing at least 5% and >10% of their initial body weight. Weight loss was significantly greater with liraglutide than placebo for all primary endpoints. At week 56, the mean weight loss was 8.4 ± 7.3 kg in the liraglutide group and 2.8 ± 6.5 kg in the placebo group. Weight loss of at least 5% was observed in 63.2 and 27.1% of the patients, respectively, and weight loss $\geq 10\%$ was seen in 33.1 and 10.6% of the patients, respectively. The most frequently reported adverse events with liraglutide were mild or moderate nausea and diarrhea, both of which were transitory [16].

5 Concluding Remarks

It is believed that GLP-1RAs promote weight loss mainly because of their inhibitory effect on food intake [42]. However, the numerous central effects described for native GLP-1 and for some of the GLP-1RAs in rodents and in humans encourage future clinical trials exploring additional mechanisms that could potentially underlie the beneficial effects observed with this drug class. Among the aspects that deserve special attention, we highlight three: (i) the increased thermogenesis by activation of BAT or browning of the white adipose tissue; (ii) the neuroprotective properties, including the ability to reduce hypothalamic inflammation triggered by HFD; and (iii) the

∆ Adis

effects on damaged neurons in neurodegenerative diseases. Considering that hypothalamic inflammation directly interferes in neural circuits controlling food intake and energy balance, its reversal could contribute to the restoration of the hypothalamic energy set point.

Authors' contributions BG, JCL, and LAV participated in the concept and drafting of the manuscript, and performed the critical review for intellectual content. All authors read and approved the final manuscript.

Compliance with Ethical Standards

Funding The authors wish to thank Daniel Soares Freire, MD, PhD for providing medical writing and Cristiane Mapurunga Aoqui Guenoub, MD, PhD for providing assistance with English-language editing, both on behalf of Springer Healthcare. This manuscript was prepared according to the International Society for Medical Publication Professionals' Good Publication Practice for Communicating Company-Sponsored Medical Research: the GPP3 Guidelines. Funding to support the preparation of this manuscript was provided by Novo Nordisk Inc. The authors take full responsibility for the content and conclusions stated in this manuscript. Novo Nordisk did not influence the content of this publication.

Conflict of interest BG reports receiving fees for serving on an advisory board from Novo Nordisk, AstraZeneca, and MSD; lecture fees from Novo Nordisk, AstraZeneca, and MSD; and grant support from Novo Nordisk and Boehringer Ingelheim. JCL and LAV declare that they have no competing interests that would influence the content of this review.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (http://creativecommons.org/license/by-nc/4.0/), which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

References

- Bauer PV, Duca FA. Targeting the gastrointestinal tract to treat type 2 diabetes. J Endocrinol. 2016;230(3):R95–113.
 Drucker DI Nauck MA. The incretin system: glucagon-like
- Brucker DJ, Nauck MA. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. Lancet. 2006;358(9548):1696–705.
 Campbell JE, Drucker DI Dhamana Market Statement and Statement and
- Campbell JE, Drucker DJ. Pharmacology, physiology, and mechanisms of incretin hormone action. Cell Metab. 2013;17(6): 819–37.
- 4. Farr OM, Sofopoulos M, Tsoukas MA, Dincer F, Thakkar B, Sahin-Efe A, et al. GLP-1 receptors exist in the parietal cortex, hypothalamus and medulla of human brains and the GLP-1 analogue liraglutide alters brain activity related to highly desirable food cues in individuals with diabetes: a crossover, randomised, placebo-controlled trial. Diabetologia. 2016;59(5): 954–65.
- Heppner KM, Kirigiti M, Secher A, Paulsen SJ, Buckingham R, Pyke C, et al. Expression and distribution of glucagon-like peptide-1 receptor mRNA, protein and binding in the male nonhuman primate (*Macaca mulatta*) brain. Endocrinology. 2015;156(1):255–67.

- Lockie SH, Heppner KM, Chaudhary N, Chabenne JR, Morgan DA, Veyrat-Durebex C, et al. Direct control of brown adipose tissue thermogenesis by central nervous system glucagon-like peptide-1 receptor signaling. Diabetes. 2012;61(11):2753–62.
- Cannon B, Nedergaard J. Brown adjoose tissue: function and physiological significance. Physiol Rev. 2004;84(1):277–359.
- Xu F, Lin B, Zheng X, Chen Z, Cao H, Xu H, et al. GLP-1 receptor agonist promotes brown remodelling in mouse white adipose tissue through SIRT1. Diabetologia. 2016;59(5): 1059–69.
- Gautron L, Elmquist JK, Williams KW. Neural control of energy balance: translating circuits to therapies. Cell. 2015;161(1): 133–45.
- Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. N Engl J Med. 2009;360(15):1509–17.
 Larsen PJ, Tang-Christensen M, Holst JJ, Orskov C. Distribution
- Larsen PJ, Tang-Christensen M, Holst JJ, Orskov C. Distribution of glucagon-like peptide-1 and other preproglucagon-derived peptides in the rat hypothalamus and brainstem. Neuroscience. 1997;77(1):257–70.
- Roberge JN, Brubaker PL. Regulation of intestinal proglucagonderived peptide secretion by glucose-dependent insulinotropic peptide in a novel enteroendocrine loop. Endocrinology. 1993;133(1):233–40.
- 1995;153(1):253–40.
 13. Dailey MJ, Moran TH. Glucagon-like peptide 1 and appetite. Trends in endocrinology and metabolism: TEM. 2013;24(2): 85–91 (PubMed PMID: 23332584. Pubmed Central PMCID: 3594872).
- Tomas E, Habener JF. Insulin-like actions of glucagon-like peptide-1: a dual receptor hypothesis. Trends Endocrinol Metab. 2010;21(2):59–67.
- Mayo KE, Miller LJ, Bataille D, Dalle S, Goke B, Thorens B, et al. International Union of Pharmacology. XXXV. The glucagon receptor family. Pharmacol Rev. 2003;55(1):167–94.
- Verspohl ÉJ. Novel therapeutics for type 2 diabetes: incretin hormone mimetics (glucagon-like peptide-1 receptor agonists) and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors. Pharmacol Ther. 2009;124(1):113–38.
- Werner U, Haschke G, Herling AW, Kramer W. Pharmacological profile of lixisenatide: a new GLP-1 receptor agonist for the treatment of type 2 diabetes. Regul Pept. 2010;164(2–3):58–64.
- Minze MG, Klein MS, Jernigan MJ, Wise SL, Fruge K. Onceweekly exenatide: an extended-duration glucagon-like peptide agonist for the treatment of type 2 diabetes mellitus. Pharmacotherapy. 2013;33(6):627–38.
 Knudsen LB, Nielsen PF, Huusfeldt PO, Johansen NL, Madsen
- Knudsen LB, Nielsen PF, Huusfeldt PO, Johansen NL, Madsen K, Pedersen FZ, et al. Potent derivatives of glucagon-like peptide-1 with pharmacokinetic properties suitable for once daily administration. J Med Chem. 2000;43(9):1664–9.
- Glaesner W, Vick AM, Millican R, Ellis B, Tschang SH, Tian Y, et al. Engineering and characterization of the long-acting glucagon-like peptide-1 analogue LY2189265, an Fc fusion protein. Diabetes Metab Res Rev. 2010;26(4):287–96.
- Blair HA, Keating GM. Albiglutide: a review of its use in patients with type 2 diabetes mellitus. Drugs. 2015;75(6):651–63.
- Baggio LL, Drucker DJ. Glucagon-like peptide-1 receptors in the brain: controlling food intake and body weight. J Clin Invest. 2014;124(10):4223–6.
- Wang XF, Liu JJ, Xia J, Liu J, Mirabella V, Pang ZP. Endogenous glucagon-like peptide-1 suppresses high-fat food intake by reducing synaptic drive onto mesolimbic dopamine neurons. Cell Rep. 2015;12(5):726–33.

- Sisley S, Gutierrez-Aguilar R, Scott M, D'Alessio DA, Sandoval DA, Seeley RJ. Neuronal GLP1R mediates liraglutide's anorectic but not glucose-lowering effect. J Clin Invest. 2014;124(6):2456–63.
- 26. Secher A, Jelsing J, Baquero AF, Hecksher-Sorensen J, Cowley MA, Dalboge LS, et al. The arcuate nucleus mediates GLP-1 receptor agonist liraglutide-dependent weight loss. J Clin Invest. 2014;124(10):4473–88.
- 2014,124(10),447,5-80.
 27. Kooijman S, Wang Y, Parlevliet ET, Boon MR, Edelschaap D, Snaterse G, et al. Central GLP-1 receptor signalling accelerates plasma clearance of triacylglycerol and glucose by activating brown adipose tissue in mice. Diabetologia. 2015;58(11):2637–46.
- Wei Q, Li L, Chen JA, Wang SH, Sun ZL. Exendin-4 improves thermogenic capacity by regulating fat metabolism on brown adipose tissue in mice with diet-induced obesity. Ann Clin Lab Sci. 2015;45(2):158–65.
 Beiroa D, Imbernon M, Gallego R, Senra A, Herranz D, Villar-
- Beiroa D, Imbernon M, Gallego R, Senra A, Herranz D, Villarroya F, et al. GLP-1 agonism stimulates brown adipose tissue thermogenesis and browning through hypothalamic AMPK. Diabetes. 2014;63(10):3346–58.
- Heppner KM, Marks S, Holland J, Ottaway N, Smiley D, Dimarchi R, et al. Contribution of brown adipose tissue activity to the control of energy balance by GLP-1 receptor signalling in mice. Diabetologia. 2015;58(9):2124–32.
- the control chicky on the product of product of the control of the product of the p
- Anderberg RH, Richard JE, Eerola K, Ferreras LL, Nordbeck EB, Hansson C, et al. Glucagon-like peptide-1 and its analogues act in the dorsal raphe and modulate central serotonin to reduce appetite and body weight. Diabetes. 2017. doi:10.2337/db16-0755 (Epub 2017 Jan 5).
- 33. Perry T, Lahiri DK, Chen D, Zhou J, Shaw KT, Egan JM, et al. A novel neurotrophic property of glucagon-like peptide 1: a promoter of nerve growth factor-mediated differentiation in PC12 cells. J Pharmacol Exp Ther. 2002;300(3):958–66.
- J Pharmacol Exp Ther. 2002;300(3):958–66.
 Harkavyi A, Abuirmeileh A, Lever R, Kingsbury AE, Biggs CS, Whitton PS. Glucagon-like peptide 1 receptor stimulation reverses key deficits in distinct rodent models of Parkinson's disease. J Neuroinflamm. 2008;21(5):19.
- Darsalia V, Mansouri S, Ortsater H, Olverling A, Nozadze N, Kappe C, et al. Glucagon-like peptide-1 receptor activation reduces ischaemic brain damage following stroke in Type 2 diabetic rats. Clin Sci (Lond). 2012;122(10):473–83.
- Hamilton A, Patterson S, Porter D, Gault VA, Holscher C. Novel GLP-1 mimetics developed to treat type 2 diabetes promote progenitor cell proliferation in the brain. J Neurosci Res. 2011;89(4):481–9.
 Hunter K, Holscher C. Drugs developed to treat diabetes,
- Hunter K, Holscher C. Drugs developed to treat diabetes, liraglutide and lixisenatide, cross the blood brain barrier and enhance neurogenesis. BMC Neurosci. 2012;23(13):33.
 McClean PL, Parthsarathy V, Faivre E, Holscher C. The diabetes
- McLean PL, Partnsaramy V, Falvre E, Holscher C. Ine diabetes drug liraglutide prevents degenerative processes in a mouse model of Alzheimer's disease. J Neurosci. 2011;31(17):6587-94.
 McClean PL, Holscher C. Liraglutide can reverse memory
- McClean PL, Holscher C. Liraglutide can reverse memory impairment, synaptic loss and reduce plaque load in aged APP/ PS1 mice, andel of Alzheimer's disease. Neuropharmacology. 2014;76(Pt A):57–67.
- Barreto-Vianna AR, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Effects of liraglutide in hypothalamic arcuate nucleus of obese mice. Obesity. 2016;24(3):626–33.
 Gao Y, Ottaway N, Schriever SC, Legutko B, Garcia-Caceres C,
- Gao Y, Ottaway N, Schriever SC, Legutko B, Garcia-Caceres C, de la Fuente E, et al. Hormones and diet, but not body weight, control hypothalamic microglial activity. Glia. 2014;62(1):17–25.
 Flint A, Raben A, Astrup A, Holst JJ. Glucagon-like peptide 1
- Flint A, Raben A, Astrup A, Holst JJ. Glucagon-like peptide 1 promotes satiety and suppresses energy intake in humans. J Clin Invest. 1998;101(3):515–20.

∆ Adis

- 43. Vilsboll T, Christensen M, Junker AE, Knop FK, Gluud LL. Effects of glucagon-like peptide-1 receptor agonists on weight loss: systematic review and meta-analyses of randomised controlled trials BMI 2012:10(344):d7771
- 44. Miyagawa J, Odawara M, Takamura T, Iwamoto N, Takita Y, Imaoka T. Once-weekly glucagon-like peptide-1 receptor agonist dulaglutide is non-inferior to once-daily liraglutide and superior dependent placebo in Japanese patients with type 2 diabetes: a 26-week ran-domized phase III study. Diabetes Obes Metab. 2015;17(10):974–83.
- Dungan KM, Povedano ST, Forst T, Gonzalez JG, Atisso C, Sealls W, et al. Once-weekly dulaglutide versus once-daily liraglutide in metformin-treated patients with type 2 diabetes (AWARD-6): a randomised, open-label, phase 3, non-inferiority trial. Lancet. 2014;384(9951):1349–57.
- 46. Pratley RE, Nauck MA, Barnett AH, Feinglos MN, Ovalle F, Prattey RE, Nauck MA, Barnett AH, Feinglos MN, Ovalle F, Harman-Boehm I, et al. Once-weekly albigluide versus once-daily liraglutide in patients with type 2 diabetes inadequately controlled on oral drugs (HARMONY 7): a randomised, open-label, multicentre, non-inferiority phase 3 study. Lancet Diabetes Endocrinol. 2014;2(4):289–97.
- Baggio LL, Huang Q, Brown TJ, Drucker DJ. A recombinant human glucagon-like peptide (GLP)-1-albumin protein (albugon) mimics peptidergic activation of GLP-1 receptor-dependent pathways coupled with satiety, gastrointestinal motility, and glucose homeostasis. Diabetes. 2004;53(9):2492–500. 48. van Bloemendaal L, Ten Kulve JS, la Fleur SE, Ijzerman RG,
- Diamant M. Effects of glucagon-like peptide 1 on appetite and body weight: focus on the CNS. J Endocrinol. body weight: f 2014;221(1):T1-16.
- Horowitz M, Flint A, Jones KL, Hindsberger C, Rasmussen MF, Kapitza C, et al. Effect of the once-daily human GLP-1 analogue liraglutide on appetite, energy intake, energy expenditure and gastric emptying in type 2 diabetes. Diabetes Res Clin Pract. 2012;97(2):258-66.
- Harder H, Nielsen L, Tu DT, Astrup A. The effect of liraglutide, a long-acting glucagon-like peptide 1 derivative, on glycemic control, body composition, and 24-h energy expenditure in patients with type 2 diabetes. Diabetes Care. 2004;27(8):1915–21.
 51. Bradley DP, Kulstad R, Racine N, Shenker Y, Meredith M,
- Schoeller DA. Alterations in energy balance following exenatide administration. Appl Physiol Nutr Metab. 2012;37(5):893–9. 52. van Can J, Sloth B, Jensen CB, Flint A, Blaak EE, Saris WH.
- Effects of the once-daily GLP-1 analog liraglutide on gastric emptying, glycemic parameters, appetite and energy metabolism non-diabetic adults. Int J Obes (Lond). 2014:38(6):784-93.
- 53. Pannacciulli N, Le DS, Salbe AD, Chen K, Reiman EM, Tata anni PA, et al. Postprandial glucagon-like peptide-1 (GLP-1) response is positively associated with changes in neuronal activity of brain areas implicated in satiety and food intake reg-ulation in humans. Neuroimage. 2007;35(2):511–7.
- De Silva A, Salem V, Long CJ, Makwana A, Newbould RD, Rabiner EA, et al. The gut hormones PYY 3-36 and GLP-1 7-36 amide reduce food intake and modulate brain activity in appetite
- amide reduce food intake and modulate brain activity in appetite centers in humans. Cell Metab. 2011;14(5):700–6.
 55. van Bloemendaal L, IJzerman RG, Ten Kulve JS, Barkhof F, Konrad RJ, Drent ML, et al. GLP-1 receptor activation modulates appetite- and reward-related brain areas in humans. Diabetes. 2014;62(12):21456. 2014;63(12):4186-96.
- Davies MJ, Bergenstal R, Bode B, Kushner RF, Lewin A, Skjoth TV, et al. Efficacy of liraglutide for weight loss among patients with type 2 diabetes: the SCALE Diabetes Randomized Clinical Trial. JAMA. 2015;314(7):687-99.
- 57. Byetta® (exenatide) injection full prescribing information. 2005 http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2009/02177 3s9s11s18s22s25lbl.pdf. Accessed 13 Feb 2017.

∆ Adis

- ..., mjecuon. 2016. http://www. ccessuata.tda.gov/drugsat/da_docs/label/2016/208471Orig1s000 sl.pdf. Accessed 13 Feb 2017. DA. Victora initiation 58. FDA. Adlyxin (lixisenatide) injection. 2016. http://v
- FDA. Victoza injection. 2010. https://www.accessdata.fda.gov/ drugsatfda_docs/label/2010/0223411bl.pdf. Accessed 13 Feb 2017.
- 60. FDA. Exenatide extended-release for injectable suspension. 2014. ww.accessdata.fda.gov/dru gsatfda_docs/nda/2014/022200 g1s008.pdf. Accessed 13 Feb 2017. 61. FDA. Tanzeum (albiglutide) for injection. 2014. https://www
- cessdata.fda.gov/dn gsatfda_docs/label/2014/125431s000lb1.pdf. ccessed 13 Feb 2017.
- FDA. Trulicity (dulaglutide) injection. 2014. http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/appletter/2015/125469Orig1s 004ltr.pdf. Accessed 13 Feb 2017.
- 63. Svane MS, Boisen-Moller KN, Nielsen S, Jorgensen NB, Dirksen C, Bendtsen F, et al. Effects of endogenous GLP-1 and GIP on glucose tolerance after Roux-en-Y gastric bypass surgery. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2016;310(7):E505–14. Retnakaran R, Kramer CK, Choi H, Swaminathan B, Zinman B.
- Liraglutide and the preservation of pancreatic beta-cell function in early type 2 diabetes: the LIBRA trial. Diabetes Care. 2014;37(12):3270-8.
- 65. Lin CH, Hsieh SH, Sun JH, Tsai JS, Huang YY. Glucose variability and beta-cell response by GLP-1 analogue added-on CSII for patients with poorly controlled type 2 diabetes. Sci Rep. 2015:26(5):16968.
- 66 van Raalte DH, Bunck MC, Smits MM, Hoekstra T, Corner A, Diamant M, et al. Exenatide improves beta-cell function up to 3 years of treatment in patients with type 2 diabetes: a randomised controlled trial. Eur J Endocrinol. 2016;175(4):345–52.
 67. Brill AL, Wisinski JA, Cadena MT, Thompson MF, Fenske RJ,
- Brar HK, et al. Synergy between Gzz deficiency and GLP-1 analog treatment in preserving functional β -cell mass in experi-mental diabetes. Mol Endocrinol. 2016;30(5):543–56.
- Green AD, Vasu S, Moffett RC, Flatt PR. Co-culture of clonal beta cells with GLP-1 and glucagon-secreting cell line impacts on 68. beta cell insulin secretion, proliferation and susceptibility to cytotoxins. Biochimie. 2016;125:119–25. 69. Abe H, Uchida T, Hara A, Mizukami H, Komiya K, Koike M,
- et al. Exendin-4 improves beta-cell function in autophagy-deficient beta-cells. Endocrinology. 2013;154(12):4512–24. 70. Lim SW, Jin L, Jin J, Yang CW. Effect of exendin-4 on autop-
- hagy clearance in beta cell of rats with tacrolimus-induced diates mellitus. Sci Rep. 2016;20(6):29921.
- 71. Kim MH, Kim EH, Jung HS, Yang D, Park EY, Jun HS. EX4 stabilizes and activates Nrf2 via PKCdelta, contributing to the prevention of oxidative stress-induced pancreatic beta cell dam-age. Toxicol Appl Pharmacol. 2016;07(315):60–9.
- 72. Drucker DJ. The biology of incretin hormones. Cell Metab. 2006;3(3):153-65. 73. Drucker DJ. The cardiovascular biology of glucagon-like pep-
- Drucker DJ. The cardiovascular biology of glucagon-like pep-tide-1. Cell Metab. 2016;24(1):15–30.
 Wang B, Zhong J, Lin H, Zhao Z, Yan Z, He H, et al. Blood pressure-lowering effects of GLP-1 receptor agonists exenatide and liraglutide: a meta-analysis of clinical trials. Diabetes Obes Metab. 2013;15(8):737–49. 74.
- 75. Nauck MA, Kemmeries G, Holst JJ, Meier JJ, Rapid tachyphylaxis of the glucagon-like peptide 1-induced deceleration of gastric emptying in humans. Diabetes. 2011;60(5):1561–5.
- 26. He W, Yu S, Wang L, He M, Cao X, Li Y, et al. Exendin-4 inhibits growth and augments apoptosis of ovarian cancer cells. Mol Cell Endocrinol. 2016;15(436):240–9.
- Gutzwiller JP, Tschopp S, Bock A, Zehnder CE, Huber AR, Kreyenbuchl M, et al. Glucagon-like peptide 1 induces natriuresis 77. in healthy subjects and in insulin-resistant obese men. J Clin Endocrinol Metab. 2004:89(6):3055-61.

GLP-1RAs in the Brain-Adipocyte Axis

- Zhao X, Liu G, Shen H, Gao B, Li X, Fu J, et al. Liraglutide inhibits autophagy and apoptosis induced by high glucose through GLP-1R in renal tubular epithelial cells. Int J Mol Med. 2015;35(3):684–92.
- Valdecattos MP, Pardo V, Ruiz L, Castro-Sanchez L, Lanzon B, Fernandez-Millan E, et al. A novel glucagon-like peptide 1/glucagon receptor dual agonist improves steatohepatitis and liver regeneration in mice. Hepatology. 2016. doi:10.1002/hep.28962 (Epub 2016 Nov 23).
- Gastaldelli A, Gaggini M, Daniele G, Ciociaro D, Cersosimo E, Tripathy D, et al. Exenatide improves both hepatic and adipose tissue insulin resistance: a dynamic positron emission tomography study. Hepatology. 2016;64(6):2028–37.
 Hadjiyanni I, Siminovitch KA, Danska JS, Drucker DJ. Gluca-
- Hadjiyanni I, Siminovitch KA, Danska JS, Drucker DJ. Glucagon-like peptide-1 receptor signalling selectively regulates murine lymphocyte proliferation and maintenance of peripheral regulatory T cells. Diabetologia. 2010;53(4):730–40.
- Scholg H, Kabisch S, Horstman A, Lohman G, Muller K, Lepsien J, et al. Exenatide-induced reduction in energy intake is associated with increase in hypothalamic connectivity. Diabetes Care. 2013;36(7):1933–40.
- Care. 2013;36(7):1933-40.
 83. van Bloemendaal L, Veltman DJ, ten Kulve JS, Drent ML, Barkhof F, Diamant M, et al. Emotional eating is associated with increased brain responses to food-cues and reduced sensitivity to GLP-1 receptor activation. Obesity. 2015;23(10):2075-82.
 84. van Bloemendaal L, Veltman DJ, Ten Kulve JS, Groot PF, Ruhe
- van Bloemendaal L, Veltman DJ, Ten Kulve JS, Groot PF, Ruhe HG, Barkhof F, et al. Brain reward-system activation in response to anticipation and consumption of palatable food is altered by glucagon-like peptide-1 receptor activation in humans. Diabetes Obes Metab. 2015;17(9):878–86.
 Athauda D, Foltynie T. The glucagon-like peptide 1 (GLP)
- Athauda D, Foltynie T. The glucagon-like peptide 1 (GLP) receptor as a therapeutic target in Parkinson's disease: mechanisms of action. Drug Discov Today. 2016;21(5):802–18.

- ten Kulve JS, Veltman DJ, van Bloemendaal L, Barkhof F, Deacon CF, Holst JJ, et al. Endogenous GLP-1 mediates postprandial reductions in activation in central reward and satiety areas in patients with type 2 diabetes. Diabetologia. 2015;58(12):2688–98.
 Daniele G, Iozzo P, Molina-Carrion M, Lancaster J, Ciociaro D,
- Daniele G, Iozzo P, Molina-Carrion M, Lancaster J, Ciociaro D, Cersosimo E, et al. Exenatide regulates cerebral glucose metabolism in brain areas associated with glucose homeostasis and reward system. Diabetes. 2015;64(10):3406–12.
- Eldor R, Daniele G, Huerta C, Al-Atrash M, Adams J, DeFronzo R, et al. Discordance between central (brain) and pancreatic action of exenatide in lean and obese subjects. Diabetes Care. 2016;39(10):1804–10.
 Aviles-Olmos I, Dickson J, Kefalopoulou Z, Djamshidian A, Ell
- Aviles-Olmos I, Dickson J, Kefalopoulou Z, Djamshidian A, Ell P, Soderlund T, et al. Exenatide and the treatment of patients with Parkinson's disease. J Clin Invest. 2013;123(6):2730–6.
 Farr OM, Tsoukas MA, Triantafyllou G, Dincer F, Filippaios A,
- Farr OM, Tsoukas MA, Trantafyllou G, Dincer F, Filippatos A, Ko BJ, et al. Short-term administration of the GLP-1 analog liraglutide decreases circulating leptin and increases GIP levels and these changes are associated with alterations in CNS responses to food cues: a randomized, placebo-controlled, crossover study. Metabolism. 2016;65(7):945–53.
 Ten Kulve JS, Veltman DJ, van Bloemendaal L, Barkhof F, Drent
- Ten Kulve JS, Veltman DJ, van Bloemendaal L, Barkhof F, Drent ML, Diamant M, et al. Liraglutide reduces CNS activation in response to visual food cues only after short-term treatment in patients with type 2 diabetes. Diabetes Care. 2016;39(2):214–21.
- Ferminella GD, Edison P. Evaluation of neuroprotective effect of glucagon-like peptide 1 analogs using neuroimaging. Alzheimers Dement. 2014;10(1 Suppl):S55–61.

∆ Adis

Anexo 2

Certificado de aprovação do projeto pela Comissão de Ética em Uso de Animais

CEUA/Unicamp Comissão de Ética no Uso de Animais **CEUA/Unicamp** CERTIFICADO Certificamos que o projeto "O papel da inflamação sistêmica nos mecanismos de regulação da adipogênese de tecido adiposo marrom em camundongos Swiss com obesidade induzida por dieta hiperlipídica" (protocolo nº 3600-1), sob a responsabilidade de Lício Augusto Velloso / José Carlos De Lima Junior, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE B DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009. A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 19 de novembro de Campinas, 19 de novembro de 2014. SWS of. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira Fátima Alonso Secretária Executiva

Telefone: (19) 3521-6359 E-mail: comisib@unicamp.br

Anexo 3

Certificado de aprovação do projeto envolvendo humanos pelo Comitê de Ética em Pesquisa



ANEXO 4 – Autorização da Springer Nature para reprodução integral do artigo de revisão que compõe o anexo 1



Creative Commons

The request you have made is considered to be non-commercial/educational. As the article you have requested has been distributed under a Creative Commons license (Attribution-Noncommercial), you may reuse this material for non-commercial/educational purposes without obtaining additional permission from Springer Nature, providing that the author and the original source of publication are fully acknowledged (please see the article itself for the license version number). You may reuse this material without obtaining permission from Springer Nature, providing that the author and the original source of publication are fully acknowledged, as per the terms of the license. For license terms, please see http://creativecommons.org/



Copyright © 2018 <u>Copyright Clearance Center, Inc.</u> All Rights Reserved. <u>Privacy statement</u>, <u>Terms and Conditions</u>. Comments? We would like to hear from you. E-mail us at <u>customercare@copyright.com</u>