UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Ana Teresa Prata Resende

**Avaliação da heterogeneidade fenotípica e da sensibilidade aos
glicocorticoides em portadores de Lipodistrofia Parcial Familiar tipo 2**

Ribeirão Preto
2018

ANA TERESA PRATA RESENDE

Avaliação da heterogeneidade fenotípica e da sensibilidade aos glicocorticoides em portadores de Lipodistrofia Parcial Familiar tipo 2

Versão corrigida

(A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP – BDTD)

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Área de concentração: Clínica Médica.

Opção: Investigação Médica.

Orientadora: Profa. Dra. Margaret de Castro

Ribeirão Preto
2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo ou pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca Central do Campus Administrativo de
Ribeirão Preto / USP.

Resende, Ana Teresa Prata

Avaliação da heterogeneidade fenotípica e da sensibilidade aos
glicocorticoides em portadores de Lipodistrofia Parcial Familiar tipo 2
Ribeirão Preto, 2018.

132 p.: il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto, USP. Área de concentração: Clínica Médica.

Orientadora: Profa. Dra. Margaret de Castro.

1. Lipodistrofia Parcial Familiar tipo 2 2. Resistência Insulínica 3.
Síndrome Metabólica 4. Sensibilidade aos Glicocorticoides

Nome: Ana Teresa Prata Resende

Título: Avaliação da heterogeneidade fenotípica e da sensibilidade aos glicocorticoides em portadores de Lipodistrofia Parcial Familiar tipo 2.

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo para a obtenção do título de Mestre
em Ciências Médicas.

Área de concentração: Clínica Médica.

Opção: Investigação Clínica.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Ensino do Estado de São Paulo - FAPESP (Processo nº 2007/58365-3) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq (Processo nº 150569/2015-7).

Dedicatória

DEDICATÓRIA

*Ao meu esposo, Marco Tullio, pelo companheirismo, compreensão e amor incondicional.
O seu incentivo, mesmo ciente das dificuldades que a distância nos imporia,
foi a essência para a realização deste trabalho.*

*À minha pequena Ana Lis, fonte de inspiração e doçura.
Apesar de sua pouca idade, já se demonstra tão astuta e matura, especialmente para se adaptar
às mudanças freqüentes em sua rotina decorrentes da realização deste trabalho.
Filha, você me trouxe a força, equilíbrio e leveza!*

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Rosa e Jorge, obrigada pela criação que, mesmo rigorosa, nunca padeceu da falta de carinho ou amor. Vocês me ensinaram os verdadeiros valores da vida: o caráter e o respeito ao próximo. Pai, o senhor é meu exemplo de médico, ética, resignação e dignidade. Mãe, minha “rosinha” tão peculiar, exemplo de amor, autenticidade, dedicação e simplicidade. Meu eterno obrigada por sempre terem priorizado a nossa família e a educação, minhas maiores riquezas!

Aos meus irmãos, Jorge e Marcelo, amigos inseparáveis e companheiros de profissão. Dividimos os melhores momentos da infância, os sabores das conquistas e também os amargos das decepções. Jorge, meu protetor e “companheiro de Turma”, principal incentivador na minha formação acadêmica, exímio profissional, exemplo de determinação, competência e altruísmo. Marcelo, apesar do meu elo maternalista, é o meu gigante encorajador! Perspicácia diversificada, habilidoso e entusiasta, inspiração “savoir vivre”. A vocês agradeço especialmente pelo acolhimento em Ribeirão Preto, amor, força e valiosos conselhos.

À irmã que a vida me proporcionou, Graziela, amiga fiel e dedicada. Obrigada pela cumplicidade, ternura e cuidado. Você me traz ao equilíbrio e me fortalece!

Agradeço especialmente a minha sogra, Wanda, que nunca poupou esforços e carinho para me ajudar. Obrigada pelo amor sincero e por sempre me acolher como sua filha.

Aos cunhados, meu afeto por vocês vai além do propósito que nos uniu! Fabíola e Mariana, mais do que cunhadas, se tornaram verdadeiras amigas! Obrigada por me receberem com tanto esmero em suas casas e em suas vidas. Marco Aurélio, “cunhado-irmão”, sempre disposto a ajudar e proteger. A vocês obrigada pelo companheirismo, receptividade, paciência e, especialmente, pelo zelo com Ana Lis na minha ausência.

Aos avós (Osvaldo, Dila e Filinha) obrigada pelos exemplos de luta e amor. Aos familiares (especialmente Rafael, Bruna, Juliana, Márita e tias Ana, Dila e Eda), Eliane, vó Wanda, Mel, Gabi, Ianessa, Ilka e demais amigos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, mesmo que em orações, agradeço pelo apoio.

A Deus pelo dom da vida e da fé! A todos que estiveram e continuam presentes nessa caminhada: vocês compartilharam da minha ausência e me apoiaram com carinho e compreensão. Dedico-lhes este trabalho!

Agradecimentos Especiais

À orientadora e mestre **Profa. Dra. Margaret de Castro** grande exemplo de mulher e profissional. A minha profunda admiração à sua ética, sapiência, competência e dedicação à medicina e ao ensino de nosso país. Agradeço pela confiança, paciência e por ter aceitado o desafio de me direcionar ao início desta trajetória acadêmica. Minha eterna gratidão pela convivência e aprendizado, que muito contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional.

À **Clarissa Martins Silva**, amizade que o mestrado me permitiu reencontrar e estreitar, agradeço pelo incansável companheirismo, ensinamentos, conselhos e incentivos. Obrigada pela paciência e imensurável colaboração para a realização deste trabalho. Você tornou mais leve a adaptação ao desconhecido!

À **Profa. Dra. Maria Cristina Foss-Freitas**, que participou da elaboração e viabilidade deste projeto, obrigada por toda colaboração.

Ao padrinho **Dr. José Resende Lopes**, minha referência da verdadeira medicina humanista, a eterna saudade e gratidão por tudo. À **Profa. Dra. Elisabete Mantovani Resende**, inspiração para minha escolha pela endocrinologia, sua paciência e bondade a tornam peculiar em todas as funções exercidas! Ao tio **Prof. Dr. Aluísio Prata**, exemplo de disposição e dedicação.

Aos **professores Dr. Ayrton C. Moreira, Dr. Sonir Antonini e Dra Paula Elias**, obrigada pela disposição em ajudar e ensinar; e à **Carol Bueno** por auxiliar nas antropometrias. Aos amigos e funcionários do Laboratório de Endocrinologia, em especial Cla, Carol, Silvia, Leo, Letícia, Renata, Aline, Wendy e Mônica obrigada pelo apoio e maravilhosa convivência.

Aos estimados professores do Departamento de Endocrinologia da UFTM: **Dra. Maria de Fátima Borges, Dra. Elisabete Mantovani, Dra. Beatriz Hallal, Dra. Elvi Cristina, Dra. Beatriz Pires, Dra. Heloísa Palhares** e, ainda, **Dra. Fernanda Magalhães** da Universidade de Uberaba, obrigada pelo aprendizado. Às grandes amigas que a residência de endocrinologia me permitiu e que levarei para toda vida: Ianessa Valle, Gabriela Resende e Ilka Mara. Enfim, à grande “família Endocrinológica” de Uberaba a minha gratidão.

Aos demais amigos, funcionários e pós-graduandos da divisão de Clínica Médica do HC-FMRP, agradeço pelo trabalho conjunto e anos de prazerosa convivência e alegria.

Por fim, às famílias-índices do estudo e aos voluntários do grupo controle, obrigada por colaborarem para a realização deste trabalho.

Resumo

Resende ATP. Avaliação da heterogeneidade fenotípica e da sensibilidade aos glicocorticoides em portadores de Lipodistrofia Parcial Familiar tipo 2. 2018. 132 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

RESUMO

Introdução: A Lipodistrofia Parcial Familiar tipo 2 (FPLD2) é caracterizada pela perda do tecido adiposo em extremidades, adiposidade central, resistência insulínica e elevado risco cardiovascular. FPLD2 apresenta semelhanças clínicas com a síndrome de Cushing, tanto pelo padrão de distribuição adiposa quanto pelos distúrbios metabólicos que a acompanham, sugerindo a possibilidade do envolvimento dos glicocorticoides (GC) na patogênese das alterações metabólicas na FPLD2. **Objetivos:** Avaliar a heterogeneidade fenotípica e a sensibilidade aos GC em pacientes com FPLD2 portadores de duas diferentes mutações do gene *LMNA*: a p.R482W ou a p.R644C. **Pacientes e Métodos:** Estudo observacional analítico de caso-controle realizado no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. Os portadores de FPLD2 (n=24) e indivíduos saudáveis (n=24) foram avaliados quanto a parâmetros antropométricos, composição corporal, perfil metabólico e níveis plasmáticos de adipocinas e citocinas plasmáticas. Cortisol plasmático e salivar foram dosados em condições basais e após três diferentes doses de dexametasona (DEX – 0,25; 0,5 e 1,0 mg) administrada às 23h. A expressão gênica das isoformas α e β dos receptores do glicocorticoide (*GR*) e da 11 β -hidroxiesteróide desidrogenase tipo 1 e 2 (*11 β -HSD1* e *11 β -HSD2*) foi avaliada por qPCR. **Resultados:** Os portadores de FPLD2 apresentaram aumento de circunferência abdominal e cervical e redução da circunferência de quadril, das pregas cutâneas periféricas e da massa adiposa corporal. Os pacientes apresentaram elevados níveis de HOMA, triglicerídeos, TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10, e redução dos níveis plasmáticos de adiponectina e leptina. Após 0,5 mg de DEX, o cortisol salivar apresentou-se menos supresso em portadores de FPLD2. As características clínicas e bioquímicas foram mais evidentes nos portadores da mutação p.R482W do *LMNA* em comparação aos portadores da mutação p.R644C. Não observamos diferenças quanto

à expressão dos genes *GR α* , *GR β* , *11 β -HSD1* e *11 β -HSD2* entre os grupos.

Conclusões: A heterogeneidade fenotípica identificada entre os portadores de FPLD2 está associada ao local da mutação no gene *LMNA*. Observamos menor habilidade de supressão do eixo HPA após 0,5 mg DEX em portadores de FPLD2, sendo que essa dose foi a mais efetiva para a avaliação do espectro de sensibilidade aos GC entre os grupos. Em portadores de FPLD2, o estado pró-inflamatório está relacionado à redução da sensibilidade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) aos GC.

Palavras-chave: Lipodistrofia Parcial Familiar tipo 2. Resistência insulínica. Síndrome metabólica. Sensibilidade aos glicocorticoides.

Abstract

Resende ATP. Phenotypic Diversity and Glucocorticoid Sensitivity in Patients with Familial Partial Lipodystrophy Type 2. 2018. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

ABSTRACT

Context: Familial partial lipodystrophy type 2 (FPLD2) is characterized by insulin resistance, adipose atrophy of the extremities, and central obesity. Due to the resemblance with Cushing's syndrome, we hypothesized a putative role of glucocorticoid (GC) in the pathogenesis of metabolic abnormalities in FPLD2. **Objective:** To evaluate the phenotypic heterogeneity and GC sensitivity in FPLD2 patients exhibiting the p.R482W or p.R644C *LMNA* mutations. **Design, Setting and Participants:** Prospective study with FPLD2 patients (n=24) and controls (n=24) at Ribeirão Preto Medical School University Hospital. **Intervention and Main Outcome Measures:** Participants underwent anthropometric, body composition, metabolic profile, plasma adipokines and cytokines measurements. Plasma and salivary cortisol were measured in basal conditions and after 0.25, 0.5, and 1.0 mg of dexamethasone (DEX) given at 2300h. Glucocorticoid receptor and *11 β HSD* isoforms expression were assessed by qPCR. **Results:** FPLD2 individuals presented increased waist and neck circumferences, decreased hip circumference, peripheral skinfold thickness, and fat mass. Patients presented increased HOMA and triglycerides, increased TNF- α , IL-1 β , IL-6, and IL-10, and decreased plasma adiponectin and leptin levels. After 0.5mg DEX, salivary cortisol was less suppressed in FPLD2 patients. The clinical and biochemical phenotypes were more pronounced in patients harboring the p.R482W *LMNA* mutation. No differences were observed in the *GR α* , *GR β* , *11 β -HSD1*, and *11 β -HSD2* expressions. **Conclusions:** FPLD2 patients exhibited phenotypic heterogeneity related to *LMNA* mutations. Patients showed less ability to suppress cortisol after 0.5 mg DEX, which was the most effective dose to expose the spectral HPA axis sensitivity among groups. Increased levels of proinflammatory cytokines might contribute to decreased GC sensitivity in FPLD2.

Keywords: Familial Partial Lipodystrophy Type 2. Insulin resistance. Metabolic Syndrome. Glucocorticoid sensitivity.

Lista de Abreviaturas

LISTA DE ABREVIATURAS

AGPAT2: gene humano codificador da 1-acilglicerol-3-fosfato o-aciltransferase (*1-acylglycerol-3-phosphate o-acyltransferase 2*)

ALT: alanina aminotransferase

AST: aspartato aminotransferase

11 β -HSD1: 11 β -hidroxiesteróide desidrogenase tipo 1

11 β -HSD1: gene humano codificador da 11 β -hidroxiesteróide desidrogenase tipo 1

11 β -HSD2: 11 β -hidroxiesteróide desidrogenase tipo 2

11 β -HSD2: gene humano codificador da 11 β -hidroxiesteróide desidrogenase tipo 2

BIA: bioimpedância

BSCL2: Lipodistrofia Congênita de Berardinelli-Seip tipo 2

BSCL2: gene humano responsável pela lipodistrofia congênita de Berardinelli-Seip tipo 2 (*Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy 2*)

CA: circunferência abdominal

CAV1: gene humano codificador da caveolina 1 (*caveolin 1*)

CBG: proteína transportadora de glicocorticoides

CC: circunferência cervical

CGL2: Lipodistrofia Generalizada Congênita tipo 2

CQ: circunferência de quadril

CT: colesterol total

C-terminal: carboxi terminal

DEX: dexametasona

DHGNA: doença hepática gordurosa não alcoólica

DM2: diabetes mellitus tipo 2

DNA: ácido desoxirribonucleico

EGC%: porcentagem estimada da gordura corporal

FPL: Lipodistrofia parcial familiar

FPLD2: Lipodistrofia parcial familiar tipo 2

GC: glicocorticoide

GR: receptor do glicocorticoide

GR α : receptor do glicocorticoide isoforma alfa

GR α : gene humano codificador do receptor do glicocorticoide isoforma alfa

GR β : receptor do glicocorticoide isoforma beta

GR β : gene humano codificador do receptor do glicocorticoide isoforma beta

GRE: elementos responsivos aos glicocorticoides

HAART: terapia anti-retroviral de alta eficácia (Highly Active Antiretroviral Therapy)

HAS: hipertensão arterial sistêmica

HbA1c: hemoglobina glicosilada

HDL-c: colesterol de lipoproteína de alta densidade

HOMA: Modelo de Avaliação da Homeostase (Homeostasis Model Assessment)

HPA: hipotálamo-hipófise-adrenal

HSP: proteína de choque térmico

IL-1 β : interleucina 1 beta

IL-6: interleucina 6

IL-10: interleucina 10

IMC: índice de massa corporal

IRS-1: substrato do receptor da insulina

LDL-c: colesterol de lipoproteína de baixa densidade

MCP1: proteína quimiostática de monócito

MG%: porcentagem de massa gorda

MM%: porcentagem de massa magra

PBMC: células mononucleares do sangue periférico

PPAR γ : gene humano codificador do Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxisoma gama (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma*)

PTRF: gene humano codificador do fator de liberação do transcrito (*Transcript Release Factor*)

QUICKI: Índice Quantitativo de Sensibilidade Insulínica (Quantitative Insulin Sensitivity Check Index)

RI: resistência insulínica

RIA: radioimunoensaio

RNA: ácido ribonucleico

SM: síndrome metabólica

SNPs: polimorfismos

SREBP1c: proteína ligadora do elemento responsivo ao esterol

TAS: tecido adiposo subcutâneo

TG: triglicérides

TNF- α : fator de necrose tumoral

UCP1: proteína desacopladora 1 (uncoupling protein 1)

Lista de figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação cromatográfica da mutação c.1444C>T (p.R482W) do exon 8 do gene *LMNA*.....53

Figura 2 - Representação cromatográfica da mutação c.1930C>T (p.R644C) do exon 11 do gene *LMNA*.....54

Figura 3 - Correlação entre a porcentagem estimada de gordura corporal (EGC%), calculada pela somatória das pregas cutâneas, e a porcentagem de gordura corporal (MG%), mensurada pela bioimpedância, em indivíduos do grupo controle (A) e em portadores de Lipodistrofia Familiar Parcial tipo 2 (B).....61

Figura 4 - Concentrações plasmáticas de dexametasona em condições basais e após a administração de doses crescentes de dexametasona (0,25; 0,5 e 1,0 mg) nos indivíduos do grupo controle (A) e portadores de Lipodistrofia Familiar Parcial tipo 2 (B).....68

Figura 5 - Concentração de cortisol plasmático (ug/dl) e salivar (ng/dL) em condições basais e após 0,25, 0,50 e 1,0 mg de dexametasona nos indivíduos do grupo controle (A) e em portadores de Lipodistrofia Familiar Parcial tipo 2 (B).....69

Lista de tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados clínicos, fenotípicos e genotípicos de portadores de Lipodistrofia Familiar Parcial tipo 2.....**55**

Tabela 2 - Prevalência de comorbidades em pacientes com Lipodistrofia Familiar Parcial tipo 2 (FPLD2) portadores das mutações p.R482W e p.R644C no gene *LMNA*.....**57**

Tabela 3 - Características antropométricas e de composição corporal de indivíduos do grupo controle e dos portadores da Lipodistrofia Familiar Parcial tipo 2 (FPLD2) com mutação p.R482W e p.R644C no gene *LMNA*.....**59**

Tabela 4 - Dados bioquímicos de indivíduos do grupo controle e dos portadores da Lipodistrofia Familiar Parcial tipo 2 (FPLD2) com mutação p.R482W e p.R644C no gene *LMNA*.....**62**

Tabela 5 - Dosagens de adipocinas e citocinas plasmáticas de indivíduos do grupo controle e dos portadores da Lipodistrofia Familiar Parcial tipo 2 (FPLD2) com mutação p.R482W e p.R644C no gene *LMNA*.....**63**

Tabela 6 - Concentrações de cortisol plasmático e salivar em condições basais e após supressão com diferentes doses de dexametasona (DEX) em indivíduos do grupo controle e em portadores de Lipodistrofia Familiar Parcial tipo 2 (FPLD2).....**65**

Tabela 7 - Concentrações de cortisol plasmático e salivar em condições basais e após supressão com diferentes doses de dexametasona (DEX) nos portadores de Lipodistrofia Familiar Parcial tipo 2 (FPLD2) com mutação p.R482W e p.R644C no gene *LMNA*.....**66**

Tabela 8 - Concentrações de dexametasona plasmática em condições basais e após o teste de supressão com diferentes doses de dexametasona (DEX) nos indivíduos do grupo controle e nos portadores da Lipodistrofia Familiar Parcial tipo 2 (FPLD2) com mutação p.R482W e p.R644C no gene *LMNA*.....**67**

Tabela 9 - Expressão dos genes *GR α* , *GR β* , *11 β -HSD1* e *11 β -HSD2* em células mononucleares de sangue periférico de indivíduos do grupo controle e dos portadores da Lipodistrofia Familiar Parcial tipo 2 (FPLD2) com mutação p.R482W e p.R644C no gene *LMNA*.....**70**

Sumário

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	28
2 JUSTIFICATIVA.....	35
3 OBJETIVOS.....	37
3.1 OBJETIVO GERAL.....	38
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
4 PACIENTES E MÉTODOS.....	39
4.1 CASUÍSTICA E SUJEITOS DA PESQUISA.....	40
4.1.1 Critérios de inclusão e exclusão.....	40
4.1.1.1 Grupo de portadores de FPLD2.....	40
4.1.1.2 Grupo controle.....	41
4.2 INVESTIGAÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENE <i>LMNA</i>	42
4.3 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA.....	42
4.4 AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA.....	42
4.5 AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO CORPORAL.....	44
4.6 COLETA BASAL DE SANGUE.....	45
4.7 COLETA DE SALIVA.....	45
4.8 TESTE DE SUPRESSÃO COM DEXAMETASONA.....	46
4.9 DOSAGENS DOS HORMÔNIOS ESTERÓIDES.....	46
4.9.1 Determinação de Cortisol Plasmático.....	46
4.9.2 Determinação de Cortisol Livre na Saliva.....	47
4.9.3 Determinação de Dexametasona Plasmática.....	47
4.10 AVALIAÇÃO METABÓLICA.....	48
4.11 DOSAGENS PLASMÁTICAS DE INSULINA E ADIPOCINAS.....	49
4.12 ESTUDO MOLECULAR.....	50
4.12.1 Extração de DNA e RNA.....	50
4.12.2 Avaliação da expressão gênica.....	50
4.13 Análise estatística.....	51
5 RESULTADOS.....	52
5.1 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA DOS PACIENTES COM FPLD2.....	53

5.2 DADOS ANTROPOMÉTRICOS E DE COMPOSIÇÃO CORPORAL.....	58
5.3 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA E ANÁLISE DE ADIPOCINAS.....	62
5.4 AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE AOS GLICOCORTICOIDES NO EIXO HPA: CORTISOL PLASMÁTICO E SALIVAR APÓS TESTE DE SUPRESSÃO COM DIFERENTES DOSES DE DEXAMETASONA.....	64
5.5 AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE AOS GLICOCORTICOIDES EM CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO: EXPRESSÃO DOS GENES <i>GRα</i> , <i>GRβ</i> , <i>11β-HSD1</i> E <i>11β-HSD2</i>	69
6 DISCUSSÃO.....	71
7 REFERÊNCIAS.....	82
8 ANEXOS.....	89

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

As síndromes lipodistróficas compreendem um grupo heterogêneo de condições clínicas caracterizadas pela perda generalizada ou parcial do tecido adiposo, decorrentes de alterações congênitas ou adquiridas e, em geral, associadas a complicações metabólicas. Classicamente, convergem de disfunções da adipogênese ou de defeitos na formação, manutenção ou regulação da gotícula lipídica do adipócito com comprometimento de vários produtos da secreção endócrina adiposa e alterações nas vias de sinalização insulínica (Garg 2004; Lightbourne; Brown 2017).

As formas mais frequentes de lipodistrofia são as adquiridas, sobretudo aquelas em pacientes com HIV relacionadas ao uso de inibidores de protease e da transcriptase reversa e, ainda, a outras medicações como os glicocorticoides e as insulinas. Distúrbios do sistema imunológico também podem estar associados às lipodistrofias adquiridas, seja nas suas formas generalizadas, como a síndrome de Lawrence, ou nas formas parciais como a síndrome de Barraquer-Simons (Vantyghem et al. 2012).

As lipodistrofias familiares decorrem do acometimento de genes envolvidos em diferentes mecanismos do desenvolvimento e da função do adipócito, podendo se manifestar logo ao nascimento, infância ou mesmo na vida adulta. Mutações de genes envolvidos na formação da gota lipídica do adipócito, como o *AGPAT2* (*1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 2*), *BSCL2* (*Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy 2*), *CAV1* (caveolin 1) e *PTRF* (transcript release factor), estão relacionadas às formas generalizadas de lipodistrofia congênita, também denominadas síndrome de Berardinelli-Seip. Dentre elas, a Lipodistrofia Generalizada Congênita tipo 2 (CGL2) é considerada a forma mais grave, com ausência total de tecido adiposo logo ao nascimento e complicações precoces, como o diabetes mellitus ainda na primeira década de vida (Garg; Agarwal 2009; Lightbourne; Brown 2017).

As mutações relacionadas às formas de lipodistrofia parcial familiar (FPL) comprometem principalmente os mecanismos de sobrevivência dos adipócitos e são classificadas de acordo com o gene acometido: Lipodistrofia Parcial Familiar tipo 1 - FPLD1 ou variante de Kobberling (cujas bases genéticas permanecem não elucidadas), FPLD2 (*LMNA*), FPLD3 (*PPAR γ* - receptor do ativador do proliferador do peroxisoma

gama), FPLD4 (*PLIN1*), FPLD5 (*CIDEA*), FPLD6 (*LIPF*) e as formas relacionadas a mutações no *AKT2* (ou *PKB*). Em geral, as FPL são extremamente raras e mais da metade dos casos descritos decorrem da FPLD2, que é também o foco de nosso estudo (Garg 2011).

A FPLD2 foi inicialmente descrita como síndrome da Adiposidade Cervical, quando Ozer e cols., em 1973, identificaram um padrão insólito de distribuição adiposa, caracterizado por adiposidade cervical, axilar e pubiana, associada à lipoatrofia em extremidades, dislipidemia e diabetes mellitus (Ozer et al. 1973). Posteriormente, Dunnigan et al., em 1974, descreveram um padrão clínico semelhante em duas famílias e, a partir de então, a síndrome foi classificada como lipodistrofia familiar parcial tipo 2, também conhecida como síndrome de Dunnigan ou diabetes lipotrófico (Dunnigan et al. 1974).

A FPLD2 é uma rara doença autossômica dominante (OMIM 151660), com prevalência estimada de 1 caso por 15 milhões de pessoas (Vantyghem et al. 2012). Seu diagnóstico baseia-se na perda do tecido adiposo subcutâneo (TAS) de extremidades, geralmente associada a alterações metabólicas e elevado risco cardiovascular. O processo de lipoatrofia evolui progressivamente a partir da puberdade e cursa com variado grau de perda adiposa em membros, glúteo e abdome anterior, conferindo um aspecto de pseudo-hipertrofia muscular. Tipicamente, ocorre hipertrofia do tecido adiposo em face, região submentoniana e supraclavicular (Dunnigan et al. 1974). Há ainda redistribuição lipídica para tecido hepático, muscular e cardiovascular, acompanhado de lipotoxicidade e distúrbios metabólicos, como resistência insulínica (RI), diabetes mellitus tipo 2 (DM2), hipertrigliceridemia, reduzidas concentrações de HDL-c (colesterol de lipoproteína de alta densidade), doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) e aterosclerose, que se instalam de maneira variável ao longo da vida. A presença de *acantose nigricans*, flebomegalia, hiperfagia, hiperandrogenismo ovariano e hipomastia (em mulheres) também compõem a apresentação clássica da FPLD2 (Handelsman et al. 2013).

Mutações *missense* no gene *LMNA*, localizado no cromossomo 1q21-22 (Peters et al. 1998), estão associadas à FPLD2 (Shackleton et al. 2000) e também a outros distúrbios do tecido neuromuscular, cardíaco e a síndromes progeróides (Guenantin et

al. 2014). Em conjunto, estas condições clínicas são conhecidas como laminopatias e resultam de perdas funcionais específicas das laminas A e C, que variam de acordo com o local da mutação no gene *LMNA* (Hegele 2000). As mutações localizadas no domínio da haste da lamina A cursam com cardiomiopatia dilatada e doenças neuromusculares (Fatkin et al. 1999; Muchir et al. 2000); as mutações na região hidrofóbica C-terminal da lamina A e C resultam em distrofia muscular autossômica dominante de Emery-Dreifuss (Bonne et al. 1999); e as mutações na porção globular C-terminal da lamina A e C resultam em FPLD2 (Speckman et al. 2000).

O gene *LMNA* contém 12 éxons que codificam domínios específicos das laminas A e C, e também de outras laminas menores como a lamina C2 e lamina A delta10. A maioria das mutações associadas à FPLD2 ocorrem no éxon 8 do *LMNA*, frequentemente no códon 482, e afetam as duas isoformas das laminas A e C. Ambas são fibras de laminas do tipo A codificadas por *splicing* alternativo no éxon 10 do *LMNA* e, portanto, possuem estruturas idênticas até o aminoácido de posição 566 (codificado pelos éxons 1 ao 10), mas se diferem pela sequência final do terminal carboxila. A lamina C termina com a sequência do éxon 10 e contém apenas 6 aminoácidos no grupo carboxil terminal. Já o grupo carboxil terminal da lamina A contém 98 aminoácidos e é codificado pelos éxons 11 e 12. Na maioria das células, pré-lamina A e lamina C são transcritas em quantidades equivalentes, mas os mecanismos determinantes do *splicing* ainda não são claramente compreendidos (Lin; Worman 1993; Dittmer; Misteli 2011).

As laminas pertencem a uma família de proteínas do filamento intermediário que compõem a lamina nuclear, uma estrutura polimérica localizada entre a cromatina e a membrana nuclear interna. As laminas A e C são essenciais para a integridade estrutural e funcional do envelope nuclear e, através da sua interação com a cromatina e outras proteínas nucleares, participam dos processos de divisão e manutenção celular e de transmissão de sinais entre o citoesqueleto e o núcleo (Prokocimer et al. 2009). Em portadores de FPLD2, as mutações na lamina A e C se traduzem em perda da interação da lamina a vários fatores de transcrição que são determinantes da adipogênese, homeostase lipídica e sinalização insulínica.

Os mecanismos envolvidos nos processos de degeneração e acúmulo do tecido adiposo em regiões específicas na FPLD2 ainda não são totalmente compreendidos. Embora os adipócitos do omento, em comparação àqueles do TAS, apresentem maior expressão da lamina C, diferenças nos níveis das proteínas lamina A e C não foram identificadas. Propõe-se que outras peculiaridades funcionais, relacionadas principalmente à localização dos adipócitos, possam estar relacionados ao padrão de distribuição adiposa na FPLD2 (Lelliott et al. 2002).

Alguns autores identificaram heterogeneidade fenotípica entre os portadores de FPLD2, especialmente entre aqueles cujas mutações resultam em perdas diferentes das isoformas da lamina A e C. Sugere-se que mutações que afetam apenas as isoformas da lamina A resultam em um fenótipo menos pronunciado de FPLD2, enquanto aquelas que afetam ambas as isoformas da lamina resultam em maior agressividade clínica (Speckman et al. 2000; Vigouroux et al. 2000; Garg et al. 2001; Mory et al. 2012). O sexo feminino também é relacionado à intensidade das manifestações clínicas (Garg; Peshock; Fleckenstein 1999; Garg 2000a; Vigouroux et al. 2000; Hegele et al. 2003) e, previamente, chegou-se a aventar uma possível ligação da FPLD2 ao cromossomo X (Kobberling; Dunnigan 1986). Dutour et al. sugerem que fenótipos mais leves da FPLD2 podem mimetizar a SM pura ou o diabetes mellitus poligênico e assim contribuir para um subdiagnóstico da FPLD2 (Dutour et al. 2011).

A síndrome de Cushing também é um importante diagnóstico diferencial da FPLD2, tanto pelo padrão similar de distribuição adiposa quanto pelos distúrbios metabólicos que a acompanham (Kobberling; Dunnigan 1986; Garg; Peshock; Fleckenstein 1999; Garg 2000b; Hegele 2000; Garg 2004).

Os glicocorticoides (GC) estão implicados na regulação do metabolismo lipídico e glicídico, na atividade do tecido adiposo e também do sistema imunológico e cardiovascular. Ainda que os dados permaneçam controversos (Abraham et al. 2013), estudos prévios sugerem que variações na atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), em resposta a estímulos internos e externos, e os níveis de secreção dos GC possam estar relacionadas à obesidade, síndrome metabólica (SM) e outras doenças correlatas (Duclos et al. 2005; Misra et al. 2008; Weigensberg; Toledo-Corral; Goran 2008; Anagnostis et al. 2009). Ademais, evidências atuais apontam mais

claramente para o papel central das vias de sensibilidade celular e do metabolismo periférico dos GC no desenvolvimento de distúrbios metabólicos e de outras doenças inflamatórias (Wang 2005; Silverman; Sternberg 2012; Quax et al. 2013; Lee et al. 2014).

Variações da sensibilidade aos GC são verificadas entre indivíduos saudáveis, mas também demonstram relação com condições patológicas. Múltiplos fatores, genéticos e adquiridos, estão envolvidos na resposta celular aos GC, que é modulada principalmente pela disponibilidade do hormônio no meio plasmático e intracelular e pelo grau de expressão das isoformas do receptor do glicocorticoide (GR).

A maior parte do cortisol circulante encontra-se na forma inativa, ou seja, aposta à globulina ligadora ao cortisol (CBG) e à albumina. Apenas 5% do cortisol plasmático estão na forma livre e capaz de ultrapassar a membrana plasmática das células alvo. Além da concentração de CBG, a atividade das enzimas 11 β -hidroxiesteróide desidrogenase tipo 1 e 2 (11 β -HSD1 e 11 β -HSD2), responsáveis pela conversão da cortisona em cortisol e vice-versa, são também limitantes da disponibilidade do cortisol no meio intra celular (Monder 1991; Stewart; Krozowski 1999). O grau de expressão da 11 β -HSD1 no tecido adiposo visceral é associado à obesidade, ao grau de adiposidade visceral (Veilleux et al. 2010) e às complicações correlatas (Rask et al. 2002; Schnackenberg et al. 2013). A hiperexpressão da 11 β -HSD1 foi também identificada como potencial mecanismo envolvido na lipodistrofia relacionada à terapia anti-retroviral de alta eficácia (HAART) (Sutinen et al. 2004).

A afinidade do GR ao ligante e a sua capacidade de progressão do sinal no meio intracelular são outros determinantes da sensibilidade aos GC. No citoplasma, o GC se liga ao GR promovendo a dissociação do complexo GR com as proteínas de choque térmico (HSP) e permitindo, então, a translocação do dímero hormônio-receptor para o núcleo. O GR apresenta duas isoformas, α e β , que são codificadas por *splicing* alternativo do *NR3C1*. O GR α é a isoforma ativa e capaz de promover a transcrição gênica pela sua ligação direta ao DNA (ácido desoxirribonucleico) ou a outros fatores de transcrição (como NF-B, AP-1). Por outro lado, o GR β é incapaz de se ligar aos GC e forma heterodímeros com o GR α , sobre o qual tem efeito repressor na ativação da

transcrição gênica (Bamberger et al. 1995; De Castro et al. 1996; Oakley; Sar; Cidlowski 1996).

A expressão das isoformas do GR está sujeita à modulação de citocinas inflamatórias, que podem regular também a atividade das 11 β -HSD 1 e 2 (Webster et al. 2001). Em condições inflamatórias, como na asma, artrite reumatóide e síndrome metabólica, a hiperexpressão do *GR β* é um dos mecanismos envolvidos na resistência tecido-específica aos GC (Barnes; Adcock 2009).

Polimorfismos (SNPs) do *NR3C1* também estão associados ao grau da resposta celular aos GC e têm sido correlacionados ao risco cardiometabólico. Indivíduos portadores do SNP ER22/23EK apresentam resistência relativa ao GC, menor RI e melhores níveis de LDL-c (colesterol de lipoproteína de baixa densidade) (Van Rossum et al. 2002). Por outro lado, a menor frequência do *BclI* está associada a distúrbios do eixo HPA e parecem envolvidas com a fisiopatogênese da SM (Martins et al. 2017).

Particularidades na sensibilidade tecidual aos GC, moduladas pelos múltiplos fatores expostos acima, estão envolvidas nas variações da integridade do eixo HPA e no padrão centrípeto e deletério de distribuição adiposa na SM (Boullu-Ciocca et al. 2003; Wake; Walker 2004; Wang 2005; Constantinopoulos et al. 2015).

Embora em pacientes com FPLD2 não exista hipercortisolismo clinicamente detectável, parâmetros que avaliam a sensibilidade aos GC ainda não foram estudados. No presente estudo, visamos avaliar a apresentação fenotípica clínica, laboratorial e molecular de pacientes com FPLD2 e o possível envolvimento dos GC na patogênese das anormalidades metabólicas observadas nesses pacientes.

2 Justificativa

2 JUSTIFICATIVA

FPLD2 é uma doença rara, cuja heterogeneidade fenotípica quanto à apresentação clínica, bioquímica e molecular não está claramente compreendida. Pacientes portadores de FPLD2 despertam interesse para o estudo da sensibilidade aos GC devido sua marcante resistência à insulina e perfil centrípeto de distribuição adiposa mimetizando a síndrome de Cushing, que classicamente se apresenta com obesidade truncal e distúrbios metabólicos.

No presente estudo, visando investigar uma possível heterogeneidade fenotípica entre pacientes com FPLD2, comparamos as características clínicas, o perfil de distribuição adiposa, a composição corporal, os parâmetros metabólicos e o perfil inflamatório em portadores de duas diferentes mutações no gene *LMNA*, a p.R482W no éxon 8 ou a p.R644C no éxon 11, pertencentes a cinco famílias diferentes. Ainda, devido às similaridades entre a FPLD2 e a síndrome de Cushing e uma vez que não existem trabalhos prévios avaliando a sensibilidade aos GC na FPLD2, aventamos o possível envolvimento dos GC na patogênese das anormalidades metabólicas observadas na FPLD2.

3 Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar parâmetros clínicos, bioquímicos, moleculares, a relação genótipo-fenótipo e a sensibilidade aos glicocorticoides em portadores de Lipodistrofia Familiar Parcial tipo 2.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Em portadores de Lipodistrofia Familiar Parcial tipo 2:

1. Avaliar a presença de mutação no gene *LMNA*;
2. Avaliar parâmetros antropométricos e de composição corporal;
3. Avaliar parâmetros bioquímicos e hormonais relacionados à síndrome metabólica e à resistência insulínica;
4. Avaliar perfil plasmático das adipocinas e o perfil inflamatório;
5. Avaliar a sensibilidade tecido-específica aos glicocorticoides utilizando como tecidos-alvo o eixo HPA e as células mononucleares de sangue periférico.

4 Pacientes e Métodos

4 PACIENTES E MÉTODOS

4.1 CASUÍSTICA E SUJEITOS DA PESQUISA

Trata-se de um estudo observacional analítico de caso-controle, que compara aspectos clínicos, laboratoriais e moleculares referentes à síndrome metabólica, resistência insulínica e sensibilidade aos glicocorticoides entre dois grupos: portadores de FPLD2 *versus* indivíduos saudáveis (grupo controle). Para a definição do valor amostral, adotamos metodologia por amostra de conveniência utilizando 1 caso de doença para cada indivíduo saudável (controle normal), pois a FPLD2 é extremamente rara (Vantyghem et al. 2012) e não há premissas conhecidas para comparação.

O estudo foi realizado no Ambulatório de Endocrinologia - Diabetes - do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP). As coletas de amostras foram realizadas na sala de coleta da Unidade de Pesquisa Clínica (UPC) do HCFMRP-USP. O processamento e análise das amostras foram realizados no laboratório de Radioimunoensaio e de Biologia Molecular da Divisão de Endocrinologia e Metabologia do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP.

O projeto está aprovado no CEP (Comitê de Ética e Pesquisa) do HCRP e FMRP/USP ofício 4021/2015, processo HCRP nº 10233/2015. Todos os indivíduos participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

4.1.1 Critérios de inclusão e exclusão

4.1.1.1 Grupo de portadores de FPLD2

Após obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, avaliamos 24 pacientes com LPFD2 (idade entre 14 e 64 anos) em seguimento no Ambulatório de Endocrinologia - Diabetes – HCFMRP/USP.

- **Critérios de inclusão:** confirmação de LPFD2 por critérios clínicos e por estudo genético pela avaliação da presença de mutação do gene *LMNA*.
- **Critérios de exclusão:** Presença de complicações crônicas do DM2 em estágios avançados (retinopatia proliferativa, insuficiência renal crônica, neuropatia autonômica e eventos cardiovasculares), gestação, neoplasia, uso de medicações contendo glicocorticoides, hormônios sexuais, anticoagulantes ou imunossupressores.

4.1.1.2 Grupo controle

- **Critérios de inclusão:** Selecionamos 24 indivíduos saudáveis, pareados por sexo, idade e IMC, com desejo expresso de participar e que concordaram com os termos de consentimento livre e esclarecido.
- **Critérios de exclusão:** diagnóstico prévio de doenças endócrino-metabólicas, cardiovasculares, psiquiátricas, hepatopatia ou insuficiência renal, neoplasia, gestação atual ou há menos de um ano, cirurgia recente, uso de medicações contendo glicocorticoides, hormônios sexuais, anticoagulantes ou imunossupressores, histórico de abuso de drogas, tabaco ou álcool. Desejo expresso de não participar, ou incapacidade por parte do indivíduo em assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

4.2 INVESTIGAÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENE *LMNA*

Os éxons 2, 7, 8, 9 e 11 do gene *LMNA* foram submetidos à amplificação por PCR utilizando primers previamente descritos (Monteiro et al. 2012a). Em seguida, utilizando kit comercial específico (ABI Prism® Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit; Applied Biosystems, Life Technologies, Foster City, CA, USA), os produtos de PCR foram sequenciados. A reação de seqüenciamento foi realizada em termociclador automático (*Perkin-Elmer 9600/* Cetus, Norwalk, CT). Os resultados dos sequenciamentos foram comparados à sequência nativa do gene *LMNA* (GenBankNG_008692.2) através do programa CodonCode Aligner V4.0.4 (CodonCode Co). A nomenclatura utilizada para as variantes encontradas segue as recomendações do *Human Genome Variation Society* (www.hgvs.org).

4.3 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA

Os pacientes portadores de FPLD2 foram submetidos a anamnese e exame físico minuciosos, visando identificação de dados clínicos e alterações fenotípicas características da FPLD2, como: padrão da distribuição do tecido adiposo corporal, presença de flebomegalia, *acantose nigricans*, pseudo hipertrofia muscular e de comorbidades (como DM2, HAS, dislipidemia, DHGNA e pancreatite) e, ainda, idade de início das alterações fenotípicas (idade de auto percepção) e uso de medicações. Os pacientes foram também caracterizados quanto ao sexo, idade e tipo de mutação do gene *LMNA*.

4.4 AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA

Para avaliação antropométrica foram realizadas medidas de peso, estatura, índice de massa corporal (IMC) [calculado pela fórmula: peso atual (kg) /estatura (m)²], circunferência de segmentos corporais e medidas de pregas cutâneas, abaixo detalhados e conforme descrito previamente na literatura (Weiner 1969).

Circunferência abdominal (CA): a aferição foi realizada utilizando uma fita métrica (não extensível) posicionada no ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca, com o paciente em posição ortostática e durante a expiração.

Circunferência de quadril (CQ): a aferição foi realizada com a fita métrica posicionada horizontalmente, de maneira a circundar todo o quadril, na região de maior perímetro entre a cintura e a coxa.

Relação CA/CQ: foi obtida pela razão da CA pela CQ.

Circunferência cervical (CC): a aferição foi realizada com a fita métrica posicionada no ponto médio entre o osso hióide e o manúbrio, com o paciente sentado e a cabeça em direção ao plano de Frankfurt.

Circunferência da panturrilha (CP): a fita métrica foi posicionada no ponto médio entre o chão e o ponto mais alto da patela (do membro não dominante), com o paciente sentado, joelho flexionado em ângulo de 90° e tornozelo em posição anatômica (com a região plantar totalmente apoiada ao chão).

Circunferência braquial (CB): a fita métrica foi posicionada no ponto médio entre o acrômio e o olecrano do membro não dominante, flexionado em direção ao tórax (em ângulo de 90°). Posteriormente, o braço foi colocado em extensão ao longo do corpo (com a mão voltada para a coxa) e a leitura da circunferência então realizada.

Pregas cutâneas: Foi utilizado adipômetro científico Lange skinfold Capilar Beta Technology Incorporated (Cambridge, Maryland) e as leituras foram realizadas no milímetro mais próximo em cerca de 2 a 3 segundos. Para a análise final, foi considerado o valor médio entre três aferições (Nhanes 2007). Visando minimizar também a variabilidade inter-examinador, as aferições foram feitas por um único profissional, devidamente treinado e experiente. Foram analisadas pregas de 4 diferentes regiões de extremidades (tricipital, bicipital, coxa média e panturrilha) e de 5 regiões de tronco (abdome, suprailíaca, subescapular, peitoral, axilar média):

- **Tricipital:** avaliada no membro não dominante, no mesmo ponto médio utilizado para a aferição da CB. Com o braço relaxado e solto ao lado do corpo, separa-se levemente a prega cutânea do tecido muscular e aplica-se o calibrador formando um ângulo reto.
- **Bicipital:** também avaliada no membro não dominante, um centímetro acima do ponto médio da CB. A palma da mão do paciente é posicionada para fora e, no ponto marcado, a prega é pega verticalmente e, então, aplica-se o calibrador.
- **Coxa média:** realizada com o membro relaxado e paciente em posição ortostática. Marca-se o ponto médio entre a prega inguinal e a borda superior da patela. A prega é levantada verticalmente, sobre o músculo reto da coxa, e aplica-se o calibrador.
- **Panturrilha:** avaliada no membro não dominante, com o paciente sentado, joelho flexionado em ângulo de 90° e tornozelo em posição anatômica (com a região plantar totalmente apoiada ao chão). A prega é pinçada verticalmente no ponto de maior perímetro da perna, onde então aplica-se o calibrador.
- **Abdome:** avaliada a dois centímetros à direita da cicatriz umbilical, onde a prega é, então, pinçada paralelamente ao eixo longitudinal do corpo e aplica-se o calibrador.

- **Suprailíaca:** levanta-se a prega na linha média axilar, mantendo-se o dedo indicador acima da crista ilíaca, na posição diagonal seguindo a linha de clivagem natural da pele (à direita do paciente) e aplica-se o calibrador.
- **Subescapular:** levanta-se a prega um centímetro abaixo do ângulo inferior da escápula, formando um ângulo de 45° com a coluna vertebral. O paciente deve ser posicionado com seus ombros e membros superiores relaxados.
- **Peitoral:** é traçada uma linha entre a axila anterior e o mamilo. A prega é então levantada no seu primeiro terço proximal (para avaliação no sexo feminino) ou no seu ponto médio (para o sexo masculino) e aplica-se o calibrador.
- **Axila média:** a prega é pinçada obliquamente ao eixo longitudinal no ponto de intercessão entre a linha axilar média e o apêndice xifóide do esterno, e aplica-se o calibrador.

4.5 AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO CORPORAL

A composição corporal foi estimada utilizando-se de dois métodos: cálculo da Porcentagem Estimada da Gordura Corporal (EGC%) e bioimpedância (BIA).

Para o cálculo da EGC%, de acordo com a equação de Durin e Womersley (1974), os valores resultantes da somatória de quatro pregas cutâneas (bicipital, tricipital, subescapular e suprailíaca) foram interpretados com base em tabela distribuída por sexo e idade (Durnin; Womersley 1974).

Para a avaliação da composição corporal por BIA elétrica utilizamos o aparelho da BIODYNAMICS BIA 450 (Seattle, Washington). Este método baseia-se no princípio da condutividade elétrica, a qual se difere entre os tecidos e permite assim a estimativa dos compartimentos corporais: os tecidos magros possuem grande quantidade de água e eletrólitos e são altamente condutores de corrente elétrica; já os tecidos gordurosos e ósseos são pobres condutores. Para a realização do exame, os participantes foram admitidos em jejum de 12 horas (inclusive para água) e então posicionados em decúbito dorsal, com membros em paralelo e afastados do tronco. Os eletrodos pletismográficos foram colocados em pontos específicos da mão e pé do lado dominante do paciente. Por meio dos eletrodos distais, foi introduzida uma corrente

imperceptível que é captada pelos eletrodos proximais. Os valores de resistência e reactância obtidos foram utilizados para cálculo dos percentuais de massa magra (MM%), massa gorda (MG%) e de água corporal, conforme previamente descrito (Nih 1996).

4.6 COLETA BASAL DE SANGUE

Os participantes foram orientados a restringir as atividades físicas intensas e ingestão de bebidas alcoólicas nas 48 horas precedentes às coletas e ao jejum de 12 horas. Em mulheres, as coletas foram realizadas independentemente do ciclo menstrual.

A avaliação inicial foi realizada entre às 8:00 e 9:00 horas da manhã, quando foram coletados 10 mL de sangue venoso em tubos heparinizados e sob condições estéreis. Após centrifugação foram separadas três alíquotas: a primeira foi utilizada para dosagens bioquímicas basais, a segunda armazenada a -20°C para posteriores dosagens plasmáticas de cortisol e dexametasona (DEX) e a terceira armazenada a -80°C para dosagens de adipocinas. Sob mesmas condições e no mesmo procedimento, foram ainda coletados 10 ml de sangue em tubo EDTA k2 e imediatamente submetidos ao protocolo de extração de RNA de sangue periférico.

4.7 COLETA DE SALIVA

As coletas de saliva foram realizadas entre às 8:00 e 9:00 horas da manhã, em diferentes etapas conforme o protocolo para teste de supressão com DEX, e às 23 horas (em três diferentes dias) para a análise do ritmo circadiano. Os participantes foram orientados quanto à restrição de atividades físicas intensas nas 48h precedentes às coletas.

A cavidade oral foi previamente limpa com água filtrada e as amostras de saliva (1 mL) foram coletadas em salivetes por salivação direta durante 15 minutos. Para as coletas noturnas, realizadas em domicílio, os participantes receberam previamente os salivetes e as instruções quanto às técnicas de coleta.

As amostras foram centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante separado e estocado a -20°C para posterior dosagem de cortisol basal livre na saliva (Santiago; Jorge; Moreira 1996).

4.8 TESTE DE SUPRESSÃO COM DEXAMETASONA (DEX)

Amostras de sangue e de saliva foram coletadas entre 8:00 e 9:00 horas da manhã (coleta basal). Às 23:00 horas, do mesmo dia, foi administrada a dose de DEX, via oral. Na manhã do dia seguinte, entre às 8:00 e 9:00 horas, foram coletadas novas amostras de sangue e saliva. O teste de supressão com DEX foi realizado com três diferentes doses (0,25; 0,50 e 1,0 mg) administradas, de forma randomizada, em intervalos mínimos de duas semanas entre cada dose. As respectivas doses da medicação foram fornecidas aos participantes a cada coleta.

Como critérios de supressão do eixo HPA, consideramos a diminuição das concentrações de cortisol plasmático para valores inferiores a 1,8 ug/dL (50 nmol/L) (Huizenga et al. 1998) e o cortisol salivar para valores inferiores a 92 ng/dl (2.6 nmol/L), valor que corresponde ao valor mais alto do cortisol salivar pós 1 mg de DEX encontrado em indivíduos normais, conforme demonstrado previamente por nosso grupo (Castro et al. 1999).

4.9 DOSAGENS DOS HORMÔNIOS ESTERÓIDES

4.9.1 Determinação de Cortisol Plasmático

O cortisol plasmático foi determinado por radioimunoensaio (RIA), conforme previamente descrito (Vieira et al. 1984; Castro et al. 1999). As amostras foram dosadas em duplicatas de 50 µL e as amostras de um mesmo indivíduo dosadas no mesmo ensaio. O plasma foi previamente diluído com tampão fosfato gelatina (fosfato 0,01M; gelatina 0,1%), com 11% de metanol e colocado em banho Maria a 60°C durante 1 hora, para degradação das CBG que são imunes ao anticorpo. O anticorpo anticortisol

– 3 oxima – albumina bovina (ANTI-F; F79-I - 20/9), produzido em coelho, foi fornecido pelo Prof. Dr. José Gilberto H. Vieira, da Escola Paulista de Medicina (UNIFESP). Foi utilizado como hormônio marcado a hidrocortisona 1,2,6,7 ^3H (N) (NET396001MC Dupont). Na separação das frações livres do excesso do hormônio marcado, foi utilizada solução de carvão - dextran (1% e 0,1%, respectivamente). As amostras foram dosadas em duplicata e a leitura foi realizada em contador β . O coeficiente de variação intra-ensaio foi 2,1% e o coeficiente de variação entre - ensaios foi 6,9 % ao nível do ponto médio da curva-padrão. A dose mínima detectável foi de 0,24 $\mu\text{g/dl}$ ou 6,6 nmol/L.

4.9.2 Determinação de Cortisol Livre na Saliva

O cortisol salivar foi determinado pelo método direto de RIA, sem extração ou diluição prévia da saliva (Vieira et al. 1984; Castro et al. 1999). As amostras foram dosadas em duplicatas de 25 μL e as amostras de um mesmo indivíduo foram dosadas no mesmo ensaio. A curva padrão foi construída a partir de uma solução de 1000 pg / 0,1ml, seguida de diluições ao meio (1000 pg/0,1ml até 15,6). O anticorpo utilizado foi ANTI CORTISOL F 79-I – 20/9; EPM, fornecido pelo Prof. Dr. José Gilberto H. Vieira, da UNIFESP. Foi utilizado como hormônio marcado a hidrocortisona 1,2,6,7 ^3H (N) (NET396001MC Dupont). Para a separação do excesso de hormônio marcado da fração livre ao das ligadas, foi utilizada solução de carvão – dextran (1% e 0,1%, respectivamente). A leitura foi realizada em contador β . Os coeficientes de variação intra-ensaio foi 5,9% e entre - ensaios foi 12,9%. A dose mínima detectável foi de 62,4 ng/dl ou 1,74 nmol/L.

4.9.3 Determinação de DEX Plasmática

A DEX plasmática foi determinada através de método direto de RIA, sem extração prévia do plasma. As amostras de plasma foram dosadas em duplicatas de 50 μL e as amostras de um mesmo indivíduo foram dosadas no mesmo ensaio. A curva padrão foi construída a partir de uma solução estoque de 100ng/mL de DEX (*Dexamethasone*, Sigma cat n o D-1756), cedida pelo Prof. Dr. José Gilberto Henriques

Vieira da UNIFESP, seguida de diluições ao meio (2000 ng/dL até 15,6 ng/dL) e sendo utilizado soro humano livre de DEX. Foi utilizado um anticorpo policlonal produzido em coelhos imunizados com 21-acetato de dexametasona (Sigma, ST. Louis, MO, USA), que também foi cedido pelo Prof. Dr. José Gilberto H. Vieira, da UNIFESP. A DEX triciada utilizada foi a DEXAMETHASONE [1,2,4,6,7³H(N)]- NET 1192001MC. Para a separação da fração livre às ligadas, foi utilizada solução de carvão / dextran (1% e 0,1%, respectivamente). O tempo de incubação do ensaio foi de 15 a 20 horas a 4°C. A leitura foi realizada em contador β . Os coeficientes de variação intra- e entre- ensaios foram, respectivamente, 4,0% e 10,8% e a dose mínima detectável foi de 15,6 ng/dL ou 0,4 nmol/L.

4.10 AVALIAÇÃO METABÓLICA

Plasma dos indivíduos foram utilizados para dosagem de hemoglobina glicosilada (HbA1c), glicemia de jejum, colesterol total (CT), HDL-c, triglicérides (TG), ácido úrico, uréia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT). A HbA1c foi mensurada por High Performance Liquid Chromatography (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). A glicemia e concentrações plasmáticas de CT, TG, ácido úrico, creatinina e transaminases hepáticas (AST e ALT) foram mensuradas por métodos enzimáticos de espectrofotometria (Thermo Fisher Scientific Oy Ratastie 2, Vantaa, FI). A concentração plasmática de HDL-c foi mensurada por método colorimétrico sem precipitação (Thermo Fisher Scientific Oy Ratastie 2, Vantaa, FI). A concentração plasmática de LDL-c foi calculada segundo fórmula de Friedewald et al. (1972), quando valores de TG menores que 400 mg/dL: [LDL-c= Colesterol total - (triglicérides/5 + HDL-c)].

Os valores considerados adequados foram os adotados pelos respectivos Kits ut: glicemia de jejum: < 100mg/dl; CT: < 200 mg/dl; HDL-c: > 45 mg/dl (sexo feminino) e > 35 mg/dl (sexo masculino); LDL-c: < 130 mg/dl e TG: < 150 mg/dl.

4.11 DOSAGENS PLASMÁTICAS DE INSULINA E ADIPOCINAS

As dosagens plasmáticas de insulina, adiponectina, leptina, fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucinas (IL-1 β , IL-6 e IL-10) e proteína quimiostática de macrófago (MCP-1) foram realizadas por tecnologia Multiplex, de acordo com a metodologia descrita pelo fabricante, utilizando Kits Milliplex (Merck) com painéis específicos: HADK1MAG-61K-01 (ADIPONECTIN), HADK2MAG-61K-06 (LEPTIN, TNF- α , IL-1 β , IL-6, INSULIN, MCP-1) e HCYTOMAG-60K-01 (IL-10).

A insulina e a glicemia de jejum foram utilizadas para o cálculo do índice HOMA (Modelo de Avaliação da Homeostase) e do QUICKI (Índice Quantitativo de Verificação da Sensibilidade Insulínica). O índice HOMA é um modelo matemático para determinação do grau de resistência à insulina, descrito em 1985 por David Matthews (Matthews et al. 1985). O método QUICKI é um modelo utilizado para a quantificação da sensibilidade à insulina (Katz et al. 2000). Ambos os métodos, HOMA e QUICKI, apresentam boas correlações quando comparados aos resultados do *clamp* hiperinsulinêmico euglicêmico, método considerado “padrão-ouro” tanto para a avaliação da RI quanto da sensibilidade insulínica (DeFronzo; Tobin; Andres 1979). As fórmulas utilizadas estão descritas abaixo.

HOMA =	$\frac{\text{Glicemia de Jejum (mmol/l)} \times \text{Insulina Basal (\mu U/ml)}}{22,5}$
--------	--

QUICKI =	$\frac{1}{[\log(\text{Insulina Basal (\mu U/ml)}) + \log(\text{Glicemia de Jejum (mg/dl)})]}$
----------	---

4.12 ESTUDO MOLECULAR

4.12.1 Extração de DNA e RNA

A extração de DNA e RNA (ácido ribonucléico) celular foi realizada utilizando Trizol Reagent (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) segundo protocolo do fabricante. A integridade das amostras foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo (figura 5). A quantificação das amostras foi estimada através da equação de Beer-Lambert modificada utilizando absorbância em comprimento de onda 260 nm em espectrofotômetro NanoDrop™ 2000/2000c (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware USA). A pureza das amostras foi avaliada usando a razão entre as absorbâncias nos comprimentos de onda 260 nm e 280 nm, sendo consideradas puras amostras de DNA com razão em torno de 1,8 e amostras de RNA com razão próxima a 2,0.

4.12.2 Avaliação da expressão gênica

A transcrição reversa foi realizada pela enzima *MultiScribe* e *kit High capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), em reação contendo: 2,5 µl de 10x Buffer, 1,0 µl de 100nM dNTP, 2,5 µl de 10x RT *primer* randômico, 1,5 µl de MultiScribe a 50U/µl, 12,5 µl de H₂O DEPC e 500 ng de RNA. As reações foram incubadas a 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos e 85°C por 5 segundos, segundo protocolos fornecidos pelo fabricante.

Após a síntese de cDNA, a expressão relativa dos genes em estudo e dos controles endógenos foi avaliada por qPCR método TaqMan® em instrumento 7500 *Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Os ensaios TaqMan® (*Gene Expression Assays*) utilizados para os genes estudados foram: *NR3C1-GRα* (395404Biosystems customized assay), *NR3C1-GRβ* (Hs00354508_m1), *11β-HSD 1* (Hs01547870) e *11β-HSD 2* (Hs00388669). Para controles endógenos foram utilizados *TBP* (código 4326322E) e *GUSB* (código 4326320E).

As reações foram realizadas em duplicata, em placa de 96 poços, incubadas a 95°C por 10 min e a seguir submetidas a 40 ciclos a 95°C por 15s e 60°C por 1 min. A fluorescência foi detectada a cada ciclo, obtendo-se gráfico de variação da fluorescência pelo número de ciclos (*Cycle Number*).

As curvas de amplificação foram visualizadas pelo software *ABI Prism® 7500*, a linha de base estabelecida e o limiar de detecção (*Threshold*) foram ajustados na fase exponencial do gráfico. *Threshold* indica o ponto onde as amostras possuem a mesma intensidade fluorescente, teoricamente correspondente a mesma quantidade de produto de PCR. O *cycle threshold* (Ct), ciclo em que cada curva de amplificação atravessa o limiar, serve como base para comparação entre amostras.

A normalização dos resultados foi realizada pelo cálculo do ΔCt , dado pela subtração do Ct para o gene (alvo) pelo Ct dos genes controle endógeno. A calibração dos resultados foi realizada pelo cálculo do $\Delta\Delta Ct$, obtido pela subtração do ΔCt pelo ΔCt do grupo controle saudável. A expressão do gene nas amostras foi dada pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak; Schmittgen 2001).

4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados foram expressos como média e desvio padrão da média ($X \pm DP$), quando apropriado. O teste de Friedman foi utilizado para avaliar variabilidade individual das concentrações de cortisol plasmático e salivar em condições basais. O teste não paramétrico de Mann Whitney foi utilizado para comparar variáveis contínuas entre os grupos (FPLD2 vs controle; e p.R482W vs p.R644C). O teste exato de Fisher foi utilizado para análise de variáveis qualitativas (categóricas). O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$). Utilizamos o software Prism5 Windows versão 5.04 (GraphPad Software, San Diego, CA).

5 Resultados

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA DOS PACIENTES COM FPLD2

Estudamos 24 indivíduos, pertencentes a 5 famílias diferentes, que apresentavam pelo menos um caso-índice com o diagnóstico clínico de FPLD2, e os avaliamos quanto à presença de mutações nos éxons 2, 7, 8, 9, 10 e 11 do gene *LMNA*.

A presença da mutação p.R482W c.1444C>T (p.Arg482Trp) no éxon 8 do gene *LMNA* foi observada em 14 indivíduos de 4 famílias (Figura 1), e a mutação p.R644C c.1930C>T (p.Arg644Cys) no éxon 11 do gene *LMNA* em 10 indivíduos de única família (Figura 2). Identificamos, ainda, no éxon 7 a variante sinônimo p.D446= (p.Asp446=) na posição no transcrito c.1338T>C cadastrada no dbSNP (SNP data base) como rs505058, cuja frequência descrita é de 0,2, de acordo com o 1000 Genomes Project data base (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects>).

Figura 1 - Representação cromatográfica da mutação c.1444C>T (p.R482W) do exon 8 do gene *LMNA*.

Em (a) observa-se a sequência nativa do códon 482 do gene *LMNA* (CGG) em indivíduo controle. Em (b) observa-se a mutação c.1444C>T (p.R482W) do exon 8 do gene *LMNA* em heterozigose no caso-índice.

Figura 2 - Representação cromatográfica da mutação c.1930C>T (p.R644C) do exon 11 do gene *LMNA*.

Em (a) observa-se a sequência nativa do códon 644 do gene *LMNA* (CGC) em indivíduo controle. Em (b) observa-se a mutação c.1930C>T (p.R644C) do exon 11 do gene *LMNA* em heterozigose no caso-índice.

O grupo controle foi constituído por 24 indivíduos saudáveis pareados quanto à idade, sexo e IMC. Seis destes indivíduos eram familiares dos portadores de FPLD2, porém não portadores de mutação no gene *LMNA* e não apresentavam qualquer sinal de lipodistrofia ou das demais anormalidades endócrino-metabólicas, conforme os critérios de inclusão para grupo controle.

A Tabela 1 apresenta os dados clínicos dos portadores de FPLD2 quanto ao sexo, idade atual, idade da auto-percepção de mudanças físicas características da FPLD2, idade ao diagnóstico da FPLD2, tipo de mutação, além de outras características perceptíveis ao exame clínico, como redução de tecido adiposo em membros, adiposidade em face e submento, flebomegalia e *acantose nígricans*.

Tabela 1 - Dados clínicos, fenotípicos e genotípicos de portadores de Lipodistrofia Familiar Parcial tipo 2.

Paciente (família)	Sexo	Idade (anos)			Adiposidade face / mento	Lipoatrofia		Flebo- megalia	Acantose nigricans	Mutação LMNA
		atual	auto percepção do fenótipo	ao diagnóstico		extremidades				
						inferiores	superiores			
1 (I)	F	34	10	22	intenso	intenso	intenso	sim	sim	p.R482W
2 (I)	F	48	13	39	leve	intenso	intenso	sim	sim	p.R482W
3 (I)	F	57	20	44	intenso	intenso	moderado	sim	não	p.R482W
4 (I)	F	16	11	03	moderado	intenso	intenso	sim	não	p.R482W
5 (I)	F	46	13	38	leve	intenso	intenso	sim	sim	p.R482W
6 (I)	F	16	14	15	não	intenso	intenso	sim	sim	p.R482W
7 (I)	M	28	19	27	intenso	intenso	moderado	não	sim	p.R482W
8 (II)	F	58	19	50	intenso	intenso	intenso	sim	não	p.R482W
9 (II)	F	21	14	15	intenso	intenso	moderado	sim	não	p.R482W
10 (III)	F	62	14	34	intenso	intenso	intenso	sim	sim	p.R482W
11 (III)	F	55	ND	ND	intenso	intenso	intenso	sim	sim	p.R482W
12 (IV)	F	48	ND	17	intenso	intenso	intenso	sim	não	p.R482W
13 (IV)	F	30	12	05	intenso	intenso	intenso	sim	não	p.R482W
14 (IV)	F	22	ND	03	intenso	intenso	intenso	sim	não	p.R482W
15 (V)	F	46	23	40	intenso	intenso	leve	sim	não	p.R644C
16 (V)	F	44	20	44	intenso	moderado	não	não	sim	p.R644C
17 (V)	F	47	42	47	moderado	intenso	moderado	sim	não	p.R644C
18 (V)	M	43	30	43	não	intenso	intenso	não	não	p.R644C
19 (V)	M	41	ND	41	moderado	intenso	leve	não	sim	p.R644C
20 (V)	M	28	ND	27	não	intenso	leve	não	não	p.R644C
21 (V)	M	33	ND	33	não	leve	moderado	não	não	p.R644C
22 (V)	M	26	18	26	não	leve	intenso	não	não	p.R644C
23 (V)	F	20	ND	20	moderado	leve	não	não	sim	p.R644C
24 (V)	F	38	35	38	leve	moderado	não	não	não	p.R644C

F: feminino; M: masculino; ND: dado não disponível.

Entre os 24 portadores de FPLD2 estudados, 18 são do sexo feminino (13 portadoras de mutação p.R482W e 5 portadoras da mutação p.R644C) e 6 do sexo masculino (1 portador da mutação p.R482W e 5 portadores da mutação p.R644C). Observamos que 10 indivíduos (71%) dos 14 portadores da mutação p.R482W apresentaram um fenótipo típico, com intensa redução de tecido adiposo subcutâneo em membros inferiores e ou superiores, com aspecto de hipertrofia muscular e flebomegalia, e ainda evidente adiposidade em região de face, submento e fossa clavicular. Nos indivíduos do sexo feminino, observamos também adiposidade em região do púbis e genitália. Entre os portadores da mutação p.R644C, observamos um fenótipo heterogêneo com características menos evidentes e apenas 1 indivíduo (10%) apresentou o fenótipo típico.

Para a classificação do fenótipo como típico, consideramos a presença de lipoatrofia evidente em no mínimo um dos segmentos corporais de extremidade (inferiores e ou superiores) associada à intensa adiposidade em face/mento. Adicionalmente, por meio da avaliação subjetiva de auto percepção dos sintomas, observamos que estas alterações fenotípicas foram mais precocemente percebidas pelos portadores da mutação p.R482W em comparação aos portadores da mutação p.R644C ($14,4 \pm 3,23$ vs $28 \pm 9,35$ anos, $p < 0,001$), os quais também apresentaram maior ocorrência de flebomegalia ($p < 0,001$), porém sem diferença quanto à presença de *acantose nigricans* ($p = 0,4$).

Avaliamos os pacientes com FPLD2 também quanto à presença de comorbidades associadas, tais como DM2, hipertrigliceridemia, baixos níveis de HDL-c, HAS, DHGNA e pancreatite (Tabela 2). Aquelas mais frequentes nos portadores de FPLD2 foram respectivamente: baixas concentrações de HDL-c (75%), hipertrigliceridemia (67%) e DM2 (50%).

Os níveis baixos de HDL-c foram identificados em 13 (92,8%) dos 14 portadores da mutação p.R482W e em 5 (50%) dos 10 portadores da mutação p.R644C. A hipertrigliceridemia foi observada em 12 (85,7%) dos 14 portadores da mutação p.R482W (sendo que 6 destes pacientes já estavam em tratamento prévio com fibratos e ou estatinas) e em 4 (40%) dos 10 portadores da mutação p.R644C (2 destes também já estavam em tratamento prévio). Portanto, os portadores da mutação p.R482W apresentaram maior prevalência de hipertrigliceridemia ($p = 0,03$) e de baixas concentrações de HDL-c ($p = 0,05$) e em comparação ao grupo da mutação p.R644C (Tabela 2).

Tabela 2 - Prevalência de comorbidades em pacientes com Lipodistrofia Familiar Parcial tipo 2 (FPLD2) portadores das mutações p.R482W e p.R644C no gene *LMNA*.

Comorbidades	FPLD2			p
	Total (n:24)	p.R482W (n:14)	p.R644C (n:10)	
Baixos níveis de HDL-c	18 (75%)	13 (93%)	5 (50%)	0,05
Hipertrigliceridemia	16 (67%)	12 (86%)	4 (40%)	0,03
DHGNA	10 (42%)	8 (57%)	2 (20%)	0,09
DM2	12 (50%)	9 (64%)	3 (30%)	0,2
HAS	8 (33%)	7 (50%)	1 (10%)	0,08
Pancreatite	2 (8%)	1 (7%)	1 (10%)	1,00

DM2: Diabetes Melitus tipo 2; HAS Hipertensão Arterial Sistêmica; HDL-c: colesterol de lipoproteína de alta densidade; LDL-c: colesterol de lipoproteína de baixa densidade; DHGNA: Doença hepática gordurosa não alcoólica;

A presença de DM2 foi identificada em 9 (64,2%) dos 14 portadores da mutação p.R482W, sendo que 8 destes indivíduos faziam uso de anti diabéticos orais (Metformina e ou Pioglitazona) e 6 deles já com insulino terapia associada (dose média $1,75 \pm 1,0$ UI/ kg). Entre os 10 portadores da mutação p.R644C, 3 (30%) indivíduos apresentavam o diagnóstico prévio de DM2 e apenas um estava em insulino terapia (dose 1,6 UI/Kg de peso). Não houve diferença quanto à prevalência de DM2 entre os grupos de portadores da mutação p.R482W e p.R644C ($p=0,2$) (Tabela 2).

DHGNA e HAS foram identificadas, respectivamente, em 50% e 61,5% dos portadores da mutação p.R482W e em 10% e 20% dos portadores da mutação p.R644C. Houve tendência a maior prevalência de DHGNA ($p=0,09$) e de HAS ($p=0,08$) entre os portadores da mutação p.R482W.

Quando comparamos a existência de comorbidades entre os gêneros, identificamos que as mulheres portadoras de FPLD2 apresentaram maior prevalência de DHGNA (10 mulheres / 0 homens; $p=0,02$) e também tendência a maior prevalência de HAS (8 mulheres / 0 homens; $p=0,07$) em comparação aos homens. Não houve diferença entre gêneros quanto à prevalência de baixas

concentrações de HDL-c (15 mulheres / 3 homens; $p=0,1$), hipertrigliceridemia (14 mulheres / 2 homens; $p=0,1$) e DM2 (11 mulheres / 1 homem; $p=0,1$).

Pancreatite ocorreu em um paciente do grupo p.R482W (7,1%) e em um paciente do grupo p.R644C (10%). Outras comorbidades identificadas foram: hipotireoidismo (1 paciente), hipertireoidismo (1 paciente), miopatia (1 paciente), macroprolactinoma (1 paciente), pólipos gástricos (2 pacientes), e oligospermia (2 pacientes).

5.2 DADOS ANTROPOMÉTRICOS E DE COMPOSIÇÃO CORPORAL

A tabela 3 apresenta as características antropométricas ($X \pm DP$) de peso, altura, IMC, circunferências corporais, pregas cutâneas (P_c) e composição corporal avaliada pelo cálculo da EGC% e por BIA de indivíduos controles saudáveis e de portadores de FPLD2. A tabela 3 apresenta ainda esses mesmos parâmetros nos subgrupos dos portadores das mutações p.R482W e p.R644C do gene *LMNA*. Os dados individuais dos grupos FPLD2 e controle estão apresentados no anexo 1 e 2, respectivamente.

Entre os 24 portadores de FPLD2, 13 indivíduos apresentaram sobrepeso ($24,9 < \text{IMC} < 29,9 \text{ kg/m}^2$) e os demais estavam com IMC normal ($18,5 \leq \text{IMC} < 25 \text{ kg/m}^2$). Entre os 24 participantes do grupo controle, 9 indivíduos apresentaram sobrepeso, 1 obesidade ($\text{IMC} > 29,9 \text{ kg/m}^2$) e os demais eutróficos. Não houve diferença de idade, peso, estatura e IMC entre os grupos de portadores de FPLD2 e controle.

Tabela 3 - Características antropométricas e de composição corporal de indivíduos do grupo controle e dos portadores da Lipodistrofia Familiar Parcial tipo 2 (FPLD2) com mutação p.R482W e p.R644C no gene *LMNA*.

	Controle	FPLD2	p	FPLD2		p
				p.R482W	p.R644C	
Sexo	18 F : 6 M	18 F : 6 M		13 F : 1 M	5 F : 5 M	
Idade (anos)	38,7 ± 11,2	37,8 ± 13,8	0,7	37,7 ± 16,6	36,6 ± 9,3	0,7
Peso (kg)	65,6 ± 12	64,4 ± 10	0,7	62,3 ± 9	68 ± 10	0,1
Estatura (m)	1,65 ± 0,1	1,6 ± 0,07	0,1	1,61 ± 0,05	1,59 ± 0,1	0,04
IMC (kg/m²)	23,9 ± 3	24,9 ± 3	0,2	24 ± 3,06	26,6 ± 2,4	0,01
Circunferências						
(cm)						
CA	79 ± 9	85,7 ± 7	0,008	83,2 ± 8	88,9 ± 4	0,1
CQ	100 ± 5	93 ± 7	<0,0007	91,3 ± 7	95,5 ± 6	0,05
CA/CQ	0,78 ± 0,08	0,93 ± 0,08	<0,0001	0,9 ± 0,07	0,95 ± 0,07	0,2
CC	33 ± 3	39,7 ± 4	<0,0001	39,6 ± 4	38,4 ± 2	0,2
CP	34 ± 2	33 ± 3	0,2	32,6 ± 2	33,2 ± 3	0,6
CB	29 ± 3	30 ± 5	0,8	26,7 ± 3	33,9 ± 4	<0,001
Pregas cutâneas						
(mm)						
>Tronco						
Peitoral	17,9 ± 8	17,6 ± 9	0,8	12,1 ± 8	23,6 ± 6	<0,001
Axilar	18,3 ± 11	17,6 ± 10	0,9	10,7 ± 5	23,1 ± 9	<0,001
Abdominal	25 ± 8,4	19,7 ± 9	0,1	14,4 ± 9	26,1 ± 4	0,01
Subescapular	16,9 ± 7	20,6 ± 8	0,2	18,7 ± 9	22,8 ± 7	0,1
Suprailíaca	21,4 ± 12	16,6 ± 10	0,2	8,8 ± 5	25,1 ± 8	<0,001
>Extremidades						
Bicipital	9,8 ± 6	6,3 ± 5	0,06	3 ± 2	10,3 ± 6	<0,001
Tricipital	19 ± 8	9,9 ± 7,4	0,001	5,1 ± 3	15,7 ± 7	<0,001
Coxa média	32,3 ± 15	8,2 ± 5	<0,0001	4,4 ± 0,7	12,3 ± 5	0,02
Panturrilha	20,9 ± 8	4,4 ± 3	<0,0001	2,5 ± 2	6,8 ± 3	0,007
Composição corporal (%)						
EGC *	29,4 ± 9	26,8 ± 6,7	0,2	24 ± 4	30,1 ± 8	0,1
Massa gorda **	29 ± 8	24 ± 5	0,01	22 ± 4	26,7 ± 4	0,02
Massa magra **	70 ± 8	76 ± 5	0,01	77,9 ± 4	73,2 ± 4	0,02

Dados em média e desvio padrão (X ± SD); F: feminino; M: masculino; IMC: índice massa corporal; CA: circunferência abdominal; CQ: circunferência quadril; CC: circunferência cervical; CP: circunferência de panturrilha; CB: circunferência braquial; CA/CQ: relação circunferência abdominal / circunferência quadril; EGC Estimativa de Gordura Corporal; *Avaliação por Σ das pregas Tricipital, Bicipital, Subescapular e Suprailíaca (Durnin e Womersley, 1974) **Avaliação por bioimpedância.

Os portadores de FPLD2, em comparação ao grupo controle, apresentaram maiores valores de CA ($p=0,01$), CA/CQ ($p<0,0001$), CC ($p<0,0001$) e MM% ($p=0,01$); apresentaram ainda menores medidas de CQ ($p=0,001$), Pc tricipital ($p=0,001$), Pc de coxa média ($p<0,0001$), Pc de panturrilha ($p<0,0001$) e MG% ($p=0,01$), com tendência a menor Pc bicipital ($p=0,06$). Não houve diferença quanto aos valores de CP, CB, EGC e das demais pregas cutâneas (axilar, peitoral, subescapular, abdominal, suprailíaca) entre o grupo FPLD2 e o grupo controle.

Considerando que os parâmetros antropométricos e de composição corporal estão sujeitos a variações entre os gêneros, optamos por analisar as mesmas variáveis entre os portadores de FPLD2 e os indivíduos controles de acordo com o sexo. Observamos que as mulheres do grupo FPLD2, em comparação às do grupo controle, apresentaram maiores medidas de CA ($p=0,03$), CA/CQ ($p<0,0001$), CC ($p<0,0001$) e MM% ($p=0,001$) e menores valores de CQ ($p<0,0001$), MG% ($p=0,001$), Pc bicipital ($p=0,02$), Pc tricipital ($p=0,001$), Pc abdominal ($p=0,04$), Pc suprailíaca ($p=0,03$), Pc de coxa média ($p<0,0001$) e Pc de panturrilha ($p<0,0001$); ainda, apresentavam tendência a menores valores de EGC% ($p=0,05$). Não houve diferença entre IMC, CP, CB e demais pregas cutâneas entre as mulheres de ambos os grupos. Entre os indivíduos do sexo masculino, os portadores de FPLD2 apresentaram menor estatura ($p=0,03$) e menor Pc de panturrilha ($p=0,03$); ainda, tendência a maior CB ($p=0,08$) e a maiores pregas em região subescapular ($p=0,08$) e peitoral ($p=0,09$) em comparação ao grupo controle. Não houve diferença entre idade, peso, IMC, CA, CQ, CA/CQ, CC, CP, MG%, EGC e de demais pregas cutâneas entre homens portadores de FPLD2 e controles (dados não apresentados em tabela).

Visando avaliar a possibilidade de heterogeneidade fenotípica entre os pacientes com FPLD2, analisamos os mesmos parâmetros antropométricos entre os portadores das duas diferentes mutações. Os portadores da mutação p.R482W, em comparação aos portadores da p.R644C, apresentaram maior estatura ($p=0,04$) e MM% ($p=0,02$), menor IMC ($p=0,01$), CB ($p<0,001$), CQ ($p=0,05$), MG% ($p=0,02$) e maior acometimento de pregas cutâneas em oito de nove locais avaliados: bicipital ($p<0,001$), tricipital ($p<0,001$), axilar ($p<0,001$), peitoral ($p<0,001$), abdominal ($p=0,01$), suprailíaca ($p<0,001$), coxa média ($p=0,02$) e panturrilha ($p=0,007$). Não observamos diferenças de idade, peso, CA, CA/CQ, CC, CP, CB, Pc subescapular e EGC% entre os dois subgrupos de mutações (Tabela 3).

A análise por gênero revelou que as mulheres portadoras da mutação p.R482W, em comparação às portadoras da p.R644C, apresentaram maior estatura ($p=0,006$) e MM% ($p=0,008$) e menor IMC ($p=0,02$), MG% ($p=0,008$), EGC (0,003), CB ($p=0,004$); ainda, menores medidas de pregas cutâneas em sete de oito locais avaliados [bicipital ($p=0,002$), tricipital ($p=0,002$), axilar ($p=0,009$), peitoral ($p=0,004$), sub escapular ($p=0,02$), abdominal ($p=0,02$), suprailíaca ($p=0,004$) e coxa media ($p=0,06$)]. Não houve diferença de idade, peso, demais circunferências e prega de panturrilha entre as mulheres com as diferentes mutações. A análise comparativa entre os indivíduos do sexo masculino não foi possível, visto que entre os portadores da mutação p.R482W há apenas um indivíduo do gênero (dados não apresentados em tabela).

Observamos correlação entre a porcentagem de gordura corporal estimada pela somatória das pregas cutâneas e a porcentagem de gordura mensurada pela BIA, tanto para o grupo controle (A) quanto para os portadores de FPLD2 (B) (Figura 3).

Figura 3 - Correlação entre a porcentagem estimada de gordura corporal (EGC%), calculada pela somatória das pregas cutâneas, e a porcentagem de gordura corporal (MG%), mensurada pela bioimpedância, em indivíduos do grupo controle (A) e em portadores de Lipodistrofia Parcial (B).

5.3 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA E ANÁLISE DE ADIPOCINAS

A Tabela 4 apresenta os valores ($X \pm DP$) de HbA1c, glicemia de jejum, insulina, HOMA, CT, HDL-c, LDL-c, TG, ácido úrico, AST, ALT e creatinina dos portadores de FPLD2 e dos controles saudáveis. Os resultados individuais da avaliação bioquímica dos portadores de FPLD2 e dos controles estão apresentados nos anexos 3 e 4, respectivamente.

Tabela 4 - Dados bioquímicos de indivíduos do grupo controle e dos portadores da Lipodistrofia Familiar Parcial tipo 2 (FPLD2) com mutação p.R482W e p.R644C no gene *LMNA*.

	Controle	FPLD2	p	FPLD2		p
				p.R482W	p.R644C	
Glicemia de jejum (mg/dl)	82 $\pm$ 6	106 $\pm$ 34	0,02	113 $\pm$ 39	95 $\pm$ 22	0,3
HbA1c (%)	5,5 $\pm$ 0,4	7,3 $\pm$ 2,1	0,001	7,7 $\pm$ 2,4	6,7 $\pm$ 1,4	0,4
Insulina (mUI/ml)	15,5 $\pm$ 12	54,8 $\pm$ 39	<0,0001	67 $\pm$ 37	37,7 $\pm$ 36	0,02
HOMA	3,2 $\pm$ 2,7	14,8 $\pm$ 12,4	<0,0001	18,4 $\pm$ 12	9,8 $\pm$ 11	0,02
QUICKI	0,33 $\pm$ 0,03	0,28 $\pm$ 0,03	<0,0001	0,26 $\pm$ 0,02	0,3 $\pm$ 0,04	0,02
Colesterol total (mg/dl)	182 $\pm$ 24	194 $\pm$ 53	0,9	201 $\pm$ 60	182 $\pm$ 42	0,4
HDL-c (mg/dl)	56 $\pm$ 17	39 $\pm$ 9	0,0004	37 $\pm$ 9	43 $\pm$ 7	0,08
LDL-c (mg/dl)	108 $\pm$ 23	104 $\pm$ 30	0,5	102 $\pm$ 34	107 $\pm$ 26	0,6
TGL (mg/dl)	83 $\pm$ 36	370 $\pm$ 768	<0,0001	504 $\pm$ 968	161 $\pm$ 125	0,03
Ácido úrico (mg/dl)	4 $\pm$ 1	6 $\pm$ 5	0,02	7,5 $\pm$ 7	5 $\pm$ 1	0,5
AST (mg/dl)	22 $\pm$ 6	33 $\pm$ 18	0,03	35 $\pm$ 22	30 $\pm$ 7	0,9
ALT (mg/dl)	22 $\pm$ 9	43 $\pm$ 39	0,005	47 $\pm$ 49	36 $\pm$ 8	0,6
Creatinina (mg/dl)	0,88 $\pm$ 0,1	0,89 $\pm$ 0,2	0,9	0,8 $\pm$ 0,1	1 $\pm$ 0,2	0,04

Dados em média e desvio padrão ($X \pm SD$). HbA1c: hemoglobina glicosilada; HOMA: Modelo de Avaliação da Homeostase; QUICKI: Índice Quantitativo da Sensibilidade Insulínica; HDL-c: colesterol de lipoproteína de alta densidade; LDL-c: colesterol de lipoproteína de baixa densidade; AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase.

Os portadores de FPLD2, em comparação aos indivíduos do grupo controle, apresentaram maiores concentrações plasmáticas de HbA1c ($p=0,001$), glicemia de jejum ($p=0,02$), insulina ($p<0,0001$), HOMA ($P<0,0001$), TG ($p<0,0001$), ácido úrico ($p=0,02$), AST ($p=0,03$) e ALT ($p=0,005$); e menores concentrações de HDL-c ($p=0,0004$). Não houve diferença quanto aos níveis de CT, LDL-c e creatinina sérica entre os grupos de portadores de FPLD2 e controles.

Identificamos ainda, que entre os portadores de FPLD2, aqueles com a mutação p.R482W apresentaram maiores concentrações plasmáticas de insulina ($p=0,02$), HOMA ($p=0,02$) e TG ($p=0,03$) e ainda tendência a menores concentrações de HDL-c ($p=0,08$) em comparação aos portadores da mutação p.R644C. Estes, no entanto, apresentaram níveis de creatinina sérica mais elevados ($p=0,04$) em comparação aos portadores da p.R482W. E não houve diferença entre os valores de HbA1c, glicemia de jejum, CT, LDL-c, ácido úrico, AST e ALT entre ambos os subgrupos das mutações.

A Tabela 5 apresenta os valores ($X \pm DP$) das dosagens plasmáticas de adiponectina, leptina, TNF- α , IL-1 β , IL-6, MCP-1 e IL-10 dos portadores de FPLD2 e dos indivíduos do grupo controle. Os resultados individuais destes parâmetros em portadores de FPLD2 e controles estão apresentados nos anexos 5 e 6, respectivamente.

Tabela 5 - Dosagens de adipocinas e citocinas plasmáticas de indivíduos do grupo controle e dos portadores da Lipodistrofia Familiar Parcial tipo 2 (FPLD2) com mutação p.R482W e p.R644C no gene *LMNA*.

	Controle	FPLD2	<i>p</i>	FPLD2		
				p. R482W	p.R644C	<i>p</i>
<u>Adipocinas (ng/ml)</u>						
Adiponectina	48,5 ± 19	27,7 ± 16	0,0002	30,6 ± 18	23,6 ± 14	0,2
Leptina	18,3 ± 15	9 ± 8	0,03	7,6 ± 6	11 ± 10	0,57
<u>Citocinas (pg/ml)</u>						
TNFα	6,8 ± 3	10,9 ± 6	0,001	13 ± 6	8 ± 5	0,02
IL-1β	1,4 ± 1	4,9 ± 8	0,01	6,8 ± 10	2,2 ± 3	0,07
IL-6	2,8 ± 3	8,1 ± 10	0,01	11 ± 12	3,7 ± 5	0,03
MCP-1	556 ± 200	535 ± 237	0,5	616 ± 275	421 ± 100	0,08
IL-10	7,2 ± 4	12,8 ± 9	0,01	14 ± 9	11 ± 8,5	0,3

Dados em média e desvio padrão ($X \pm SD$). TNF: fator de Necrose Tumoral; IL- interleucina; MCP1: proteína quimiostática de monócito

Os portadores de FPLD2, em comparação aos indivíduos do grupo controle, apresentaram maiores concentrações plasmáticas de TNF- α ($p=0,001$), IL-1 β ($p=0,01$), IL-6 ($p=0,01$) e IL-10 ($p=0,01$) e menores concentrações de adiponectina

($p=0,0002$) e leptina ($p=0,03$). Não houve diferença quanto às concentrações de MCP-1.

Observamos ainda que os portadores da mutação p.R482W, em comparação aos portadores da mutação p.R644C, apresentaram maiores concentrações plasmáticas de TNF- α ($p=0,02$) e IL-6 ($p=0,03$) e ainda tendência a maiores concentrações de IL-1 β ($p=0,07$) e MCP-1 ($p=0,08$). Não houve diferença quanto às concentrações de adiponectina, leptina e IL-10 entre os de portadores de FPLD2 com as duas diferentes mutações.

5.4 AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE AOS GLICOCORTICOIDES NO EIXO HPA: CORTISOL PLASMÁTICO E SALIVAR APÓS TESTE DE SUPRESSÃO COM DIFERENTES DOSES DE DEXAMETASONA

A tabela 6 expressa os resultados ($X \pm SD$) das concentrações de cortisol plasmático ($\mu\text{g/dL}$) e cortisol salivar ($\mu\text{g/dL}$) em condições basais e após supressão com diferentes doses de DEX (0,25, 0,5 e 1,0 mg) dos portadores de FPLD2 e dos indivíduos do grupo controle. Não observamos diferenças entre as três amostras basais (tanto do cortisol plasmático, quanto do salivar) e nem entre as três amostras do cortisol salivar noturno de cada indivíduo. Assim, os valores individuais do cortisol basal (plasmático e salivar) e noturno (salivar) foram determinados pela média aritmética das três amostras colhidas nas respectivas situações. Os resultados individuais de todos estes parâmetros, em portadores de FPLD2 e em indivíduos do grupo controle, estão apresentados nos anexos 7 e 8, respectivamente.

Tabela 6 - Concentrações de cortisol plasmático e salivar em condições basais e após supressão com diferentes doses de dexametasona (DEX) em indivíduos do grupo controle e em portadores de Lipodistrofia Familiar Parcial tipo 2 (FPLD2).

	Cortisol Plasmático µg/dL			Cortisol Salivar ng/dL		
	Controle	FPLD2	p	Controle	FPLD2	p
Basal	15 ± 4,4	13,6 ± 5,9	0,1	550 ± 170	512 ± 221	0,3
23 horas	NA	NA		115 ± 55	139 ± 56	0,07
<u>Teste pós DEX</u>						
0,25 mg	5,1 ± 4,8	6,8 ± 6,4	0,6	197 ± 144	250 ± 166	0,3
0,5 mg	0,9 ± 1,4	1,5 ± 1,6	0,09	80 ± 38	111 ± 59	0,04
1,0 mg	0,3 ± 0,27	0,5 ± 0,37	0,1	62,4 ± 0,02	73 ± 22	0,05

Dados em média e desvio padrão (X ± SD). NA: não avaliado.

No teste de supressão com 0,5 mg de DEX, os portadores de FPLD2, em comparação ao grupo controle, apresentaram maiores concentrações do cortisol salivar ($p=0,04$) e tendência a maiores concentrações do cortisol plasmático ($p=0,09$). No teste de supressão com 1 mg de DEX os portadores de FPLD2 também apresentaram tendência a maiores concentrações do cortisol salivar ($p=0,05$) em comparação aos controles. Adicionalmente, observamos tendência a maiores concentrações do cortisol salivar às 23 horas ($p=0,07$) nos portadores de FPLD2. Não houve diferença das concentrações de cortisol (plasmático e salivar) basal e pós 0,25 mg de DEX entre os portadores de FPLD2 e controles (Tabela 6).

A tabela 7 expressa os resultados (X ± SD) das concentrações de cortisol plasmático (µg/dL) e cortisol salivar (µg/dL) em condições basais e após supressão com diferentes doses de DEX (0,25, 0,5 e 1,0 mg) nos subgrupos de portadores de FPLD2 apresentando a mutação p.R482W ou a p.R644C.

Tabela 7 - Concentrações de cortisol plasmático e salivar em condições basais e após supressão com diferentes doses de dexametasona (DEX) nos portadores de Lipodistrofia Familiar Parcial tipo 2 (FPLD2) com mutação p.R482W e p.R644C no gene *LMNA*.

	Cortisol Plasmático µg/dL			Cortisol Salivar ng/dL		
	p.R482W	p.R644C	<i>p</i>	p.R482W	p.R644C	<i>p</i>
Basal	13,8 ± 6,9	13,5 ± 4,5	0,8	556 ± 248	462 ± 166	0,5
23 horas	NA	NA		141 ± 69	138 ± 41	0,6
<u>Teste pós DEX</u>						
0,25 mg	5,7 ± 7,3	8,2 ± 5,3	0,1	202 ± 181	308 ± 135	0,1
0,5 mg	1,8 ± 1,9	1 ± 1,1	0,2	138 ± 66	78,5 ± 27	0,03
1,0 mg	0,6 ± 0,4	0,36 ± 0,2	0,3	63,3 ± 3	82,2 ± 28	0,1

Dados em média e desvio padrão (X ± SD); NA: não avaliado.

Os portadores da mutação p.R482W, em comparação aos portadores da mutação p.R644C, apresentaram maiores concentrações de cortisol salivar pós 0,5 mg de DEX ($p=0,03$). Não houve, contudo, diferença entre as concentrações do cortisol basal, noturno e pós demais doses de DEX (0,25 e 1,0 mg) entre os subgrupos das mutações.

A tabela 8 expressa os resultados (X ± SD) das concentrações de DEX plasmática em condições basais e após supressão com as diferentes doses de DEX (0,25, 0,5 e 1 mg) nos indivíduos saudáveis do grupo controle e portadores de FPLD2.

Tabela 8 - Concentrações de dexametasona plasmática em condições basais e após o teste de supressão com diferentes doses de dexametasona (DEX) nos indivíduos do grupo controle e nos portadores da Lipodistrofia Familiar Parcial tipo 2 (FPLD2) com mutação p.R482W e p.R644C no gene *LMNA*.

	Dexametasona Plasmática (ng/dL)					
	Controle	FPLD2	p	FPLD2		p
				p.R482W	p.R644C	
Basal	16,4 ± 2,7	16,6 ± 1,9	0,2	15,6 ± 0,003	18 ± 4,5	0,2
<u>Teste pós DEX</u>						
0,25 mg	89,5 ± 47	75,2 ± 44	0,3	77,4 ± 31	72,5 ± 58	0,5
0,5 mg	219 ± 97	192 ± 101	0,2	211 ± 94	163 ± 110	0,1
1 mg	511 ± 251	463 ± 176	0,8	440 ± 129	488 ± 217	0,7

Dados em média e desvio padrão (X ± SD).

As concentrações de DEX plasmática basais foram indetectáveis em 88% dos participantes do estudo e os demais indivíduos (12%) apresentaram concentrações muito próximas da dosagem mínima do método. Assim, para efeito de análise estatística, consideramos a dose mínima detectável do método como sendo a concentração basal da DEX nas amostras cujas suas concentrações foram indetectáveis. Não houve diferença das concentrações de DEX plasmática entre as três amostras basais de cada indivíduo e, portanto, a média aritmética entre elas foi considerada para o valor basal de cada indivíduo. Não houve diferença entre as concentrações basais de DEX entre os portadores de FPLD2 e controles. Os níveis de DEX plasmática após cada dose de supressão foram detectáveis em todos os indivíduos estudados, indicando que todos eles ingeriram os tabletes de DEX na dose orientada. Não houve diferença das concentrações de DEX plasmática entre os portadores da FPLD2 e controles em todas as doses de DEX administradas. Também não houve diferença das concentrações de DEX plasmática entre os subgrupos dos portadores da mutação p.R482W e p.R644C.

A administração de doses crescentes de DEX (0,25, 0,50 e 1,0 mg) resultou em aumento das concentrações plasmáticas de DEX em um padrão dose-dependente tanto nos indivíduos do grupo controle quanto nos portadores de FPLD2 (figura 4 (A) (B)). Houve também uma diminuição dose dependente das concentrações de cortisol plasmático e salivar em ambos os grupos: indivíduos controles e portadores de FPLD2 (figura 5 (A) e (B))

Figura 4 - Concentrações plasmáticas de dexametasona em condições basais e após a administração de doses crescentes de dexametasona (0,25; 0,5 e 1,0 mg) nos indivíduos do grupo controle (A) e portadores de Lipodistrofia Familiar Parcial tipo 2 (B).

Figura 5 - Concentração de cortisol plasmático (ug/dl) e salivar (ng/dL) em condições basais e após 0,25, 0,50 e 1,0 mg de dexametasona em indivíduos do grupo controle (A) e nos portadores de Lipodistrofia Familiar Parcial tipo 2 (B).

5.5 AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE AOS GLICOCORTICOIDES EM CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO - EXPRESSÃO GÊNICA

A expressão de cada gene avaliado nas amostras foi dada pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Os resultados da expressão gênica ($X \pm SD$) do *GR α* , *GR β* , *11 β -HSD1* e *11 β -HSD2* em pacientes com FPLD2 portadores das mutações p.R482W ou p.R644C e em controles estão expostos na tabela 9. Os resultados individuais de ambos os grupos estão apresentados nos anexos 9 e 10, respectivamente.

Tabela 9 - Expressão dos genes *GR α* , *GR β* , *11 β -HSD1* e *11 β -HSD2* em células mononucleares de sangue periférico de indivíduos do grupo controle e dos portadores da Lipodistrofia Familiar Parcial tipo 2 (FPLD2) com mutação p.R482W e p.R644C no gene *LMNA*.

EXPRESSÃO GÊNICA						
	Controle	FPLD2	<i>p</i>	FPLD2		
				p.R482W	p.R644C	<i>p</i>
<i>GRα</i>	1,1 $\pm$ 0,5	0,99 $\pm$ 0,5	0,6	1,06 $\pm$ 0,5	0,88 $\pm$ 0,6	0,3
<i>GRβ</i>	9,8 $\pm$ 4,5	1,29 $\pm$ 1,4	0,3	0,99 $\pm$ 0,5	1,7 $\pm$ 2,1	0,6
<i>11β-HSD1</i>	1,6 $\pm$ 1,3	2,2 $\pm$ 2	0,3	1,4 $\pm$ 0,9	3,4 $\pm$ 2,6	0,08
<i>11β-HSD2</i>	0,96 $\pm$ 1,1	0,91 $\pm$ 1,3	0,4	0,5 $\pm$ 0,5	1,4 $\pm$ 1,9	0,8

Dados em média e desvio padrão ($X \pm SD$). Expressão calculada pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Não houve diferença da expressão dos genes *GR α* , *GR β* , *11 β -HSD1* e *11 β -HSD2* entre os portadores de FPLD2 e controles. Observamos tendência a menor expressão do *11 β -HSD1* entre os portadores da mutação p.R482W em comparação aos portadores da mutação p.R644C ($p=0,08$). Porém não houve diferença na expressão dos demais genes (*GR α* , *GR β* e *11 β -HSD2*) entre os portadores das duas diferentes mutações.

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

No presente estudo avaliamos as características clínicas, a composição corporal, os parâmetros metabólicos e a sensibilidade aos GC em 24 portadores de FPLD2, apresentando duas diferentes mutações do gene *LMNA* (p.R482W ou p.R644C). Classicamente, a FPLD2 é considerada uma doença rara e, portanto, ressaltamos a relevância de nossa casuística. Por outro lado, trabalhos recentes têm sugerido um possível viés de sub diagnóstico e, desta forma, a FPLD2 poderia estar associada a uma parcela mais expressiva dos casos de DM2 e de SM diagnosticados na população em geral (Dutour et al. 2011; Vantyghem et al. 2012). Salientamos, portanto, a importância de se ampliar os conhecimentos sobre as manifestações clínicas e os mecanismos envolvidos na fisiopatologia da FPLD2.

Pacientes portadores de FPLD2 apresentaram maior circunferência abdominal e cervical, menor circunferência de quadril e menores medidas de pregas cutâneas em três dos quatro locais avaliados em região de extremidades. A avaliação da composição corporal destes pacientes através da BIA revelou ainda redução da massa gorda corporal e aumento relativo da massa corporal total livre de gordura. Os achados antropométricos e de composição corporal encontrados nos pacientes do presente estudo são compatíveis com os dados classicamente descritos na literatura, desde a caracterização da doença por Dunnigan na década de 70 (Dunnigan et al. 1974) às confirmações posteriores por outros pesquisadores (Haque; Vuitch; Garg 2002; Valerio et al. 2007; Godoy-Matos et al. 2012; Monteiro et al. 2012b; Mory et al. 2012; Valerio et al. 2012). No entanto, atualmente sabe-se que a FPLD2 pode apresentar-se com quadro isolado de lipoatrofia em extremidades, não sendo obrigatórios os achados de aumento da adiposidade em face e mento ou a presença de alterações metabólicas para o seu diagnóstico (Nih 1996; Handelsman et al. 2013).

O perfil bioquímico encontrado em nossos pacientes portadores de FPLD2 foi caracterizado por elevados níveis de glicemia, HbA1c e TG e pelas baixas concentrações de HDL-c. Os elevados valores do HOMA e a redução do QUICKI sugerem ainda RI e diminuição da sensibilidade à insulina. Em conjunto, o perfil centrípeto de distribuição adiposa, a escassez de tecido adiposo em membros inferiores e todos os distúrbios do metabolismo lipídico e glicídico condizem com o

alto risco cardiovascular e morbidade amplamente descritos na FPLD2 (Haque; Vuitch; Garg 2002; Joy et al. 2009; Valerio et al. 2012).

Em nosso estudo, observamos um fenótipo mais grave entre as pacientes do sexo feminino. Esses dados, em concordância com estudos prévios (Garg; Peshock; Fleckenstein 1999; Garg 2000a; Vigouroux et al. 2000; Haque et al. 2003; Hegele et al. 2003), corroboram com a hipótese de influência do gênero sobre as manifestações fenotípicas da FPLD2. Ademais, o processo de degeneração adiposa tem início coincidente ao da puberdade; ainda, o hiperandrogenismo é frequentemente observado entre portadoras da FPLD2; e finalmente, a identificação de acúmulo de receptores androgênicos em cardiomiócitos mutados (Arimura et al. 2013) favorecem a possibilidade de envolvimento dos esteróides sexuais na fisiopatogênese das manifestações da FPLD2.

Embora ambos os sexos sejam igualmente afetados pela mutação no *LMNA*, alguns aspectos clínicos próprios à FPLD2 tornam a suspeita diagnóstica mais facilmente identificável no sexo feminino, como a deposição de gordura em grandes lábios, hirsutismo e anormalidades menstruais (Garg 2000a; Vigouroux et al. 2000). Por outro lado, características próprias do gênero masculino, como a hipertrofia muscular e flebomegalia, podem mascarar sinais típicos da FPLD2 contribuindo, assim, para o subdiagnóstico em homens e um possível viés de análise entre gêneros.

O estudo do gene *LMNA* dos portadores de FPLD2 em questão, revelou duas diferentes mutações: a p.R482W no éxon 8 e a p.R644C no éxon 11. A maioria das mutações do gene *LMNA* na FPLD2 ocorre em *missense* e heterozigose, especialmente no códon 482 do éxon 8, e acometem, portanto, ambas as isoformas da lamina A e C (Hegele et al. 2000a; Speckman et al. 2000).

Em concordância com a literatura, a mutação p.R482W no éxon 8 foi a mais prevalente em nossa série. A mutação p.R644C identificada no éxon 11 acomete apenas a lamina A e, apesar de já ter sido previamente associada à FPLD2 (Rankin et al. 2008), está mais comumente relacionada às formas atípicas de progéria, cardiomiopatia e distúrbios músculo esqueléticos (Mercuri et al. 2005; Rankin et al. 2008). Estudos prévios sugerem ainda que mutações que afetam ambas as laminas A e C estariam relacionadas a um fenótipo mais agressivo (Speckman et al. 2000; Vigouroux et al. 2000; Garg et al. 2001; Mory et al. 2012).

Desta forma, considerando que as mutações identificadas no nosso estudo afetam diferentemente as isoformas da lamina A e C, questionamos qual seria a tradução clínica destas alterações e a possibilidade de heterogeneidade fenotípica. Assim, comparamos os portadores das mutações p.R482W (no éxon 8) e p.R644C (no éxon 11) quanto aos parâmetros clínicos, bioquímicos e perfil inflamatório.

Considerando os parâmetros antropométricos e os distúrbios metabólicos, os portadores da mutação p.R482W apresentaram-se com fenótipo típico e mais grave, enquanto aqueles com a mutação p.R644C apresentaram um fenótipo menos pronunciado ou atípico. Além disso, os sinais e sintomas relacionados à FPLD2 foram percebidos de forma mais precoce pelos pacientes com a mutação p.R482W em comparação à média da idade relatada pelos portadores da p.R644C.

Em concordância com nossos dados, outros autores já haviam correlacionado o fenótipo atípico da FPLD2 com outras mutações no éxon 11 do *LMNA*, como as mutações p.R582C e R582H, reforçando a hipótese de que a intensidade dos sintomas possa estar relacionada ao acometimento ou não da lamina C (Speckman et al. 2000; Garg et al. 2001; Mory et al. 2012). Entretanto, fenótipo atípico já foi também identificado em pacientes com a mutação no éxon 6 do *LMNA* (p.R349W), que acomete ambas as lamina A e C e sugere, portanto, que outros fatores possam estar envolvidos na heterogeneidade das manifestações clínicas da FPLD2 (Mory et al. 2012). Dentre estes, é possível o envolvimento de outras lamina menores, como a lamina C2 e a lamina A delta10, que também são codificadas pelo gene *LMNA* (Dittmer; Misteli 2011).

Os mecanismos exatos pelos quais as mutações no *LMNA* resultam no padrão específico de distribuição adiposa na FPLD2 ainda não são claramente compreendidos, entretanto parecem estar diretamente ligados às perdas tecido específicas de algumas das múltiplas funções da lamina (Dittmer; Misteli 2011). A redistribuição centrípeta do tecido adiposo e os distúrbios metabólicos observados nos portadores de FPLD2 são resultantes tanto da incapacidade dos adipócitos periféricos de manter os estoques de triacilglicerídeos quanto de alterações diretas nas vias de sinalização da insulina e da homeostase lipídica (Bidault et al. 2011). Essas alterações estão associadas ao *downregulation* do *PPAR γ* , secundário aos distúrbios na interação da pré lamina A mutada à proteína ligadora do elemento regulador do esterol - SREBP1c, um fator de transcrição regulador de proteínas relacionadas à homeostase lipídica, à adipogênese e à sensibilidade insulínica

(Lloyd; Trembath; Shackleton 2002). A retenção de SREBP1c no envelope nuclear e o acúmulo da pré-lamina A interferem diretamente nas vias de sinalização insulínica através da interação/retenção do c-Fos e ERK (Vigouroux et al. 2011).

Outro possível mecanismo seria por modulação epigenética. Em células não mutadas, a lamina A inibe a expressão do miR-335, o qual apresenta atividade anti-adipogênica. Essa inibição do miR-335 é fundamental para a expressão adequada de genes adipogênicos e para os processos de proliferação, migração e diferenciação das células mesenquimais multipotentes para linhagens de adipócitos e osteócitos (Elzeneini; Wickström 2017). Na presença da lamina mutada, a capacidade repressora da lamina A sobre o miR-335 está diminuída e, consequentemente, há diminuição da expressão dos genes *PPAR γ* , *CEB PA*, *FABP4*, *KLF5* e *KLF15* e da expressão da proteína Perilipina, responsáveis pelas diferentes fases da adipogênese (Oldenburg et al. 2017).

Observamos ainda importante redução dos níveis plasmáticos de adiponectina e leptina nos portadores de FPLD2 em comparação ao grupo controle, achado consistente com estudos prévios (Hegele et al. 2000a; Hegele et al. 2000b; Haque et al. 2002; Hegele et al. 2003; Mory et al. 2012; Andre et al. 2014). A adiponectina é exclusivamente expressa pelos adipócitos, porém seus níveis plasmáticos declinam com o ganho ponderal e elevam-se com a perda adiposa. Dados anteriores sugerem que os baixos níveis de adiponectina observados nos pacientes com FPLD2 estejam mais relacionados à redistribuição da gordura nos diferentes segmentos corporais e à adiposidade visceral do que à redução absoluta da massa gorda corporal em si (Cnop et al. 2003; Wong et al. 2005).

A maior fração da leptina circulante também é derivada dos adipócitos do TAS, porém guarda fraca relação com a adiposidade visceral. Dessa forma, ainda é incerto se a redução dos níveis de leptina identificada nos pacientes com FPLD2 seja resultante da perda e redistribuição adiposa total ou de outros mecanismos intracelulares secundários à mutação no gene *LMNA* (Hegele 2000). De fato, Vantyghem et al. sugerem que os níveis de leptina tem um bom valor preditivo no diagnóstico de lipodistrofias, especialmente para concentrações inferiores a 10ug/L (Vantyghem et al. 2012).

A deficiência de adiponectina e leptina, certamente, amplifica os efeitos deletérios das alterações metabólicas nos portadores de FPLD2. Além da ação sensibilizadora à insulina em adipócitos e músculo esquelético, a adiponectina tem

efeito anti-inflamatório e anti-apoptótico em diferentes grupos celulares, e sua administração foi acompanhada de melhora da RI em modelos animais lipoatróficos (Yamauchi et al. 2001). A leptina também exerce importante ação sensibilizadora à insulina, estimulando a deposição de ácidos graxos livres nos adipócitos e reduzindo o influxo e oxidação destes em tecidos hepático e músculo.

A leptina recombinante tem se mostrado promissora no tratamento de primeira escolha nas formas de lipodistrofias generalizadas, com o intuito de prevenção de comorbidades em crianças. O seu uso tem sido preconizado também nas formas parciais em pacientes hipoleptinêmicos e com alterações metabólicas graves. Estudos preliminares indicam melhora do controle glicêmico, da sensibilidade à insulina e dos níveis de TG, especialmente se níveis de leptina abaixo de 4 ng/ml, HbA1c superior a 8% e TG superior a 500 mg/dl (Park et al. 2007; Diker-Cohen et al. 2015; Brown et al. 2016; Vatier et al. 2016). Contudo, considerando peculiaridades fenotípicas decorrentes das diferentes mutações no *LMNA*, não se sabe se portadores da FPLD2 com mutações que afetam a lamina A ou as laminae A e C possam ter respostas distintas ao tratamento com a metreleptina (Polyzos; Mantzoros 2017).

Os portadores de FPLD2 do presente estudo apresentaram ainda um perfil pró-inflamatório de secreção de citocinas, evidenciado pela elevação de TNF α , IL1- β e IL-6, e uma elevação compensatória de IL-10. Este perfil pró-inflamatório de secreção de citocinas, sobretudo a elevação do TNF α e IL-6, foi observado de forma mais pronunciada nos portadores da mutação p.R482W, em comparação aos portadores da mutação R644C. Em relação aos níveis de TNF- α , nossos dados estão em concordância com Wong et al. que também observaram elevados níveis de TNF- α associados às baixas concentrações de adiponectina e leptina (Wong et al. 2005). Contudo, em contraste com nossos resultados, o mesmo estudo identificou reduzidas concentrações de IL-6 (Wong et al. 2005). Por outro lado, Hegele et al. não encontraram alterações tanto no perfil plasmático de TNF- α quanto no de IL-6 em portadores de FPLD2 (Hegele et al. 2003).

O TNF- α se destaca entre as citocinas inflamatórias envolvidas na patogênese da RI, está implicado nos defeitos da remodelação adiposa e na incapacidade dos adipócitos subcutâneos de armazenar energia promovendo lipólise, liberação de ácidos graxos livres e redistribuição lipídica para tecidos viscerais, fígado e músculos (Moller 2000). Ademais, já foi descrita a existência de uma relação inversa entre o

TNF- α e a adiponectina que, provavelmente, resulta do recíproco efeito regulatório que ambos exercem sobre os adipócitos e macrófagos. Estudos *in vitro*, com adipócitos humanos, demonstraram que o TNF- α suprime a expressão gênica de adiponectina (Bruun et al. 2003) e a adiponectina inibe a produção de TNF- α em macrófagos (Yokota et al. 2000).

O TNF- α tem, ainda, ação direta nas vias de sinalização da insulina através da fosforilação da serina e do substrato do receptor da insulina (IRS-1), com menor ativação do fosfoinositol 3 cinase e das suas vias de sinalização de segundo mensageiro. As vias intracelulares ativadas pelo receptor do TNF- α que interagem com a sinalização insulínica ainda não são totalmente esclarecidas, mas acredita-se que as vias de sinalização do NF- κ B e ou JNK estejam envolvidas (Maury; Brichard 2010).

O tecido adiposo é a principal fonte de produção do IL-6, responsável por aproximadamente 35% de sua produção (Mohamed-Ali et al. 1997). Já foi proposto que seus níveis refletiriam a redução global da massa adiposa nos portadores de FPLD2 (Hegele et al. 2003). Contudo, os elevados níveis de IL-6 identificados em nossa série de FPLD2 contrariam a hipótese de que esta interleucina seja uma marcadora de massa adiposa; e nos permite especular o possível envolvimento de outros efeitos da mutação do *LMNA*, *per se*, na secreção das interleucinas. É possível que os níveis de IL-6, assim como de outras citocinas, estejam envolvidos no processo primário de RI, perda do TAS e de redistribuição lipídica da FPLD2. Assim, talvez a redução dos níveis da leptina também não seja apenas uma consequência do processo de redução da massa adiposa (Hegele 2000).

Nossos resultados sugerem que a secreção da IL-1 β também possa estar envolvida nos mecanismos de lesão do TAS. O IL-1 β inibe a expressão da adiponectina e leptina, inibe a maturação dos adipócitos e o acúmulo de sua gotícula lipídica característica (Bruun et al. 2002; Lihn et al. 2004). Já foi proposto que as citocinas pró-inflamatórias possam agir como mediadores agravantes dos processos envolvidos nos defeitos da cromatina nas laminopatias (Camozzi et al. 2014).

Um fator limitante do nosso estudo é o fato de termos analisado as concentrações circulantes de citocinas pró-inflamatórias e não suas concentrações no TAS e no tecido adiposo visceral. Na obesidade, o processo inflamatório do tecido adiposo resultante da hipertrofia do adipócito é apontado como desfecho chave para as complicações metabólicas. Neste caso, a hipertrofia do adipócito

culmina em hipóxia, distúrbios da adipogênese, apoptose e mudança na população celular local com predomínio de macrófagos, citocinas pró-inflamatórias e fibrose tecidual (Kalupahana; Moustaid-Moussa; Claycombe 2012). Na FPLD2, no entanto, os mecanismos patofisiológicos envolvidos nas alterações metabólicas e arquiteturais do tecido adiposo permanecem parcialmente compreendidos. Béréziat et al. sugerem um mecanismo patofisiológico distinto àquele da obesidade, no qual estariam envolvidos a redução dos adipócitos e dos vasos sanguíneos com fibrose tecidual, porém sem inflamação local. A análise do TAS cervical de pacientes com FPLD2 aponta para um processo de remodelação tecidual semelhante ao do tecido adiposo marrom, com alterações mitocondriais e hiper expressão de UCP1(uncoupling protein 1). Béréziat et al. propõem, portanto, que o processo de acúmulo adiposo na região cervical destes pacientes não seja simplesmente um mecanismo de redistribuição lipídica compensatória à redução de reservas periféricas (Béréziat et al. 2011).

Entre os diagnósticos diferenciais da FPLD2, a síndrome de Cushing tem destaque tanto devido ao perfil característico de distribuição adiposa quanto pelas anormalidades metabólicas associadas (Kobberling; Dunnigan 1986; Garg; Peshock; Fleckenstein 1999; Garg 2000b; Hegele 2000; Garg 2004). Ademais, os GC regulam a diferenciação, a função e a distribuição dos adipócitos (Morton 2010). Ainda, não só o hipercortisolismo sistêmico como também o local pode estar envolvido nos distúrbios do tecido adiposo. Uma vez que não existem trabalhos prévios avaliando a sensibilidade aos GC na FPLD2, aventamos a possibilidade do envolvimento destes esteróides na patogênese das anormalidades metabólicas observadas na FPLD2.

Avaliamos a atividade do eixo HPA através das dosagens do cortisol plasmático e salivar em condições basais e após diferentes doses da DEX. Não encontramos diferenças intra-individuais entre as três medidas basais do cortisol salivar ou sérico, sugerindo que nestes pacientes há estabilidade dos níveis de cortisol assim como acontece em populações de jovens e idosos saudáveis (Huizenga et al. 1998; Chriguer et al. 2005). Quando comparamos os portadores de FPLD2 ao grupo controle, também não encontramos diferenças na secreção basal do cortisol plasmático e salivar. Estudos prévios sugeriram relação entre os níveis basais de secreção do cortisol, obesidade e SM, contudo os resultados são

controversos (Rask et al. 2002; Duclos et al. 2005; Misra et al. 2008; Weigensberg; Toledo-Corral; Goran 2008; Anagnostis et al. 2009; Abraham et al. 2013).

Por outro lado, os pacientes com FPLD2 além de tendência a maiores concentrações do cortisol salivar às 23 horas, mostraram-se menos susceptíveis à supressão do eixo HPA pós 0,5 mg de DEX, em comparação ao grupo controle, sugerindo resistência parcial aos efeitos contraregulatórios dos GC. Essa dose foi a mais efetiva para a avaliação do espectro de sensibilidade do eixo HPA entre os grupos, pois poucos indivíduos apresentaram supressão do cortisol plasmático pós 0,25 mg e tanto os portadores de FPLD2 quanto os controles apresentaram supressão do cortisol pós 1 mg de DEX. Portanto, acreditamos que as doses de 0,25 e 1 mg de DEX poderiam ser, respectivamente, muito baixas ou muito altas para se detectar diferenças sutis na sensibilidade do eixo HPA aos GC, o que de fato foi previamente demonstrado em indivíduos saudáveis (Chriguer et al. 2005).

Resistência aos GC pode estar relacionada ao aumento de citocinas inflamatórias, a hiper expressão do $GR\beta$ e ao aumento da conversão do cortisol/cortisona pela atividade da 11β -HSD2 (Chrousos et al. 1996; De Castro et al. 1996; Morgan et al. 2014). Em concordância com os achados na SM (Martins et al. 2017), nossos dados sugerem que o aumento de citocinas pró inflamatórias seja um dos mecanismos envolvidos na redução da sensibilidade do eixo HPA aos efeitos contra regulatórios dos GC também em portadores de FPLD2. Outro mecanismo proposto, envolveria a deficiência de leptina e adiponectina, dado efeito inibitório sobre a atividade do eixo HPA e a esteroidogênese adrenal, respectivamente (Heiman et al. 1997; Li et al. 2009; Kargi; Iacobellis 2014).

As expressões do $GR\beta$, $GR\alpha$, 11β -HSD1 e 11β -HSD2, outros moduladores da sensibilidade tecidual aos GC, não se mostraram alteradas nos portadores de FPLD2 em comparação aos indivíduos do grupo controle. Em contraste, Martins et al. sugerem que a hiper expressão do $GR\beta$ possa estar envolvida no desajuste do eixo HPA em pacientes com SM (Martins et al. 2017). Uma possível limitação do nosso estudo foi o uso de células do sangue periférico ao invés do tecido adiposo subcutâneo e visceral para a avaliação da expressão desses genes visto que a sensibilidade aos GC é tecido-específica (Constantinopoulos et al. 2015).

As células do tecido adiposo visceral e subcutâneo apresentam respostas distintas aos GC e essas respostas também podem variar de acordo com o estágio de diferenciação do adipócito (Kissebah; Krakower 1994; Peckett; Wright; Riddell

2011). O grau de expressão do $GR\alpha$ no tecido adiposo visceral está aumentado em comparação ao subcutâneo (Rebuffe-Scrive et al. 1990; Castro et al. 2012). Além disso, no tecido adiposo de obesos (Bujalska; Kumar; Stewart 1997; Paulmyer-Lacroix et al. 2002; Wake; Walker 2004; Wang 2005), especialmente no compartimento visceral de obesos portadores de SM (Constantinopoulos et al. 2015), a 11β -HSD1 está hiper expressa e há excesso de cortisol local. Boullu-Ciocca et. al verificaram ainda que, mesmo diante do excesso de cortisol local, o GR no tecido adiposo visceral destes pacientes não sofre *downregulation*, porém há alteração na proporção $GR\alpha$ / $GR\beta$ local. Estes mecanismos explicam, em parte, as alterações da integridade do eixo HPA e no padrão centrípeto e deletério de distribuição adiposa na SM (Boullu-Ciocca et al. 2003; Constantinopoulos et al. 2015).

Além dos GC, os níveis de citocinas, insulina, hormônios da tireóide, esteróides sexuais e o $PPAR\gamma$ também parecem influenciar na expressão da 11β -HSD no tecido adiposo (Seckl; Walker 2001). Os ligantes do $PPAR\gamma$ inibem a expressão da 11β -HSD1 no tecido adiposo visceral. Considerando que os distúrbios nas lamina A e C cursam com *downregulation* do $PPAR\gamma$ (Bidault et al. 2011), é possível aventarmos o envolvimento desta via nos distúrbios do tecido adiposo visceral de portadores de FPLD2.

Finalmente, não podemos descartar a possibilidade da lamina nuclear *per se* ser um importante determinante na regulação dos Elementos Responsivos aos Glicocorticoides (GRE) em adipócitos humanos, um mecanismo previamente relatado em células endoteliais de aorta bovina (Nayebosadri; Ji 2013). Embora a maioria das células somáticas diferenciadas humanas expresse lamina A e lamina C, é possível que as lamina mutadas possam não modular a sensibilidade aos GC em linfócitos, pois os dados quanto a presença destas lamina em células do sistema imune ainda são controversos (Rober et al. 1990; Gonzalez-Granado et al. 2014). Dessa forma, a avaliação do tecido adiposo visceral e periférico em portadores de FPLD2 é necessária para a melhor compreensão do papel da resistência tecido-específica aos GC na FPLD2.

Em conclusão, a heterogeneidade fenotípica observada em pacientes com FPLD2 está relacionada ao local da mutação no gene *LMNA*, sendo que mutações afetando as lamina A e C cursam com um fenótipo mais grave. Pacientes com FPLD2 apresentam resposta alterada aos efeitos inibitórios dos GC sugerindo

diminuição da sensibilidade do eixo HPA provavelmente relacionada às elevadas concentrações de citocinas inflamatórias.

7 Referências

7 REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, S. B., RUBINO, D., SINAIL, N., et al. Cortisol, obesity, and the metabolic syndrome: a cross-sectional study of obese subjects and review of the literature. **Obesity (Silver Spring)**. Jan;21(1), E105-17, 2013.
- ANAGNOSTIS, P., ATHYROS, V. G., TZIOMALOS, K., et al. Clinical review: The pathogenetic role of cortisol in the metabolic syndrome: a hypothesis. **J Clin Endocrinol Metab.** , Aug;94(8), 2692-701, 2009.
- ANDRE, P., SCHNEEBELI, S., VIGOUROUX, C., et al. Metabolic and cardiac phenotype characterization in 37 atypical Dunnigan patients with nonfarnesylated mutated prelamin A. **American Heart Journal**, 169(4), 587-593, 2014.
- ARIMURA, T., ONOUE, K., TAKAHASHI-TANAKA, Y., et al. Nuclear accumulation of androgen receptor in gender difference of dilated cardiomyopathy due to lamin A/C mutations. **Cardiovascular Research**, 99(3), 382-394, 2013.
- BAMBERGER, C. M., BAMBERGER, A. M., DE CASTRO, M., et al. Glucocorticoid receptor beta, a potential endogenous inhibitor of glucocorticoid action in humans. **J Clin Invest.** , Jun;95(6), 2435-41, 1995.
- BARNES, P. J. and ADCOCK, I. M. Glucocorticoid resistance in inflammatory diseases. **Lancet**. 2009 May 30;373(9678), 1905-1917, 2009.
- BÉREZIAT, V., CERVERA, P., LE DOUR, C., et al. LMNA Mutations Induce a Non-Inflammatory Fibrosis and a Brown Fat-Like Dystrophy of Enlarged Cervical Adipose Tissue. **The American Journal of Pathology**, 179(5), 2443-2453, 2011.
- BIDAULT, G., VATIER, C., CAPEAU, J., et al. LMNA linked lipodystrophies: from altered fat distribution to cellular alterations. **Biochemical Society Transactions**, 39(6), 1752-1757, 2011.
- BONNE, G., DI BARLETTA, M. R., VARNOUS, S., et al. Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. **Nat Genet**, 21(3), 285-8, 1999.
- BOULLU-CIOCCA, S., PAULMYER-LACROIX, O., FINA, F., et al. Expression of the mRNAs coding for the glucocorticoid receptor isoforms in obesity. **Obes Res**. 2003 Aug;11(8), 925-929, 2003.
- BROWN, R. J., ARAUJO-VILAR, D., CHEUNG, P. T., et al. The Diagnosis and Management of Lipodystrophy Syndromes: A Multi-Society Practice Guideline. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, 101(12), 4500-4511, 2016.
- BRUUN, J. M., LIHN, A. S., VERDICH, C., et al. Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans. **American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism**, 285(3), E527-E533, 2003.
- BRUUN, J. M., PEDERSEN, S. B., KRISTENSEN, K., et al. Effects of pro-inflammatory cytokines and chemokines on leptin production in human adipose tissue in vitro. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 190(1), 91-99, 2002.
- BUJALSKA, I. J., KUMAR, S. and STEWART, P. M. Does central obesity reflect "Cushing's disease of the omentum"? **Lancet**. 1997 Apr 26;349(9060), 1210-1213, 1997.
- CAMOZZI, D., CAPANNI, C., CENNI, V., et al. Diverse lamin-dependent mechanisms interact to control chromatin dynamics: Focus on laminopathies. **Nucleus**, 5(5), 427-440, 2014.
- CASTRO, M., ELIAS, P. C. L., QUIDUTE, A. R. P., et al. Out-Patient Screening for Cushing Syndrome: The Sensitivity of the Combination of Circadian Rhythm and Overnight Dexamethasone Suppression Salivary Cortisol Tests1. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, 84(3), 878-882, 1999.
- CASTRO, R. B., LONGUI, C. A., FARIA, C. D., et al. Tissue-specific adaptive levels of glucocorticoid receptor alpha mRNA and their relationship with insulin resistance. **Genet Mol Res**, Nov 21;11(4), 3975-3987, 2012.
- CHRIGUER, R. S., ELIAS, L. L., DA SILVA, I. M., JR., et al. Glucocorticoid sensitivity in young healthy individuals: in vitro and in vivo studies. **J Clin Endocrinol Metab**, Nov;90(11), 5978-5984, 2005.
- CHROUSOS, G. P., CASTRO, M., LEUNG, D. Y., et al. Molecular mechanisms of glucocorticoid resistance/hypersensitivity. Potential clinical implications. **Am J Respir Crit Care Med**, Aug;154(2 Pt 2), S39-44, 1996.
- CNOP, M., HAVEL, P. J., UTZSCHNEIDER, K. M., et al. Relationship of adiponectin to body fat distribution, insulin sensitivity and plasma lipoproteins: evidence for independent roles of age and sex. **Diabetologia**, 46(4), 459-469, 2003.
- CONSTANTINOPOULOS, P., MICHALAKI, M., KOTTOROU, A., et al. Cortisol in tissue and systemic level as a contributing factor to the development of metabolic syndrome in severely obese patients. **Eur J Endocrinol**, Jan;172(1), 69-78, 2015.

- DE CASTRO, M., ELLIOT, S., KINO, T., et al. The non-ligand binding beta-isoform of the human glucocorticoid receptor (hGR beta): tissue levels, mechanism of action, and potential physiologic role. **Molecular Medicine**, 2(5), 597-607, 1996.
- DEFRONZO, R. A., TOBIN, J. D. and ANDRES, R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. **Am J Physiol** . Sep;237(3), E214-223, 1979.
- DIKER-COHEN, T., COCHRAN, E., GORDEN, P., et al. Partial and generalized lipodystrophy: comparison of baseline characteristics and response to metreleptin. **J Clin Endocrinol Metab**, May;100(5), 1802-1810, 2015.
- DITTMER, T. A. and MISTELI, T. The lamin protein family. **Genome Biol**, 12(5), 222, 2011.
- DUCLOS, M., MARQUEZ PEREIRA, P., BARAT, P., et al. Increased cortisol bioavailability, abdominal obesity, and the metabolic syndrome in obese women. **Obes Res**, Jul;13(7), 1157-1166, 2005.
- DUNNIGAN, M. G., COCHRANE, M. A., KELLY, A., et al. Familial lipotrophic diabetes with dominant transmission. A new syndrome. **Q J Med**, Jan;43(169), 33-48, 1974.
- DURNIN, J. V. G. A. and WOMERSLEY, J. Body fat assessed from total body density and its estimation from skinfold thickness: measurements on 481 men and women aged from 16 to 72 Years. **British Journal of Nutrition**, 32(1), 77-97, 1974.
- DUTOUR, A., ROLL, P., GABORIT, B., et al. High prevalence of laminopathies among patients with metabolic syndrome. **Hum Mol Genet**, Oct 1;20(19), 3779-3786, 2011.
- ELZENEINI, E. and WICKSTRÖM, S. A. Lipodystrophic laminopathy: Lamin A mutation relaxes chromatin architecture to impair adipogenesis. **The Journal of Cell Biology**, Sep 4;216(9), 2607-2610, 2017.
- FATKIN, D., MACRAE, C., SASAKI, T., et al. Missense mutations in the rod domain of the lamin A/C gene as causes of dilated cardiomyopathy and conduction-system disease. **N Engl J Med**, 341(23), 1715-24, 1999.
- GARG, A. Gender Differences in the Prevalence of Metabolic Complications in Familial Partial Lipodystrophy (Dunnigan Variety)*. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, 85(5), 1776-1782, 2000a.
- GARG, A. Lipodystrophies. **The American Journal of Medicine**, 108(2), 143-152, 2000b.
- GARG, A. Acquired and inherited lipodystrophies. **N Engl J Med**, Mar 18;350(12), 1220-1234, 2004.
- GARG, A. Clinical review: Lipodystrophies: genetic and acquired body fat disorders. **J Clin Endocrinol Metab**, Nov;96(11), 3313-3325, 2011.
- GARG, A. and AGARWAL, A. K. Lipodystrophies: disorders of adipose tissue biology. **Biochim Biophys Acta**, Jun;1791(6), 507-513, 2009.
- GARG, A., PESHOCK, R. M. and FLECKENSTEIN, J. L. Adipose Tissue Distribution Pattern in Patients with Familial Partial Lipodystrophy (Dunnigan Variety)1. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, 84(1), 170-174, 1999.
- GARG, A., VINAITHEERTHAN, M., WEATHERALL, P. T., et al. Phenotypic heterogeneity in patients with familial partial lipodystrophy (dunnigan variety) related to the site of missense mutations in lamin a/c gene. **J Clin Endocrinol Metab**, 86(1), 59-65, 2001.
- GODOY-MATOS, A. F., MOREIRA, R. O., VALERIO, C. M., et al. A new method for body fat evaluation, body adiposity index, is useful in women with familial partial lipodystrophy. **Obesity (Silver Spring)**, Feb;20(2), 440-443, 2012.
- GONZALEZ-GRANADO, J. M., SILVESTRE-ROIG, C., ROCHA-PERUGINI, V., et al. Nuclear envelope lamin-A couples actin dynamics with immunological synapse architecture and T cell activation. **Sci Signal**, Apr 22;7(322), ra37, 2014.
- GUENANTIN, A. C., BRIAND, N., BIDAULT, G., et al. Nuclear envelope-related lipodystrophies. **Semin Cell Dev Biol**, 29(148-57), 2014.
- HANDELSMAN, Y., ORAL, E. A., BLOOMGARDEN, Z. T., et al. THE CLINICAL APPROACH TO THE DETECTION OF LIPODYSTROPHY - AN AACE CONSENSUS STATEMENT. **Endocrine practice: official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists**, 19(1), 107-116, 2013.
- HAQUE, W. A., ORAL, E. A., DIETZ, K., et al. Risk Factors for Diabetes in Familial Partial Lipodystrophy, Dunnigan Variety. **Diabetes Care**, 26(5), 1350-1355, 2003.
- HAQUE, W. A., SHIMOMURA, I., MATSUZAWA, Y., et al. Serum Adiponectin and Leptin Levels in Patients with Lipodystrophies. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, 87(5), 2395-2398, 2002.
- HAQUE, W. A., VUITCH, F. and GARG, A. Post-mortem findings in familial partial lipodystrophy, Dunnigan variety. **Diabetic Medicine**, 19(12), 1022-1025, 2002.
- HEGELE, R. A. Familial partial lipodystrophy: a monogenic form of the insulin resistance syndrome. **Mol Genet Metab**, Dec;71(4), 539-544, 2000.

- HEGELE, R. A., ANDERSON, C. M., WANG, J., et al. Association Between Nuclear Lamin A/C R482Q Mutation and Partial Lipodystrophy with Hyperinsulinemia, Dyslipidemia, Hypertension, and Diabetes. **Genome Research**, 10(5), 652-658, 2000a.
- HEGELE, R. A., CAO, H., HUFF, M. W., et al. LMNA R482Q Mutation in Partial Lipodystrophy Associated with Reduced Plasma Leptin Concentration*. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, 85(9), 3089-3093, 2000b.
- HEGELE, R. A., KRAW, M. E., BAN, M. R., et al. Elevated Serum C-Reactive Protein and Free Fatty Acids Among Nondiabetic Carriers of Missense Mutations in the Gene Encoding Lamin A/C (LMNA) With Partial Lipodystrophy. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, 23(1), 111-116, 2003.
- HEIMAN, M. L., AHIMA, R. S., CRAFT, L. S., et al. Leptin inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in response to stress. **Endocrinology**, Sep;138(9), 3859-3863, 1997.
- HUIZENGA, N. A., KOPER, J. W., DE LANGE, P., et al. Interperson variability but intraperson stability of baseline plasma cortisol concentrations, and its relation to feedback sensitivity of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis to a low dose of dexamethasone in elderly individuals. **J Clin Endocrinol Metab**, Jan;83(1), 47-54, 1998.
- JOY, T., KENNEDY, B. A., AL-ATTAR, S., et al. Predicting abdominal adipose tissue among women with familial partial lipodystrophy. **Metabolism**, 58(6), 828-834, 2009.
- KALUPAHANA, N. S., MOUSTAID-MOUSSA, N. and CLAYCOMBE, K. J. Immunity as a link between obesity and insulin resistance. **Mol Aspects Med**, Feb;33(1), 26-34, 2012.
- KARGI, A. Y. and IACOBELLIS, G. Adipose tissue and adrenal glands: novel pathophysiological mechanisms and clinical applications. **Int J Endocrinol**, 2014(ID 614074), 8 pages, 2014.
- KATZ, A., NAMBI, S. S., MATHER, K., et al. Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. **J Clin Endocrinol Metab**, Jul;85(7), 2402-2410, 2000.
- KISSEBAH, A. H. and KRAKOWER, G. R. Regional adiposity and morbidity. **Physiological Reviews**, 74(4), 761-811, 1994.
- KOBBERLING, J. and DUNNIGAN, M. G. Familial partial lipodystrophy: two types of an X linked dominant syndrome, lethal in the hemizygous state. **J Med Genet**, Apr;23(2), 120-127, 1986.
- LEE, M. J., PRAMYOTHIN, P., KARASTERGIOU, K., et al. Deconstructing the roles of glucocorticoids in adipose tissue biology and the development of central obesity. **Biochim Biophys Acta**, Mar;1842(3), 473-481, 2014.
- LELLIOTT, C. J., LOGIE, L., SEWTER, C. P., et al. Lamin expression in human adipose cells in relation to anatomical site and differentiation state. **J Clin Endocrinol Metab**, Feb;87(2), 728-734, 2002.
- LI, P., SUN, F., CAO, H. M., et al. Expression of adiponectin receptors in mouse adrenal glands and the adrenocortical Y-1 cell line: adiponectin regulates steroidogenesis. **Biochem Biophys Res Commun**, Dec 25;390(4), 1208-1213., 2009.
- LIGHTBOURNE, M. and BROWN, R. J. Genetics of Lipodystrophy. **Endocrinol Metab Clin North Am**, 46(2), 539-554, 2017.
- LIHN, A. S., BRUUN, J. M., HE, G., et al. Lower expression of adiponectin mRNA in visceral adipose tissue in lean and obese subjects. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 219(1), 9-15, 2004.
- LIN, F. and WORMAN, H. J. Structural organization of the human gene encoding nuclear lamin A and nuclear lamin C. **J Biol Chem**, Aug 5;268(22), 16321-16326, 1993.
- LIVAK, K. J. and SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, 25(4), 402-8, 2001.
- LLOYD, D. J., TREMBATH, R. C. and SHACKLETON, S. A novel interaction between lamin A and SREBP1: implications for partial lipodystrophy and other laminopathies. **Human Molecular Genetics**, 11(7), 769-777, 2002.
- MARTINS, C. S., ELIAS, D., COLLI, L. M., et al. HPA axis dysregulation, NR3C1 polymorphisms and glucocorticoid receptor isoforms imbalance in metabolic syndrome. **Diabetes Metab Res Rev**, Mar;33(3), e2842, 2017.
- MATTHEWS, D. R., HOSKER, J. P., RUDENSKI, A. S., et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. **Diabetologia**, Jul;28(7), 412-119, 1985.
- MAURY, E. and BRICHARD, S. M. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. **Mol Cell Endocrinol**, Jan 15;314(1), 1-16, 2010.
- MERCURI, E., BROWN, S. C., NIHOYANNOPOULOS, P., et al. Extreme variability of skeletal and cardiac muscle involvement in patients with mutations in exon 11 of the lamin A/C gene. **Muscle & Nerve**, 31(5), 602-609, 2005.

- MISRA, M., BREDELLA, M. A., TSAI, P., et al. Lower growth hormone and higher cortisol are associated with greater visceral adiposity, intramyocellular lipids, and insulin resistance in overweight girls. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, Aug;295(2), 385-392, 2008.
- MOHAMED-ALI, V., GOODRICK, S., RAWESH, A., et al. Subcutaneous Adipose Tissue Releases Interleukin-6, But Not Tumor Necrosis Factor- α , in Vivo. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, 82(12), 4196-4200, 1997.
- MOLLER, D. E. Potential Role of TNF- α in the Pathogenesis of Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, 11(6), 212-217, 2000.
- MONDER, C. Corticosteroids, receptors, and the organ-specific functions of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. **FASEB** Dec;5(15), 3047-3054, 1991.
- MONTEIRO, L. Z., FOSS-FREITAS, M. C., JUNIOR MONTENEGRO, R. M., et al. Body fat distribution in women with familial partial lipodystrophy caused by mutation in the lamin A/C gene. **Indian J Endocrinol Metab**, 16(1), 136-8, 2012a.
- MONTEIRO, L. Z., FOSS-FREITAS, M. C., JUNIOR MONTENEGRO, R. M., et al. Body fat distribution in women with familial partial lipodystrophy caused by mutation in the lamin A/C gene. **Indian J Endocrinol Metab**, 16(1), 136-138, 2012b.
- MORGAN, S. A., MCCABE, E. L., GATHERCOLE, L. L., et al. 11-HSD1 is the major regulator of the tissue-specific effects of circulating glucocorticoid excess. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 111(24), E2482-E2491, 2014.
- MORTON, N. M. Obesity and corticosteroids: 11beta-hydroxysteroid type 1 as a cause and therapeutic target in metabolic disease. **Mol Cell Endocrinol**, Mar 25;316(2), 154-164, 2010.
- MORY, P. B., CRISPIM, F., FREIRE, M. B. S., et al. Phenotypic diversity in patients with lipodystrophy associated with LMNA mutations. **European Journal of Endocrinology**, 167(3), 423-431, 2012.
- MUCHIR, A., BONNE, G., VAN DER KOOI, A. J., et al. Identification of mutations in the gene encoding lamins A/C in autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy with atrioventricular conduction disturbances (LGMD1B). **Hum Mol Genet**, 9(9), 1453-9, 2000.
- NAYEBOSADRI, A. and JI, J. Y. Endothelial nuclear lamina is not required for glucocorticoid receptor nuclear import but does affect receptor-mediated transcription activation. **Am J Physiol Cell Physiol**, Aug 1;305(3), C309-322, 2013.
- NHANES Anthropometry Procedures Manual. **Centers for Disease Control and Prevention (CDC). National Center for Health Statistics (NCHS). National Health and Nutrition Examination Survey Manual.**, 2007.
- NIH Bioelectrical impedance analysis in body composition measurement. National Institutes of Health Technology Assessment Conference Statement. December 12-14, 1994. **Nutrition**, Nov-Dec;12 (11-12), 749-762, 1996.
- OAKLEY, R. H., SAR, M. and CIDLOWSKI, J. A. The human glucocorticoid receptor beta isoform. Expression, biochemical properties, and putative function. **J Biol Chem**, Apr 19;271(16), 9550-9559, 1996.
- OLDENBURG, A., BRIAND, N., SORENSEN, A. L., et al. A lipodystrophy-causing lamin A mutant alters conformation and epigenetic regulation of the anti-adipogenic MIR335 locus. **The Journal of Cell Biology**, 2017.
- OZER, F. L., LICHTENSTEIN, J. R., KWITEROVICH, P. O., et al. A new genetic variety of lipodystrophy. **Clin Res**, 21(533), 1973.
- PARK, J. Y., JAVOR, E. D., COCHRAN, E. K., et al. Long-term efficacy of leptin replacement in patients with Dunnigan-type familial partial lipodystrophy. **Metabolism**, 56(4), 508-516, 2007.
- PAULMYER-LACROIX, O., BOULLU, S., OLIVER, C., et al. Expression of the mRNA coding for 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in adipose tissue from obese patients: an in situ hybridization study. **J Clin Endocrinol Metab**, Jun;87(6), 2701-2705, 2002.
- PECKETT, A. J., WRIGHT, D. C. and RIDDELL, M. C. The effects of glucocorticoids on adipose tissue lipid metabolism. **Metabolism**, Nov;60(11), 1500-1510, 2011.
- PETERS, J. M., BARNES, R., BENNETT, L., et al. Localization of the gene for familial partial lipodystrophy (Dunnigan variety) to chromosome 1q21â€“22. **Nature Genetics**, 18(292), 1998.
- POLYZOS, S. A. and MANTZOROS, C. S. Lipodystrophy: Time for a global registry and randomized clinical trials to assess efficacy, safety and cost-effectiveness of established and novel medications. **Metabolism**, 72(A4-A10), 2017.
- PROKOCIMER, M., DAVIDOVICH, M., NISSIM-RAFINIA, M., et al. Nuclear lamins: key regulators of nuclear structure and activities. **J Cell Mol Med**, Jun;13(6), 1059-1085, 2009.
- QUAX, R., MANENSCHIJN, L., W KOPER, J., et al. Glucocorticoid sensitivity in health and disease. **Nature Reviews Endocrinol**, Nov;9(11), 670-686, 2013.

- RANKIN, J., AUER-GRUMBACH, M., BAGG, W., et al. Extreme phenotypic diversity and nonpenetrance in families with the LMNA gene mutation R644C. **American Journal of Medical Genetics Part A**, 146A(12), 1530-1542, 2008.
- RASK, E., WALKER, B. R., SODERBERG, S., et al. Tissue-specific changes in peripheral cortisol metabolism in obese women: increased adipose 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity. **J Clin Endocrinol Metab**, Jul;87(7), 3330-3336, 2002.
- REBUFFE-SCRIVE, M., BRONNEGARD, M., NILSSON, A., et al. Steroid hormone receptors in human adipose tissues. **J Clin Endocrinol Metab**, Nov;71(5), 1215-1219, 1990.
- ROBER, R. A., SAUTER, H., WEBER, K., et al. Cells of the cellular immune and hemopoietic system of the mouse lack lamins A/C: distinction versus other somatic cells. **J Cell Sci**, Apr;95(pT4), 587-598, 1990.
- SANTIAGO, L., JORGE, S. and MOREIRA, A. Longitudinal evaluation of the development of salivary cortisol circadian rhythm in infancy. **Clinical Endocrinology**, 44(2), 157-161, 1996.
- SCHNACKENBERG, C. G., COSTELL, M. H., KROSKY, D. J., et al. Chronic inhibition of 11 beta - hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity decreases hypertension, insulin resistance, and hypertriglyceridemia in metabolic syndrome. **Biomed Res Int**, 2013(Article ID 427640), 10 pages, 2013.
- SECKL, J. R. and WALKER, B. R. Minireview: 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1- a tissue-specific amplifier of glucocorticoid action. **Endocrinology**, Apr;142(4), 1371-1376, 2001.
- SHACKLETON, S., LLOYD, D. J., JACKSON, S. N., et al. LMNA, encoding lamin A/C, is mutated in partial lipodystrophy. **Nat Genet**, 24(2), 153-6, 2000.
- SILVERMAN, M. N. and STERNBERG, E. M. Glucocorticoid regulation of inflammation and its functional correlates: from HPA axis to glucocorticoid receptor dysfunction. **Ann N Y Acad Sci**, Jul;1261(2012), 55-63, 2012.
- SPECKMAN, R. A., GARG, A., DU, F., et al. Mutational and Haplotype Analyses of Families with Familial Partial Lipodystrophy (Dunnigan Variety) Reveal Recurrent Missense Mutations in the Globular C-Terminal Domain of Lamin A/C. **American Journal of Human Genetics**, 66(4), 1192-1198, 2000.
- STEWART, P. M. and KROZOWSKI, Z. S. 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase. **Vitam Horm**, 1999;57(249-324), 1999.
- SUTINEN, J., KANNISTO, K., KORSHENINNIKOVA, E., et al. In the lipodystrophy associated with highly active antiretroviral therapy, pseudo-Cushing's syndrome is associated with increased regeneration of cortisol by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in adipose tissue. **Diabetologia**, Oct;47(10), 1668-1671, 2004.
- VALERIO, C., GODOY-MATOS, A., MOREIRA, R., et al. Dual-Energy X-Ray Absorptiometry Study of Body Composition in Patients With Lipodystrophy. **Diabetes care**, Jul; 30(7), 1857-1859, 2007.
- VALERIO, C. M., ZAJDENVERG, L., DE OLIVEIRA, J. E. P., et al. Body composition study by dual-energy x-ray absorptiometry in familial partial lipodystrophy: finding new tools for an objective evaluation. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, 4(1), 40-46, 2012.
- VAN ROSSUM, E. F., KOPER, J. W., HUIZENGA, N. A., et al. A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene, which decreases sensitivity to glucocorticoids in vivo, is associated with low insulin and cholesterol levels. **Diabetes**, Oct;51(10), 3128-3134, 2002.
- VANTYGHEM, M. C., BALAVOINE, A. S., DOUILLARD, C., et al. How to diagnose a lipodystrophy syndrome. **Ann Endocrinol (Paris)**, Jun;73(3), 170-189, 2012.
- VATIER, C., FETITA, S., BOUDOU, P., et al. One-year metreleptin improves insulin secretion in patients with diabetes linked to genetic lipodystrophic syndromes. **Diabetes**, Jul;18(2016), 2016.
- VEILLEUX, A., LABERGE, P. Y., MORENCY, J., et al. Expression of genes related to glucocorticoid action in human subcutaneous and omental adipose tissue. **J Steroid Biochem Mol Biol**, Oct;122(1-3), 28-34, 2010.
- VIEIRA, J. G. H., NOGUTI, K. O., HIDAL, J. T., et al. Measurement of saliva cortisol as a method for the evaluation of free serum fraction. **Arq Bras Endocrinol Metab**, 28(8-10), 1984.
- VIGOUROUX, C., CARON-DEBARLE, M., LE DOUR, C., et al. Molecular mechanisms of human lipodystrophies: From adipocyte lipid droplet to oxidative stress and lipotoxicity. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 43(6), 862-876, 2011.
- VIGOUROUX, C., MAGRÉ, J., VANTYGHEM, M. C., et al. Lamin A/C gene: sex-determined expression of mutations in Dunnigan-type familial partial lipodystrophy and absence of coding mutations in congenital and acquired generalized lipodystrophy. **Diabetes**, 49(11), 1958-1962, 2000.
- WAKE, D. J. and WALKER, B. R. 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in obesity and the metabolic syndrome. **Mol Cell Endocrinol.**, Feb 27(1-2), 45-54, 2004.
- WANG, M. The role of glucocorticoid action in the pathophysiology of the Metabolic Syndrome. **Nutrition & Metabolism**, 2(3), 14 pages, 2005.

- WEBSTER, J. C., OAKLEY, R. H., JEWELL, C. M., et al. Proinflammatory cytokines regulate human glucocorticoid receptor gene expression and lead to the accumulation of the dominant negative beta isoform: a mechanism for the generation of glucocorticoid resistance. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Jun;5(12), 6865-6870, 2001.
- WEIGENSBERG, M. J., TOLEDO-CORRAL, C. M. and GORAN, M. I. Association between the metabolic syndrome and serum cortisol in overweight Latino youth. **J Clin Endocrinol Metab**, Apr;93(4), 1372-1378, 2008.
- WEINER, J. S. Human biology: a guide to field methods. **Published for the International Biological Programme by Blackwell Scientific.Oxford**, 621, 1969.
- WONG, S. P. Y., HUDA, M., ENGLISH, P., et al. Adipokines and the insulin resistance syndrome in familial partial lipodystrophy caused by a mutation in lamin A/C. **Diabetologia**, 48(12), 2641-2649, 2005.
- YAMAUCHI, T., KAMON, J., WAKI, H., et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. **Nat Med**, Aug;7(8), 941-946., 2001.
- YOKOTA, T., ORITANI, K., TAKAHASHI, I., et al. Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages. **Blood**, 96(5), 1723-1732, 2000.

8 Anexos

8 ANEXOS

Anexo 1 - Características antropométricas e de composição corporal individuais dos portadores da Lipodistrofia Familiar Parcial tipo 2 (FPLD2).

Anexo 2 - Características antropométricas e de composição corporal individuais dos participantes do grupo controle.

Anexo 3 - Dados bioquímicos individuais dos portadores da Lipodistrofia Familiar Parcial tipo 2 (FPLD2).

Anexo 4 - Dados bioquímicos individuais dos participantes do grupo controle.

Anexo 5 – Dados das dosagens individuais de adipocinas e citocinas plasmáticas dos portadores da Lipodistrofia Familiar Parcial tipo 2.

Anexo 6 - Dados das dosagens individuais adipocinas e citocinas plasmáticas dos participantes do grupo controle.

Anexo 7 - Concentrações individuais de cortisol plasmático e salivar em condições basais e após supressão com diferentes doses de dexametasona dos portadores da Lipodistrofia Familiar Parcial tipo 2.

Anexo 8 - Concentrações individuais de cortisol plasmático e salivar em condições basais e após supressão com diferentes doses de dexametasona dos participantes do grupo controle.

Anexo 9 - Concentrações individuais de dexametasona plasmática em condições basais e após o teste de supressão com diferentes doses de dexametasona (DEX) dos portadores da Lipodistrofia Familiar Parcial tipo 2.

Anexo 10 - Concentrações individuais de dexametasona plasmática em condições basais e após o teste de supressão com diferentes doses de dexametasona (DEX) dos participantes do grupo controle.

Anexo 11 – Dados individuais de expressão dos genes *GR α* , *GR β* , *11 β -HSD1* e *11 β -HSD2* em células mononucleares de sangue periférico dos portadores da Lipodistrofia Familiar Parcial tipo 2.

Anexo 12 – Dados individuais de expressão dos genes *GR α* , *GR β* , *11 β -HSD1* e *11 β -HSD2* em células mononucleares de sangue periférico dos participantes do grupo controle.

Anexo 13 – Termo de consentimento livre e esclarecido para indivíduos saudáveis.

Anexo 14 – Termo de consentimento livre e esclarecido para paciente com Lipodistrofia Parcial Familiar tipo 2.

Anexo 15 – Aprovação Comitê de Ética.

Anexo 16 – Manuscrito para publicação em Revista Científica.

Anexo 1 - Características antropométricas e de composição corporal individuais dos portadores da Lipodistrofia Familiar Parcial tipo 2 (FPLD2).

Paciente (família)	Peso (kg)	Altura (m)	IMC (kg/m ²)	Circunferências (cm)						Pregas Cutâneas (mm)									Composição Corporal (%)		
				CA	CQ	CC	CP	CB	CA/CQ	BC	TC	Axilar	Peitoral	SE	Ab	SI	CM	P	EGC	MG	MM
1 (I)	54,7	1,63	20,5	79,4	86,4	38,3	31,5	23,2	0,92	1	2,5	6	4	11	7	5	3	2	17	13	87
2 (I)	60,5	1,61	23,3	82	91	38,5	36,5	25,5	0,9	3	5	ND	7	12	9	9	4	3	24,5	20	80
3 (I)	58,3	1,51	25,5	94,4	88,6	41	29	27	1,06	4	6	13	17	23	29	10	4	3	31,9	21	79
4 (I)	59,7	1,56	24,5	78,5	90	40,8	29,5	28	0,87	3	4	20	15	9	25	19	5	6	21,5	24	76
5 (I)	56,5	1,58	22,6	88	86	36	32	24	1,02	2	3	9	8	16	10	7	4	0	24,5	17	83
6 (I)	50,5	1,68	17,9	66,6	82,3	33,5	32	22,7	0,81	2	4	6	5	15	8	6	5	4	19,5	20	80
7 (I)	89,8	1,74	29,7	95,5	110	48	34,5	36	0,87	7	14	17	32	40	27	15	5	0	24,8	24	76
8 (II)	59,2	1,65	21,7	79,5	90,2	42,5	33	25,5	0,88	2	5	ND	9	16	9	5	5	2	26,6	24,5	75,5
9 (II)	58,2	1,59	23	74,1	91,1	39,8	35	25,8	0,81	5	7	ND	20	23	23	10	5	5	25	26	74
10 (III)	67,1	1,62	25,6	91	93,5	47	34,3	27,5	0,97	3	3	ND	ND	20	11	ND	ND	0	26,6	ND	ND
11 (III)	68,1	1,55	28,3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
12 (IV)	63,4	1,62	24,5	86	92	40,5	32	27	0,93	1	3	5	5	12	6	4	4	2	19,8	25	75
13 (IV)	64	1,58	25,6	84	94	42,3	32,5	28,5	0,89	3	5	10	11	28	9	7	5	3	26,9	28	72
14 (IV)	55,8	1,6	21,7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
15 (V)	52,5	1,43	25,7	91,8	85,5	37,6	30	31	1,07	17	24	25	24	24	22	23	8	2	38,3	25	75
16 (V)	74	1,55	30,8	ND	96	41,2	33,5	38,8	ND	21	26	37	32	35	26	36	13	5	42	35,3	64,7
17 (V)	55,9	1,52	24,2	89,7	87	36,6	28,5	28	1,03	6	11	14	18,5	19	28	14	3	2	31	28	72
18 (V)	84,9	1,71	29	91,7	104,4	41	38	41	0,88	6	5	12	17	15	20	15	10	5	23	21,4	78,6
19 (V)	78,6	1,63	29,5	94	101	43,2	35,5	36	0,93	8	16	25	28	25	27	29	15	6	31,2	25,8	74,2
20 (V)	73,9	1,71	25,2	89	99	37	34	35	0,9	10	15	20	23	23	21	26	14	6	24	22	78
21 (V)	72,5	1,67	29,4	92	99	37,8	33	33	0,93	6	11	14	25	19	25	29	13	9	24,3	25	75
22 (V)	67	1,68	23,7	84	96,5	37	28,8	33,5	0,87	4	8	18	14	12	33	16	12	11	16,4	25	75
23 (V)	60,9	1,52	26,4	83,5	94	36	37	31,5	0,89	10	22	30	23	32	33	32	20	12	35,6	31	69
24 (V)	59,4	1,52	25,7	84,8	92,9	36,8	33,7	31,5	0,91	15	19	36	32	24	26	31	15	10	35,1	29	71

Ab: abdominal; BC: bicipital; CM: coxa media; EGC: estimativa de gordura corporal; IMC: Índice de Massa Corporal; MG: massa gorda; MM: massa magra;
P: panturrilha; SE: supraescapular; SI: supra ilíaca; TC: tricipital.
ND: dado não disponível

Anexo 2 - Características antropométricas e de composição corporal individuais dos participantes do grupo controle.

Indivíduo	Peso (kg)	Altura (m)	IMC (kg/m²)	Circunferências (cm)						Pregas Cutâneas (mm)									Composição Corporal (%)		
				CA	CQ	CC	CP	CB	CA/CQ	BC	TC	Axilar	Peitoral	SE	Ab	SI	CM	P	EGC	MG	MM
1	61	1,65	22,4	71,5	101	30,2	ND	ND	0,71	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	36	64
2	59,3	1,61	22,9	75	100,3	32	33,5	28	0,75	12	22	23	28	17	18	22	43	31	37,7	32	68
3	64	1,65	23,5	82	108	31,9	33	29,5	0,76	13	24	18	23	15	23	15	29	20	36,7	ND	ND
4	63	1,58	25,2	77	101	31,6	32,5	31	0,76	18	38	21	28	30	43	44	58	32	21,5	43	57
5	72	1,71	25	82,5	112,5	33	36,3	29	0,73	10	22	23	25	24	36	21	49	36	36,7	36	64
6	43,4	1,5	19,2	67,1	91	30	31	24,5	0,73	6	17	22	14	13	20	18	28	28	27,8	28	72
7	84	1,85	24,5	81	100,5	37,5	36,5	35	0,8	2	5	7,5	5	8	17	11	9	12	12,9	14,5	85,5
8	58	1,63	21,8	78	98	30,8	34	27,5	0,79	7	20	11	11	8	23	13	31,5	14	31,9	27	73
9	65	1,67	23,3	73	100	31,5	36,6	27	0,73	12	21	8	15	19	20	13	31	25	30,2	31	69
10	70,2	1,61	27,8	82	101	34,5	36	32,5	0,81	16	24	35	22	23	30	22	43	17	40,4	38	62
11	55	1,565	23,2	83	94,5	31	32,3	26	0,87	9	17	14	19	15	29	15	35	23	34,6	33,9	66,1
12	74	1,6	28,9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
13	56,8	1,63	21,4	70	99	32,8	33,5	26	0,7	3	13	7	11	7	14	11	28	20	21,8	26	74
14	50	1,62	19,1	66	95	30,1	33	23,7	0,7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	19	81
15	59,5	1,53	25,4	81	102	31,5	32	30	0,79	12	24	17	25	27	23	30	45	25	39	34,1	65,9
16	70	1,67	25,1	83	104	32,8	35,7	28	0,79	15	22	24	23	20	32	34	49	23	35,8	34	66
17	54,9	1,56	22,5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
18	65	1,84	19,2	72,6	90	35,5	33,4	25	0,8	2	6	5	5	11	14	9	12	14	15	12	88
19	77,6	1,795	24,1	86,5	97	38,9	32,5	32,8	0,89	3	7	10	9	12	21	9	16	8	16,2	19	81
20	85	1,79	26,5	91	104	37,8	36,5	33,2	0,87	15	19,5	18	25	23	33	26	20	10	26,6	29	71
21	84	1,81	25,6	100	101	37	36	33,5	0,99	6	17	23	18	14	27	30	15	15	29,3	32	68
22	87	1,67	31,2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
23	54,5	1,7	18,8	67,5	96	32,4	32	30	0,7	2	13	8	5	7	15	11	20	17	23,7	21	79
24	62,3	1,51	27,3	92	103,5	31,5	33,5	31	0,88	25	29	53	30	28	37	52	52	27	41,1	39,7	60,3

Ab: abdominal; BC: bicipital; CM: coxa media; EGC: estimativa de gordura corporal; IMC: Índice de Massa Corporal; MG: massa gorda; MM: massa magra; P: panturrilha; SE: supraescapular; SI: supra ilíaca; TC: tricipital.
ND: dado não disponível

Anexo 3 - Dados bioquímicos individuais dos portadores da Lipodistrofia Familiar Parcial tipo 2 (FPLD2).

Paciente	HbA1C (%)	GJ (mg/dl)	Insulina (uUI/ml)	HOMA	QUICKI	CT (mg/dl)	HDL-c (mg/dl)	LDL-c (mg/dl)	TGL (mg/dl)	Ac.úrico (mg/dl)	AST (mg/dl)	ALT (mg/dl)	Cr (mg/dl)
1	9,1	182	49,2	22	0,33	261	40	150	357	ND	ND	ND	0,82
2	6	94	104,5	24,2	0,29	169	29	102	191	ND	44	43	0,92
3	8,3	119	72,6	21,3	0,31	173	40	101	160	ND	54	64,4	ND
4	ND	78	53,7	10,3	0,36	183	38	77	341	4,7	25	25	0,73
5	11,4	177	28,6	12,4	0,39	142	24	65	142	1,4	74	75	0,59
6	4,7	86	16,5	3,5	0,57	155	35	90	148	ND	19	26	0,65
7	5,6	164	40,7	16,5	0,35	366	21	ND	3848	22,4	78,9	199	0,76
8	6,2	95	63,2	14,8	0,34	219	38	142	195	6,5	24,7	33,5	0,91
9	5,1	70	83,4	14,4	0,32	186	47,5	ND	424	4,4	15,4	13	0,73
10	10,1	101	82,3	20,5	0,31	157	53	78	128	ND	23	26	1,08
11	10,2	132	168,6	54,9	0,25	248	45	ND	441	ND	43	37	1,01
12	9,8	138	66,5	22,6	0,31	155	34	80	205	ND	17,6	17,4	0,56
13	5,6	80	51,7	10,2	0,37	177	37	77	314	6,8	28,1	34,6	0,78
14	ND	75	57,9	10,7	0,36	227	33	162	172	6,6	15	13	0,93
15	9,6	132	79,3	25,8	0,30	231	52	116	323	5,2	28	32	1,04
16	7,6	121	120	35,8	0,28	143	31	62	252	ND	21	34	0,8
17	7,5	99	29,4	7,2	0,43	206	46	135	126	4,3	18	23,7	ND
18	6,1	91	24,3	5,4	0,47	251	35	141	376	7	35,9	42,6	1,34
19	6,2	94	13,6	3,1	0,62	147	39	87	104	4,5	29	49	1,05
20	5,5	79	14,7	2,9	0,61	178	53	112	67	5,1	39	27	1,17
21	5,6	77	8,4	1,6	0,89	153	46	100	33	5,2	32	46	ND
22	5,4	69	37,7	6,4	0,42	150	41	85	120	5,9	36	35	0,99
23	5,1	79	39,7	7,7	0,40	176	52	97	131	ND	20	14,5	0,85
24	ND	84	9,8	3	0,68	181	46	126	47	2	28	34	0,68

HbA1c: hemoglobina glicosilada; GJ: glicemia de jejum; HOMA: Modelo de Avaliação da Homeostase; QUICKI: Índice Quantitativo de Verificação da Sensibilidade Insulínica; HDL-c: colesterol de lipoproteína de alta densidade; LDL-c: colesterol de lipoproteína de baixa densidade; AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase; ND: dado não disponível

Anexo 4 - Dados bioquímicos individuais dos participantes do grupo controle.

Indivíduo	HbA1C (%)	GJ (mg/dl)	Insulina (uUI/ml)	HOMA	QUICKI	CT (mg/dl)	HDL-c (mg/dl)	LDL-c (mg/dl)	TGL (mg/dl)	Ac.úrico (mg/dl)	AST (mg/dl)	ALT (mg/dl)	Cr (mg/dl)
1	5,5	79	7	1,4	1,01	ND	ND	ND	ND	4,4	29	23	0,95
2	5,6	83	3,6	0,7	2,49	166	71	80	75	4,3	23	13	0,91
3	5,3	79	42,3	8,2	0,39	189	48	108	167	3,7	17	21	0,65
4	5,2	81	16,2	3,2	0,58	227	77	118	153	4,6	18,9	10,2	ND
5	5,2	88	7	1,5	0,98	207	43	151	66	3,2	15	13	0,84
6	5,2	71	22,3	3,9	0,52	135	39	85	51	3,3	24	31	0,6
7	5,4	85	11,6	2,4	0,69	166	61	99	31	4	32	24	0,83
8	6,1	75	6,6	1,2	1,11	175	69	92	68	4,2	30,8	14,8	0,85
9	6,1	79	13,3	2,6	0,65	200	72	109	94	ND	29,4	34,4	0,82
10	6,2	85	13,3	2,8	0,64	164	44	104	80	3,6	22	20	0,86
11	6,2	84	8,7	1,8	0,84	219	58	145	80	ND	18,4	23,2	ND
12	ND	94	57,9	13,4	0,35	206	53	125	140	6,3	11	10	0,7
13	5,1	84	5,4	1,1	1,29	171	79	85	33	3,8	15	12	0,64
14	5,8	82	8,7	1,7	0,85	151	37	100	68	2,1	18,3	10,4	0,77
15	5,5	85	28,6	5,9	0,45	212	59	142	54	2,4	17	14	0,82
16	ND	79	15,8	3,1	0,59	199	53	123	113	ND	22,5	22,4	0,83
17	5,4	72	12	2,1	0,71	167	98	58	57	4,3	33	31	0,79
18	4,8	77	12,8	2,4	0,67	168	59	98	58	3,6	18,6	23,1	1,04
19	4,8	91	7	1,6	0,95	159	33	105	105	3,4	15	19	0,97
20	5,4	90	10,9	2,4	0,71	198	45	130	113	6,1	29	36	1,1
21	5,1	85	17,3	3,6	0,56	171	54	105	61	5,1	13,2	15,3	0,95
22	6	81	14,3	2,8	0,62	199	36	122	97	6	31,9	48	ND
23	ND	74	10,3	1,8	0,79	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
24	5,4	96	19,9	4,7	0,51	181	47	111	115	5,8	29	31	0,66

HbA1c: hemoglobina glicosilada; GJ: glicemia de jejum; HOMA: Modelo de Avaliação da Homeostase; QUICKI: Índice Quantitativo de Verificação da Sensibilidade Insulínica; HDL-c: colesterol de lipoproteína de alta densidade; LDL-c: colesterol de lipoproteína de baixa densidade; AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferaseND: dado não disponível

Anexo 5 - Dados das dosagens individuais de adipocinas e citocinas plasmáticas dos portadores da Lipodistrofia Familiar Parcial tipo 2.

Paciente	Adiponectina (ng/ml)	Leptina (ng/ml)	TNF α (pg/ml)	IL-1 β (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	MCP-1 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)
1	19,6	3,2	16,4	4,2	12,5	1003	5,2
2	27,8	4,1	8,3	1,3	0,8	622	13,7
3	30	9,8	30,8	35,4	45	592	20,1
4	26,8	9,1	12,1	17,5	14,5	449	8,6
5	25,2	2,4	11,8	1,1	7,7	308	14,4
6	24,2	4,5	6,5	2,6	1,6	255	8,6
7	14,1	10,7	7,9	2,7	6,2	353	2,2
8	38	1,3	19,1	16,6	27,2	522	13,7
9	25,4	6,2	12,4	3,7	5,6	671	38,6
10	48,4	4,4	15,2	0,7	5,6	289	20,1
11	84,2	22,2	16,4	5,2	16	662	20,6
12	16,8	2,9	7,9	2,9	4,3	863	6,5
13	22,7	12,2	7,2	0,7	1,6	1082	11,2
14	25,5	12,9	10,4	1,6	7,2	954	12,2
15	13,4	7,9	11,3	1,3	3,5	416	15,6
16	11	29,3	9	2,1	5,6	372	5,2
17	15,8	7,6	5	0,7	0,4	542	8,6
18	10,9	6,6	6,5	1	0,8	496	16,4
19	26,1	3,3	8,3	1,6	2,2	285	6,5
20	15,2	3,4	6,3	1,4	1,9	362	6,5
21	23,3	2,2	5,9	1,1	2,2	437	3,9
22	38,6	9,9	19,6	9,8	16,05	592	31,5
23	54,9	30	7,3	2,6	4,9	421	13,7
24	26,4	9,5	1,3	0,6	0,2	293	3,9

TNF α : fator de Necrose Tumoral; IL- interleucina; MCP1: proteína quimiostática de monócito

Anexo 6 - Dados das dosagens individuais de adipocinas e citocinas plasmáticas dos participantes do grupo controle.

Indivíduo	Adiponectina (ng/ml)	Leptina (ng/ml)	TNF α (pg/ml)	IL-1 β (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	MCP-1 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)
1	93,6	6,6	6,8	1,9	2,7	599	6,5
2	68,8	19,1	6,1	0,7	1,1	509	3,9
3	43,7	14,9	12,4	5,5	8,8	268	8,6
4	50,2	18,7	6,8	1,9	1,1	391	6,5
5	59,2	38,7	4,8	0,7	1,1	478	3,3
6	35,8	5,2	3,5	1,45	0,5	300	5,2
7	42,7	0,9	4,3	1,1	3,5	671	10
8	52,2	6,4	6,1	0,7	1,1	490	15,6
9	72,3	24,3	4,9	0,9	1,6	490	5,2
10	63	48,5	6,8	0,9	7,2	688	7,7
11	51,5	37,7	15,6	1,1	4,3	1082	3,6
12	19,1	32,4	6,1	1,1	5,6	761	7,7
13	66,2	5,4	4,5	0,6	0,3	328	1
14	51,5	7,2	2,9	1	0,6	542	3,3
15	68,8	38,7	4,8	2,3	11,3	592	6,5
16	45,4	40,7	6,8	0,8	0,5	381	2,9
17	26,1	6	5,7	1,4	0,4	570	15,6
18	61,4	2	11,8	4,2	8,8	942	10
19	28,5	2,7	9,68	1	0,6	432	11,2
20	43,2	14,3	6,8	0,8	2,7	654	8,6
21	49,6	10,7	7,34	0,8	0,6	622	2,1
22	17,2	10,9	8,11	1,13	0,7	790	11,2
23	42,1	9,5	4,55	1,3	0,5	340	2,1
24	12,7	36,8	5,29	0,8	1,6	437	14,4

TNF α : fator de Necrose Tumoral; IL- interleucina; MCP1: proteína quimiostática de monócito

Anexo 7 - Concentrações individuais de cortisol plasmático e salivar em condições basais e após supressão com diferentes doses de dexametasona dos portadores da Lipodistrofia Familiar Parcial tipo 2.

Paciente	Cortisol Plasmático (ug/dL)				Cortisol Salivar (ng/dL)				
	Basal (8h)	Pós dexametasona			Basal (8h)	23h	Pós dexametasona		
		0,25 mg	0,5 mg	1,0 mg			0,25 mg	0,5 mg	1,0 mg
1	17	13	6,4	0,8	682	110	320	264	<62,4
2	10	3,2	1,2	0,62	341	107	<62,4	<62,4	<62,4
3	9,7	2,2	1,1	1,3	225	127	72	136	<62,4
4	25	ND	ND	ND	358	128	ND	ND	ND
5	7,6	1,35	1,2	0,24	385	190	104	200	<62,4
6	10	ND	0,24	0,24	392	128	ND	96	<62,4
7	8	5,4	1,9	0,24	387	294	300	128	<62,4
8	16	0,24	0,58	1,4	542	78	<62,4	<62,4	<62,4
9	31	24	1,5	0,24	993	248	500	172	72
10	9	ND	2,8	ND	521	97	ND	140	ND
11	15	2,6	1,4	ND	1061	ND	<62,4	ND	ND
12	11	2,5	5	0,82	647	72	480	195	<62,4
13	15,7	2,9	0,24	0,24	493	108	<62,4	<62,4	<62,4
14	8,7	ND	0,24	ND	760	ND	ND	ND	ND
15	18	1,7	1	0,4	427	141	144	<62,4	96
16	10,7	5,9	0,24	0,24	452	184	320	<62,4	104
17	10	5,6	0,24	0,24	302	195	240	136	<62,4
18	21	16,8	2,6	0,9	713	78	560	104	<62,4
19	16	13,8	3,5	0,4	562	83	264	92	<62,4
20	16	11,7	1,3	0,24	713	149	392	<62,4	104
21	9	2,9	0,24	0,24	277	146	172	<62,4	<62,4
22	15	7,8	0,24	0,24	484	169	376	<62,4	144
23	14,9	1,9	0,5	0,49	446	92	100	<62,4	<62,4
24	9,2	4,5	0,24	0,24	241	139	<62,4	<62,4	<62,4

ND: dado não disponível

Anexo 8 - Concentrações individuais de cortisol plasmático e salivar em condições basais e após supressão com diferentes doses de dexametasona dos participantes do grupo controle.

Indivíduo	Cortisol Plasmático (ug/dL)				Cortisol Salivar (ng/dL)				
	Basal (8h)	Pós dexametasona			Basal (8h)	23h	Pós dexametasona		
		0,25 mg	0,5 mg	1,0 mg			0,25 mg	0,5 mg	1,0 mg
1	22	17	0,4	0,8	853	119	608	<62,4	<62,4
2	10	0,24	0,24	0,24	672	220	140	<62,4	<62,4
3	11	0,54	0,24	0,24	568	99	156	108	<62,4
4	19	6,8	0,24	0,24	547	80	160	<62,4	<62,4
5	17	5,6	0,24	0,24	633	173	460	<62,4	<62,4
6	17	3,1	0,24	0,24	580	109	<62,4	<62,4	<62,4
7	17	ND	0,5	0,24	600	245	ND	196	<62,4
8	11	3	0,64	0,4	469	<62,4	<62,4	<62,4	<62,4
9	12	1,25	0,24	0,24	707	173	344	<62,4	<62,4
10	16	4	0,6	0,24	793	<62,4	172	<62,4	<62,4
11	12	6,4	0,4	0,24	473	138	250	<62,4	<62,4
12	13	0,43	0,24	0,24	293	213	<62,4	<62,4	<62,4
13	12	4,2	0,24	0,24	600	79	224	160	<62,4
14	15	ND	0,82	1,35	843	107	ND	116	<62,4
15	14	4,2	0,24	0,24	357	86	<62,4	<62,4	<62,4
16	9	1,5	0,24	0,24	457	100	100	<62,4	<62,4
17	24	ND	0,24	0,58	314	<62,4	ND	<62,4	<62,4
18	17,8	8,8	2,6	0,24	753	<62,4	200	<62,4	<62,4
19	16	12	4,6	0,24	496	<62,4	176	140	<62,4
20	15	4,8	4,7	0,24	447	141	312	<62,4	ND
21	15	ND	2,1	0,7	312	93	ND	<62,4	<62,4
22	10	ND	0,24	0,24	319	69	ND	<62,4	<62,4
23	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
24	19	4,7	1,7	0,24	560	81,2	420	<62,4	<62,4

ND: dado não disponível

Anexo 9 - Concentrações individuais de dexametasona plasmática em condições basais e após o teste de supressão com diferentes doses de dexametasona (DEX) dos portadores da Lipodistrofia Familiar Parcial tipo 2.

Paciente	Dexametasona Plasmática (ug/dL)			
	Basal (8h)	Pós dexametasona		
		0,25 mg	0,5 mg	1,0 mg
1	15,6	32	85	290
2	15,6	88	130	550
3	15,6	130	230	570
4	15,6	ND	ND	ND
5	15,6	74	180	390
6	15,6	ND	110	218
7	15,6	51	170	460
8	15,6	105	300	470
9	15,6	112	180	600
10	15,6	ND	300	ND
11	15,6	74	155	ND
12	15,6	57	430	325
13	15,6	51	255	520
14	15,6	ND	220	ND
15	15,6	190	210	730
16	15,6	31	100	235
17	15,6	19	125	320
18	15,6	24	125	300
19	15,6	62	77	320
20	15,6	56	98	480
21	15,6	76	105	340
22	15,6	122	200	600
23	23	ND	ND	850
24	27	ND	430	700

ND: dado não disponível

Anexo 10 - Concentrações individuais de dexametasona plasmática em condições basais e após o teste de supressão com diferentes doses de dexametasona (DEX) dos participantes do grupo controle.

Indivíduo	Dexametasona Plasmática (ug/dL)			
	Basal (8h)	Pós dexametasona		
		0,25 mg	0,5 mg	1,0 mg
1	25,5	42	135	260
2	15,6	72	275	450
3	15,6	25	390	420
4	15,6	80	130	310
5	15,6	135	185	260
6	15,6	84	90	680
7	20	ND	145	430
8	15,6	88	140	310
9	15,6	72	165	430
10	15,6	62	290	460
11	15,6	ND	270	660
12	15,6	90	155	245
13	22	100	177	600
14	15,6	ND	215	440
15	15,6	85	250	570
16	15,6	130	350	880
17	15,6	ND	105	340
18	15,6	230	265	460
19	15,6	56	148	520
20	15,6	82	300	940
21	15,6	ND	460	1300
22	15,6	ND	180	310
23	16,4	ND	ND	ND
24	15,6	ND	ND	490

ND: dado não disponível

Anexo 11 – Dados individuais de expressão dos genes *GR α* , *GR β* , *11 β -HSD1* e *11 β -HSD2* em células mononucleares de sangue periférico dos portadores da Lipodistrofia Familiar Parcial tipo 2.

Paciente	EXPRESSÃO GÊNICA			
	<i>GRα</i>	<i>GRβ</i>	<i>11β-HSD1</i>	<i>11β-HSD2</i>
1	1,07	1,54	1,61	0,22
2	0,16	0,36	1,07	0,94
3	1,50	1,09	2,43	1,25
4	1,20	0,59	0,74	0,22
5	1,41	1,13	1,00	0,22
6	1,04	0,96	0,69	1,65
7	0,49	1,37	0,67	0,83
8	1,93	1,20	1,16	0,22
9	1,37	0,22	0,77	0,22
10	1,00	2,06	0,64	0,38
11	0,23	1,40	1,89	0,22
12	1,01	0,49	1,80	1,21
13	1,31	0,99	3,83	0,22
14	1,23	0,57	0,96	0,22
15	0,45	1,44	5,32	0,22
16	0,32	1,15	2,85	2,58
17	0,59	0,28	1,74	0,22
18	1,13	2,59	5,68	4,73
19	2,35	7,22	8,10	0,22
20	0,37	0,27	1,15	0,22
21	0,93	0,54	3,62	0,36
22	0,24	0,13	0,18	0,22
23	1,24	1,51	0,38	0,22
24	1,21	2,07	4,87	5,08

ND: dado não disponível

Anexo 12 – Dados individuais de expressão dos genes *GR α* , *GR β* , *11 β -HSD1* e *11 β -HSD2* em células mononucleares de sangue periférico dos participantes do grupo controle.

Indivíduo	EXPRESSÃO GÊNICA			
	<i>GRα</i>	<i>GRβ</i>	<i>11β-HSD1</i>	<i>11β-HSD2</i>
1	0,04	0,13	0,54	0,22
2	0,77	0,42	0,37	0,22
3	ND	ND	ND	ND
4	0,91	1,08	1,17	0,22
5	2,46	1,42	1,00	3,18
6	1,08	0,93	2,55	1,05
7	1,58	2,07	0,74	0,22
8	0,68	0,13	0,54	0,22
9	0,84	0,13	0,59	2,60
10	1,78	0,30	1,27	0,22
11	1,28	0,54	1,34	0,22
12	1,24	4,70	4,28	0,69
13	0,76	0,13	0,34	0,22
14	ND	ND	ND	ND
15	1,20	1,20	0,96	0,22
16	1,36	0,41	2,32	2,42
17	1,79	10,88	3,90	3,45
18	0,71	2,16	0,57	0,95
19	2,05	0,88	3,82	0,72
20	0,81	0,19	0,95	0,34
21	1,00	1,20	0,77	0,69
22	0,69	1,12	3,64	2,10
23	ND	ND	ND	ND
24	0,81	0,37	2,20	0,22

ND: dado não disponível

Anexo 13 – Termo de consentimento livre e esclarecido para indivíduos saudáveis.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO -
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA INDÍVIDUOS SAUDÁVEIS**ESCLARECIMENTOS AO SUJEITO DA PESQUISA**

Nome da Pesquisa: **Avaliação da sensibilidade aos glicocorticóides em portadores de Lipodistrofia Parcial Familiar tipo 2**

Pesquisadores responsáveis: Profa. Dra. Margaret de Castro/ Ana Teresa P. Resende

Patrocinador que apóia financeiramente a pesquisa: CNPq

INFORMAÇÕES AOS INDIVÍDUOS CONTROLES DA PESQUISA:

Pedimos sua autorização para que você possa participar, como controle saudável, de uma pesquisa em que vamos estudar a maneira como o organismo humano responde a uma pequena dose de um medicamento que se chama dexametasona, muito semelhante à cortisona que nosso corpo produz. Para isso, precisamos que você concorde com a retirada de um pouco de seu sangue (2 colheres de sopa) e um pouco de sua saliva (1 colher de sobremesa) conforme será explicado em detalhes mais abaixo. Com esse sangue e saliva, vamos dosar os níveis do seu cortisol (para assim estudar a resposta do seu organismo à dexametasona) e ainda avaliar seus níveis de açúcares, gorduras e outros hormônios no sangue. Pretendemos avaliar também as suas medidas de peso, altura, pressão arterial e circunferência abdominal. Estes resultados serão comparados aos de um grupo de pacientes com uma doença chamada Lipodistrofia Parcial Familiar tipo 2.

Estas avaliações (clínicas e laboratoriais) serão realizadas no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. Como você já vem regularmente ao hospital (para seu trabalho ou estudo), iremos combinar com você para realizá-las em dias que não atrapalhem as suas atividades. Isto é, não haverá necessidade de seu deslocamento ao hospital exclusivamente para coletar material para a pesquisa. Depois de combinarmos o melhor dia, eu estarei esperando por você, no balcão azul da endócrino, para te acompanhar até o local correto. As coletas dos exames de sangue serão feitas no laboratório da Unidade de Pesquisa Clínica do Hospital, por profissionais capacitados, com material descartável e limpo, e com todas condições de segurança. Além disso, as quantidades retiradas de sangue e o tempo entre cada uma das coletas NÃO causarão prejuízo à sua saúde. Os problemas com a retirada do sangue ficam apenas na dor leve da picada da agulha e raramente pode aparecer uma mancha roxa no local da picada. Todas as medidas serão tomadas para evitar ou minimizar estes desconfortos e estaremos presentes e à disposição para ajudá-lo caso surjam dúvidas ou problemas.

As coletas de sangue e saliva para a dosagem hormonal do cortisol serão feitas antes e após o uso de uma pequena dose da dexametasona (fármaco muito semelhante à cortisona conforme explicamos acima). Este medicamento, quando tomado nas doses pequenas e em intervalos maiores de uma semana como você vai tomar, também NÃO traz prejuízos à sua saúde.

Para você entender melhor, vamos explicar como serão feitos estes exames:

- 1- Os exames de sangue e saliva serão feitos em 3 etapas. Cada etapa será com uma pequena dose da dexametasona – 0,25 mg (meio comprimido), 0,5 mg (um comprimido) e 1 mg (dois comprimidos).

- 2- Na 1ª etapa colheremos um pouco de seu sangue (2 colheres de sopa) e um pouco de sua saliva (1 colher de sobremesa) entre às 8h e 9h da manhã. Na noite anterior ao próximo dia combinado (às onze horas da noite) você irá colher em sua casa mais um pouco de saliva (mastigando o algodão contido no “tubinho” de salivete que iremos te fornecer) e logo em seguida irá tomar (por boca) o comprimido de dexametasona na dosagem específica que também vamos te fornecer sem qualquer custo. Assim, na manhã do dia seguinte, quando vier para o hospital irá trazer o tubinho com a saliva que colheu à noite e vamos fazer nova coleta de sangue (1 colher de sopa) e saliva (1 colher de sobremesa) no laboratório do hospital.
- 3- Vamos repetir esta sequência de coletas para as outras duas doses da dexametasona. Como precisaremos aguardar pelo menos uma semana para fazer estes próximos exames, vamos sempre verificar com você qual o melhor dia para isso.
- 4- No dia combinado para a 2ª etapa, colheremos sangue (2 colheres de sopa) e um pouco de sua saliva (1 colher de sobremesa) no laboratório do hospital. Na noite anterior ao próximo dia que vamos combinar, você irá colher novamente em sua casa um pouco de saliva e tomará a segunda dose que te entregaremos da dexametasona. No dia seguinte, quando vier ao hospital, faremos as novas coletas de sangue (1 colher de sopa) e saliva (1 colher de sobremesa).
- 5- A 3ª etapa será combinada e realizada da mesma forma.

Com esta pesquisa, queremos entender melhor os mecanismos que podem estar envolvidos na doença lipodistrofia e para tanto você nos auxiliará, caso concorde, participando do grupo de pessoas que chamamos de controle saudável (não portador da Lipodistrofia). Acreditamos que a pesquisa não possui nenhum benefício direto para você que participa, mas ela no futuro talvez possa ajudar várias pessoas, pois acreditamos que permitirá descobrir mais informações que nos levem a encontrar mais rapidamente pessoas doentes e melhorar o tratamento delas.

Você não terá nenhum gasto com essa pesquisa. Se você não quiser participar, não terá nenhum problema. Se você aceitar participar, todas as dúvidas sobre a pesquisa serão respondidas e será mantido o caráter confidencial das informações relacionadas à sua privacidade (em nenhum momento identificaremos seu nome ou dados pessoais na pesquisa). Você receberá uma das vias deste termo, o qual será feito em 2 vias idênticas contendo nossas assinaturas (pesquisadores) e a sua (indivíduo saudável) em cada uma das páginas. Caso você queira desistir, o poderá fazer em qualquer momento durante a pesquisa, sem que isso lhe traga qualquer prejuízo. Nossos telefones 16- 3602-2254 e 16-3602-2936 estarão disponíveis e você poderá telefonar a qualquer hora para tirar dúvidas. Incluímos também o telefone do **Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Ribeirão Preto** para que possa esclarecer outras eventuais dúvidas éticas: 016-3602-2228

Ribeirão Preto, SP

Pesquisadores Responsáveis :

Ass: _____ Data: _____

Profa. Dra. Margaret de Castro / CRM 45590 / Telefone: 16- 3602-2254

Ass: _____ Data: _____

Mestranda Ana Teresa Prata Resende / N° USP 9357411/ Telefone: 16-3602-2936/ 62-8147-7704

Indivíduo saudável:

Ass: _____ Data: _____

Participante do grupo Controle Saudável da Pesquisa (maior de 18 anos de idade)

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO -
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA INDÍVIDUOS SAUDÁVEIS

EU, _____,
abaixo assinado, tendo sido esclarecido sobre todas as condições que constam do documento
“**ESCLARECIMENTOS AO SUJEITO DA PESQUISA PARA INDÍVIDUOS SAUDÁVEIS**”, de que trata o Projeto de Pesquisa intitulado “**Avaliação da sensibilidade aos glicocorticóides em portadores de Lipodistrofia Parcial Familiar tipo 2**”, que tem como pesquisador responsável a Professora Dra. Margaret de Castro e a mestranda Ana Teresa Prata Resende, declaro que tenho pleno conhecimento dos direitos e das condições que me foram assegurados, a seguir relacionados:

- A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida durante a realização do estudo;
- A liberdade de retirar o meu consentimento e deixar de participar do estudo a qualquer momento, sem que isso me traga qualquer prejuízo;
- A segurança de que não serei identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada a minha privacidade;
- O compromisso de que me será prestada informação atualizada durante o estudo, mesmo que essa possa afetar a minha vontade de continuar dele participando;
- O compromisso de que serei devidamente acompanhado durante todo o período de minha participação no projeto.

Declaro, ainda, que concordo inteiramente com as condições que me foram apresentadas e que, livremente, manifesto a minha vontade em participar do referido projeto.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de _____

Assinatura do indivíduo saudável (maior de 18 anos de idade)

Participante do Grupo Controle saudável da pesquisa

Anexo 14 – Termo de consentimento livre e esclarecido para paciente com Lipodistrofia Parcial Familiar tipo 2.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO -
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PACIENTE COM LIPODISTROFIA PARCIAL FAMILIAR TIPO 2

ESCLARECIMENTOS AO SUJEITO DA PESQUISA

NOME DA PESQUISA: Avaliação da sensibilidade aos glicocorticóides em portadores de Lipodistrofia Parcial Familiar tipo 2

Pesquisadores responsáveis: Profa. Dra. Margaret de Castro/ Ana Teresa P. Resende

Patrocinador que apóia financeiramente a pesquisa: CNPq

INFORMAÇÕES AOS PACIENTES DA PESQUISA:

Como você já sabe, você foi diagnosticado com uma doença rara chamada Lipodistrofia Parcial Familiar tipo 2. Esta doença, geralmente, cursa com várias alterações do metabolismo das gorduras e açúcares, causando diabetes, elevação do colesterol e triglicerídeos, gordura no fígado, além de outras alterações no depósito e distribuição da gordura no corpo (acúmulo de gordura no abdome e pescoço e a falta dela nas pernas, braços e nádegas). Os estudos atuais mostram que, em algumas pessoas, estas alterações metabólicas podem estar relacionadas com uma resposta alterada do organismo aos efeitos de um hormônio que naturalmente produzimos (chamado cortisol).

Pedimos sua autorização para que participe de uma pesquisa em que vamos estudar a quantidade que seu organismo produz deste hormônio (cortisol) no sangue e na saliva e como ele responde a uma pequena dose de um medicamento que se chama dexametasona, muito semelhante à cortisona que nosso corpo produz. Vamos estudar também outros hormônios, açúcares e gorduras. Para isso, se você concordar, vamos avaliar suas medidas de peso, altura, circunferência abdominal e consultar algumas informações no seu prontuário do hospital. Precisamos também que você concorde com a retirada de um pouco de seu sangue (o equivalente a 2 colheres de sopa) e um pouco de sua saliva (1 colher de sobremesa) antes e após pequenas doses da dexametasona conforme vamos te explicar com detalhes mais abaixo.

Estas coletas para os exames de sangue serão feitas no laboratório da Unidade de Pesquisa Clínica do Hospital das Clínicas, por profissionais capacitados, com material descartável e limpo, e com todas condições de segurança. Como você vem de rotina ao hospital para suas consultas e coletas de exames, vamos combinar de fazer nossas avaliações da pesquisa nestes mesmos dias de maneira que não lhe traga prejuízo ou custos. Isto é, não haverá necessidade de seu deslocamento ao hospital exclusivamente para coletar material para a pesquisa. Assim, no dia e horário combinados, eu estarei esperando por você no balcão azul da endócrino para te acompanhar até o local correto da nossa coleta.

Para você saber, as quantidades retiradas de sangue e o tempo entre cada uma das coletas NÃO causarão prejuízo a sua saúde. Os problemas com a retirada do sangue ficam apenas na leve dor no momento da picada da agulha e raramente pode aparecer uma mancha roxa no local da picada. Mas todas as medidas serão tomadas para evitar ou minimizar estes desconfortos e estaremos presentes e à disposição para auxiliá-lo caso surjam dúvidas ou problemas.

Para você entender melhor, vamos explicar como serão feitos estes exames:

- 6- os exames de sangue e saliva serão feitos em 3 etapas. Cada etapa será com uma pequena dose da dexametasona – 0,25 mg (meio comprimido), 0,5 mg (um comprimido) e 1 mg (dois comprimidos).
- 7- Iniciaremos a 1ª etapa da pesquisa, na manhã do dia que você vier ao hospital para realizar seus exames de rotina. E então, incluiremos na coleta a retirada de um pouco de seu sangue (2 colheres de sopa) e um pouco de sua saliva (1 colher de sobremesa) para a pesquisa. Na noite anterior ao próximo dia que for retornar ao hospital para a sua consulta de rotina (às onze horas da noite) você irá colher em sua casa mais um pouco de saliva (mastigando o algodão contido no “tubinho” de salivete que iremos te fornecer)e logo em seguida irá tomar (por boca) o comprimido de dexametasona na dosagem específica que também vamos te fornecer sem qualquer custo. Assim, na manhã do dia seguinte, quando vier para a sua consulta irá trazer o tubinho com a saliva que colheu e vamos fazer nova coleta de sangue (1 colher de sopa) e saliva (1 colher de sobremesa) no laboratório do hospital.
- 8- Vamos repetir esta sequência de coletas para as outras duas doses da dexametasona. Para estas próximas coletas, daremos sempre um intervalo maior que uma semana, e então aguardaremos os seus próximos retornos de consultas ou de exames de rotina para combinar com você qual o melhor dia para isso.
- 9- No dia combinado para a 2ª etapa, colheremos sangue (2 colheres de sopa) e um pouco de sua saliva (1 colher de sobremesa) no laboratório do hospital. Na noite anterior ao seu próximo retorno, você irá colher novamente em sua casa a saliva e tomará a segunda dose que te entregaremos da dexametasona. No dia seguinte, quando retornar para sua consulta, faremos as novas coletas de sangue (1 colher de sopa) e saliva (1 colher de sobremesa) no hospital.
- 10- A 3ª etapa será combinada e realizada da mesma forma.

Com esta pesquisa, queremos entender melhor os mecanismos que podem estar envolvidos em sua doença (lipodistrofia) e assim, no futuro, talvez possamos ajudar várias pessoas com informações que nos levem a encontrar mais rapidamente aquelas que tenham a doença e melhorar o tratamento da lipodistrofia. Você não terá nenhum gasto com essa pesquisa. Se você não quiser participar, não terá nenhum problema e o seu tratamento médico continuará o mesmo.

Se você aceitar participar, todas as dúvidas sobre a pesquisa serão respondidas, você será devidamente acompanhado durante a realização do projeto e após o término dele terá a continuidade do seu tratamento normalmente. Será mantido o caráter confidencial das informações relacionadas à sua privacidade (em nenhum momento identificaremos seu nome ou dados pessoais na pesquisa) e você receberá uma das vias deste termo, o qual será feito em 2 vias idênticas contendo nossas assinaturas (pesquisadores) e a sua (paciente com Lipodistrofia Familiar Parcial tipo 2) em cada uma das páginas.

Caso você queira desistir durante a pesquisa, o poderá fazer em qualquer momento, sem que isso lhe traga qualquer prejuízo e o tratamento que você estava fazendo antes (Peters et al. 1998) continuará da mesma forma. Nossos telefones 16- 3602-2254 e 16-3602-2936 estarão disponíveis e você poderá telefonar a qualquer hora para tirar dúvidas. Incluímos também o telefone do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Ribeirão Preto para que possa esclarecer outras eventuais dúvidas éticas: 16-3602-2228.

Ribeirão Preto, SP

Pesquisadores Responsáveis :

Ass: _____ Data: _____

Profa. Dra. Margaret de Castro / CRM 45590 / Telefone:16- 3602-2254

Ass: _____ Data: _____

Mestranda Ana Teresa Prata Resende / N° USP 9357411/ Telefone: 16-3602-2936/ 62-8147-7704

Paciente Portador de Lipodistrofia Parcial Familiar tipo 2:

Ass: _____ Data: _____

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO -
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PACIENTE COM LIPODISTROFIA PARCIAL FAMILIAR TIPO 2**

EU, _____, abaixo assinado, tendo sido esclarecido sobre todas as condições que constam do documento “**ESCLARECIMENTOS AO SUJEITO DA PESQUISA PARA PACIENTE COM LIPODISTROFIA PARCIAL FAMILIAR TIPO 2**”, de que trata o Projeto de Pesquisa intitulado “**Avaliação da sensibilidade aos glicocorticóides em portadores de Lipodistrofia Parcial Familiar tipo 2**” que tem como pesquisadores responsáveis a Professora Dra Margaret de Castro e a mestrande Ana Teresa Prata Resende, declaro que tenho pleno conhecimento dos direitos e das condições que me foram assegurados, a seguir relacionados:

- A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida durante a realização do estudo;
- A liberdade de retirar o meu consentimento e deixar de participar do estudo a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo à continuidade do meu tratamento;
- A segurança de que não serei identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada a minha privacidade;
- O compromisso de que me será prestada informação atualizada durante o estudo, mesmo que essa possa afetar a minha vontade de continuar dele participando;
- O compromisso de que serei devidamente acompanhado durante todo o período de minha participação no projeto, bem como de que será garantida a continuidade do meu tratamento, após a conclusão dos trabalhos da pesquisa.

Declaro, ainda, que concordo inteiramente com as condições que me foram apresentadas e que, livremente, manifesto a minha vontade em participar do referido projeto.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de _____

Assinatura do paciente (maior de 18 anos de idade)

Participante do Grupo portadores de Lipodistrofia Familiar Parcial tipo 2

Anexo 15 – Aprovação Comitê de Ética.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Ribeirão Preto, 11 de novembro de 2015

Ofício nº 4021/2015
CEP/MGV

Prezadas Senhoras,

O trabalho intitulado **“AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE AOS GLICOCORTICOIDES EM PORTADORES DE LIPODISTROFIA PARCIAL FAMILIAR TIPO 2” – versão 2.0, de 29/08/2015**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 417ª Reunião Ordinária realizada em 09/11/2015 e enquadrado na categoria: **APROVADO**, bem como o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – para paciente com lipodistrofia parcial familiar tipo 2 - versão 2, de 28/08/2015** e o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – para indivíduos saudáveis - versão 2, de 28/08/2015**, de acordo com o Processo HCRP nº 10233/2015.

De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 466/12 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente,

DR^a. MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA

Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimas Senhoras

ANA TERESA PRATA RESENDE

PROF^a. DR^a. MARGARET DE CASTRO (Orientadora)

Depto. de Clínica Médica

Anexo 16 – Manuscrito para publicação em Revista Científica.

CLINICAL RESEARCH ARTICLE

Phenotypic Diversity and Glucocorticoid Sensitivity in Patients with Familial Partial Lipodystrophy Type 2

Authors: Ana Teresa Prata Resende^{1#}, Clarissa Silva Martins^{1#}, Ana Carolina Bueno², Ayrton Custódio Moreira¹, Maria Cristina Foss-Freitas¹, Margaret de Castro¹.

#Authors A.T.P.R. and C.S.M. contributed equally to this work.

Affiliations: Departments of ¹Internal Medicine and ²Pediatrics; Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo, Brazil.

Precis: Familial Partial Lipodystrophy patients exhibit phenotypic heterogeneity related to the site of *LMNA* mutation and decreased glucocorticoid sensitivity, due to a proinflammatory state.

Corresponding author and person to whom reprint requests should be addressed:

Margaret de Castro (email: castrom@fmrp.usp.br)

Department of Internal Medicine, Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo.

Av Bandeirantes, 3900. 14049-900 Ribeirao Preto, SP, Brazil.

Fax number: 55 16 3633-6695. Telephone number: 55 16 3602-3940.

Short title:

Glucocorticoid sensitivity in FPLD2

Abstract

Context: Familial partial lipodystrophy type 2 (FPLD2) is characterized by insulin resistance, adipose atrophy of the extremities, and central obesity. Due to the resemblance with Cushing's syndrome, we hypothesized a putative role of glucocorticoid in the pathogenesis of metabolic abnormalities in FPLD2.

Objective: To evaluate the phenotypic heterogeneity and glucocorticoid sensitivity in FPLD2 patients exhibiting the p.R482W or p.R644C *LMNA* mutations.

Methods: Prospective study with FPLD2 patients (n=24) and controls (n=24), who underwent anthropometric, body composition, metabolic profile, adipokines/cytokines plasma measurements. Plasma and salivary cortisol were measured in basal conditions and after 0.25, 0.5, and 1.0mg of dexamethasone (DEX) given at 2300h. Glucocorticoid receptor (*GR*) and *11βHSD* isoforms expression were assessed by qPCR.

Results: FPLD2 individuals presented increased waist and neck circumferences, decreased hip circumference, peripheral skinfold thickness, and fat mass. Patients presented increased HOMA-IR, triglycerides, TNF- α , IL-1 β , IL-6, and IL-10, and decreased adiponectin and leptin plasma levels. FPLD2 patients showed decreased ability to suppress the HPA axis compared with controls after 0.5mg DEX. The phenotype was more pronounced in patients harboring the p.R482W *LMNA* mutation. *GRβ* overexpression was observed in female patients compared with female controls.

Conclusions: FPLD2 patients exhibited anthropometric, clinical, and biochemical phenotypic heterogeneity related to *LMNA* mutation sites and to gender. *LMNA* mutations affecting both lamin A and C lead to more severe phenotype. FPLD2 patients also showed blunted HPA axis response to DEX, probably due to the association of increased levels of proinflammatory cytokines with *GRβ* overexpression leading to a more severe phenotype in female.

Keywords: Familial Partial Lipodystrophy Type 2, Insulin resistance, Metabolic Syndrome, Glucocorticoid sensitivity

1. Introduction

Congenital lipodystrophic syndromes comprise a heterogeneous group of diseases, characterized by generalized or partial lipoatrophy and metabolic complications (1). Familial partial lipodystrophy type 2 (FPLD2), also referred as Dunnigan syndrome or lipoatrophic diabetes, is a rare autosomal dominant disorder (OMIM 151660), which estimated incidence is 1 case per 15 million persons (2). Affected patients typically present pubertal onset of gradual subcutaneous adipose tissue atrophy from the extremities and trunk, with muscular hypertrophic appearance, and excessive adipose accumulation on the face, chin, neck, and supraclavicular area associated to an increase in visceral adipose deposition (3). Frequent metabolic complications include insulin resistance, acanthosis nigricans, diabetes mellitus, hypertriglyceridemia, reduced concentrations of high density lipoprotein (HDL) cholesterol, metabolic syndrome, liver steatosis, ovarian hyperandrogenism, and atherosclerotic vascular disease. Although both sexes are equally affected, women usually exhibit a more obvious and severe phenotype (4,5). FPLD2 mimics Cushing's syndrome, as its phenotype creates an impression of truncal obesity as well as metabolic derangements (6). However, there is no previous study evaluating glucocorticoid sensitivity in FPLD2.

Missense mutations in the *LMNA* gene (1q21-22) were reported as responsible for FPLD2 (7) and for other disorders termed laminopathies, including diseases affecting muscle tissues, axonal neurons, and progeroid syndromes (1). The majority of the mutations associated with FPLD2 lies within exon 8 of the *LMNA* gene, notably at 482 residue, and affect both lamin A and C, which originate from alternative splicing of the *LMNA* gene and locate at the nuclear envelope, as component of the nuclear lamina. Phenotypic heterogeneity has been observed among different *LMNA* mutations and those affecting both splice forms, lamins A and C, seems to result in more severe phenotype (5,8).

In the present study, we compared clinical characteristics, physical features, body fat distribution, metabolic parameters, and inflammatory state among five families exhibiting two different *LMNA* mutations, the p.R482W in exon 8 or the p.R644C in exon 11, to investigate the phenotypic heterogeneity between FPLD2 carriers and also with the healthy controls. Furthermore, due to the phenotypic similarity of FPLD2 and Cushing's syndrome, we hypothesized the putative involvement of glucocorticoid (GC) in the pathogenesis of the metabolic abnormalities observed in FPLD2.

2. Subjects and Methods

Subjects

This study was approved by the Institutional Ethical Committee (Process n°10233/2015) and according to the Declaration of Helsinki requirements, written informed consent was obtained from all subjects.

We studied 33 subjects from five apparently unrelated families, which had at least one FPLD2 affected member followed at the Division of Endocrinology, University Hospital of the Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo. Fourteen of the FPLD2 subjects had been previously sequenced and studied regarding the pattern of adipose tissue distribution using Dual-energy X-ray absorptiometry (9), but two of them did not agree to participate in the present study. Nineteen new subjects were investigated: 12 presented *LMNA* mutation and seven were negative for the mutation. Thus, 24 patients with FPLD2 (18women/ 6 men) were included in the present study.

A group of 24 healthy individuals matched for sex, age and body mass index (BMI) were recruited as controls. These subjects had a normal fat distribution and showed no family history of lipodystrophy. To avoid gender influences, due to the predominance of female patients, we also analyze data excluding male subjects, when appropriated.

The diagnosis of FPLD2 was based on clinical signs and symptoms with subsequent confirmation of *LMNA* mutation. The exclusion criteria were clinical history of diabetes chronic complications (retinopathy, neuropathy, kidney disease, or evidence of ischemic heart disease within the last six months), pregnancy, neoplasia, use of drugs containing glucocorticoids, estrogens, androgens, anticoagulants, or immunosuppressive agents.

Screening for *LMNA* mutations

Genomic DNA was isolated from blood samples, using QIAmp Blood Kit (QIAGEN, Hilden, GE), according to the manufacturer's instructions. The FPLD2 implicated exons 2, 7, 8-9 and 11 of the *LMNA* gene were amplified by PCR. Subsequently, PCR products were sequenced using standard Sanger technique and commercial kit (ABI Prism® Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit; Applied Biosystems, Life Technologies, Foster City, CA, USA) using primers previously described (9,10). The obtained sequences were compared to *LMNA* gene reference sequence (GenBankNG_008692.2) using the CodonCode Aligner Program V4.0.4 (CodonCode Co.).

Anthropometric parameters

Circumferences were measured using an inelastic tape with one millimeter precision. With the patient standing in upright position, waist circumference was measured at the midpoint between the inferior margin of the last rib and the upper iliac crest. The hip circumference was obtained at the level of the greater trochanter, at the maximum protruding part of the buttocks, with the patient standing with feet together. The upper arm circumference was obtained at the midpoint between the lateral projection of the acromion process of the scapula and the inferior margin of the olecranon process of the ulna. With the patient sitting up straight, the neck circumference was measured at the midpoint between the hyoid and manubrium bones, and the calf circumference was measured at the midpoint between the highest point of patella and floor plane. Waist to hip ratio and Body Mass Index [(BMI = weight(kg)/height(m)²)] were calculated.

Skinfold thickness was measured with a Lange caliper (Beta Technology Incorporated, Cambridge, MD) at five truncal (chest, midaxillary, abdominal, subscapular, and suprailiac) and four peripheral (biceps, triceps, thigh, and calf) sites. The mean of three repeated measurements at each site was calculated.

Body composition calculation

Percentage of body fat mass was calculated using the skinfold thickness measurements with the Durin and Womersley's equation (11).

Bioelectrical Impedance Analysis (BIA) included measurements of resistance and reactance by BIA 450Bioimpedance Analyzer (Biodynamics Corp, Shoreline, WA, USA). Patients and controls were 12-hour fasted, with empty bladder and all metal objects were removed before the measurements. Electrodes were attached at standardized positions on the dominant side of the body. Fat mass, lean mass and body water were estimated using resistance and reactance with the prediction equation contained in the manufacturer's software.

Biochemical and hormonal parameters measurement

HbA1c was measured by High Performance Liquid Chromatography (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Glucose, lipids [triglyceride (TGs) and total cholesterol (TC)], uric acid, creatinine, and hepatic transaminases were measured in plasma sample by enzymatic spectrophotometry method (Thermo

Fisher Scientific, Vantaa, FI). High-density lipoprotein (HDL) concentration was measured without precipitation by colorimetric method (Thermo Fisher Scientific, Vantaa, FI). Low-density lipoprotein LDL was calculated with the Friedewald formula [$LDL = TC - (TGs/5 + HDL)$].

Plasma levels of insulin, adiponectin, leptin, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, and MCP-1 levels were analyzed by LuminexMAP technology using Milliplex® kits (Merck Millipore Corporation, Merck KGaA, Darmstadt, German): HADK1MAG-61K-01 (Adiponectin), HADK2MAG-61K-06 (Insulin, Leptin, TNF- α , IL-1 β , IL-6, MCP-1), and HCYTOMAG-60K-01 (IL-10).

Glucose and insulin levels were used to calculate Homeostasis Model Assessment Insulin Resistance (HOMA-IR) and quantitative insulin sensitivity check index (QUICKI).

Plasma and salivary cortisol after overnight dexamethasone suppression test .

Plasma and salivary cortisol were measured by radioimmunoassay (RIA), as previously described (12), in basal conditions and after 0.25, 0.5, and 1.0mg of dexamethasone (DEX). At 2300 h, randomized doses of DEX were administered orally, at an interval of at least two weeks. In the next morning, between 0700 and 0800 h, post-DEX samples were taken for plasma and salivary cortisol measurements. As criteria of HPA axis suppression, we used plasma cortisol levels of <50 nmol/L (13) and salivary cortisol <2.6 nmol/L, based on the highest level observed in normal population, as we previously published (12).

DEX levels were measured by RIA using a polyclonal antiserum obtained from rabbits immunized with DEX 21-acetate (Sigma, St. Louis, MO, USA) and [3H]DEX (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). All samples obtained from each individual were analyzed in duplicate in the same assay.

NR3C1 and 11 β HSD isoforms expression analysis

RNA from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) was isolated by TRIzol® RS Reagent (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Sample concentration was measured by spectrophotometry at an absorbance of 260/280 nm using NanoDrop TM 2000/2000c (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware, USA) and RNA integrity was evaluated by agarose gel electrophoresis. cDNA was obtained using High capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Life Technologies, Foster City, CA, USA).

The qPCR was performed with 7500 RT-PCR System (Applied Biosystems, Life Technologies, Foster City, CA, USA). The TaqMan custom assay was used for *NR3C1 GR α* (TaqMan® Gene Expression Assay 395404) and on demand for *NR3C1 GR β* (Hs00354508_m1), *11 β HSD* subtype 1 (Hs01547870), *11 β HSD* subtype 2 (Hs00388669), and reference genes *TBP*(4326322E) and *GUSB* (4326320E). Reactions were incubated in a 96-well optical plate at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 sec and 60°C for 1 min. The cycle threshold (Ct) was defined as the fractional cycle number at which the fluorescence surpasses the fixed threshold. Data were presented as the Ct of each sample of each target gene normalized by the reference genes Ct-median expression and calibrated by Δ Ct-median value obtained from controls. Relative expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (14).

Statistical Analysis

Mann-Whitney and Friedman tests were used for continuous variables. Fisher's exact test was used for categorical variables. Data were analyzed by *GraphPad Prism 5* software and differences were considered significant at $p \leq 0.05$. A nonlinear dose-response regression was used to estimate individual IC50 values of DEX dose needed to suppress plasma cortisol.

3. Results

Patients with FPLD2 exhibited two different *LMNA* mutations: the p.R482W in exon 8 (13 women/ 1 man) or the p.R644C in exon 11 (5 women/ 5 men). Patients with the p.R482W mutation noticed the FPLD2 phenotype in an earlier age than patients harboring the p.R644C mutation (14.4 ± 3.23 vs. 28.0 ± 9.35 years, $p < 0.01$). The studied FPLD2 patients exhibited high frequency of associated chronic diseases and these comorbidities tended to be more prevalent in the p.R482W group compared to the p.R644C group (**Table 1**). There was no difference between genders in the prevalence of these comorbidities, except for nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), which was more prevalent in female ($p = 0.02$). Of note, two of the six male patients with FPLD2 presented oligospermia.

The anthropometric parameters of patients with FPLD2 and controls are shown in **Table 2**. Compared with controls, the FPLD2 individuals presented increased waist and neck circumferences ($p = 0.008$ and $p < 0.0001$, respectively), decreased hip circumference ($p = 0.0007$), and decreased

peripheral skinfold thickness at three out of four evaluated sites. The FPLD2 group also exhibited decreased total fat mass ($p=0.01$) and increased fat-free mass ($p=0.01$) evaluated by BIA. The differences on waist, neck and hip circumferences, and fat mass observed in the whole group were maintained when comparing female FPLD2 patients with female controls. Furthermore, in FPLD2 women, decreased peripheral and truncal skinfold thickness occurred in a greater number of evaluated sites [biceps ($p=0.02$), abdominal ($p=0.04$), and suprailiac ($p=0.03$)] besides those observed in whole FPLD2 group.

Table 2 also shows the anthropometric parameters of patients with FPLD2 harboring the p.R482W and p.R644C mutations. We observed a phenotypic diversity. Patients presenting the p.R482W mutation exhibit a typical phenotype, while the patients with the p.R644C mutation present mild phenotype. Patients with the p.R482W mutation exhibited decreased upper arm circumference ($p<0.001$), truncal and peripheral skinfold thickness, fat mass ($p=0.02$), and increased fat-free mass ($p=0.02$) evaluated by BIA compared with the p.R644C mutation. The female patients harboring the p.R482W mutation also exhibited more severe phenotype regarding anthropometric parameters compared with female p.R644C patients.

Table 3 shows the biochemical characteristics of patients with FPLD2 and controls. Compared with controls, the FPLD2 individuals presented increased plasma levels of glycemia ($p=0.02$), glycated hemoglobin ($p=0.001$), insulin ($p<0.0001$), HOMA-IR ($p<0.0001$), triglycerides ($p<0.0001$), uric acid ($p=0.02$), AST ($p=0.03$), and ALT ($p=0.005$), with decreased QUICKI ($p<0.0001$) and HDL-cholesterol ($p=0.0004$). Patients with p.R482W exhibited higher levels of insulin ($p=0.02$), HOMA-IR ($p=0.02$), triglycerides ($p=0.03$), decreased QUICKI ($p=0.02$), and creatinine ($p=0.04$) compared with the p.R644C group.

Compared with controls, the FPLD2 individuals presented decreased plasma levels of adiponectin ($p=0.0002$) and leptin ($p=0.03$) and increased plasma levels of TNF- α ($p=0.001$), IL-1 β ($p=0.01$), IL-6 ($p=0.01$), and IL-10 ($p=0.01$). There was no difference among the MCP-1 concentrations. Patients with the p.R482W mutation exhibited increased levels of TNF- α ($p=0.02$) and IL-6 ($p=0.03$). The IL-1 β and MCP-1 concentrations tended to be higher in the p.R482W group ($p=0.07$ and $p=0.08$), and there was no difference among plasma adiponectin and leptin concentrations compared with p.R644C. Biochemical and inflammatory parameters were maintained even when only women were compared.

Table 4 shows late-night salivary cortisol, plasma and salivary cortisol in basal condition and after different DEX doses in healthy controls and FPLD2 patients. There was no difference among the three basal levels of plasma or salivary cortisol for each subject; therefore, for all further statistical analysis, the baseline concentration was considered the mean of the three samples obtained before each DEX dose. DEX was undetected in basal condition in all subjects. After 0.25, 0.5, and 1.0 mg DEX doses, there was a dose-dependent increase in mean circulating DEX levels (ng/dL) in controls (16.4 ± 2.7 ; 89 ± 47 ; 219 ± 97 ; 511 ± 251) and in FPLD2 (16.6 ± 1.9 ; 75.2 ± 44 ; 192 ± 101 ; 463 ± 176) and a decrease of plasma and salivary cortisol levels (**Table 4**). There was no difference in the concentrations of plasma DEX between healthy individuals and patients with FPLD2 in any DEX dose, neither between patients with different *LMNA* mutations.

There was no difference in plasma cortisol levels in basal condition and post- 0.25, 0.5, and 1.0mg DEX between healthy and FPLD2 groups. The values of IC50 DEX dose (mg) that suppressed plasma cortisol were similar between FPLD2 and controls. However, salivary cortisol levels after 0.5mg and 1.0mg DEX were less suppressed in FPLD2 patients ($p=0.04$ and $p=0.05$). The 0.5 mg DEX dose suppressed salivary cortisol levels in 78.3% of controls but only in 47.6% of FPLD2 patients. Among females, after 0.5mg DEX, not only salivary but also plasma cortisol levels were less suppressed in female FPLD2 patients compared to female controls ($p=0.01$).

Patients within the p.R482W group exhibited decreased suppression of salivary cortisol after 0.5mg DEX ($p=0.03$), but not after 0.25 and 1.0mg, with no difference of plasma cortisol between the two different *LMNA* mutations. In addition, post- 0.5mg DEX, female patients harboring the p.R482W also showed decreased suppression of plasma cortisol levels than female patients harboring the p.R644C mutation ($p=0.04$).

There was no difference in the PBMC relative expressions of *GR α* (1.1 ± 0.5 vs 0.99 ± 0.5), *GR β* (1.4 ± 2.4 vs 1.3 ± 1.4), *11 β HSD1* (1.6 ± 1.3 vs 2.2 ± 2), and *11 β HSD2* (0.96 ± 1.1 vs 0.9 ± 1.3) between FPLD2 patients and controls, as well as between patients with the p.R482W and p.R644C mutations. Among females, *GR β* overexpression was observed in FPLD2 patients compared to controls (0.8 ± 1.2 vs 1.1 ± 0.6 ; $p=0.04$).

4. Discussion

In the present study, our series of FPLD2 patients presented central obesity and adipose atrophy of the extremities. FPLD2 patients also exhibited insulin resistance markers and a

proinflammatory state. Moreover, FPLD2 patients showed slightly impaired HPA axis sensitivity mainly in female. In addition, the clinical and biochemical phenotypes were more severe in patients harboring the p.R482W mutation when compared with the p.R644C mutation.

In our series, patients with FPLD2 exhibited two different *LMNA* mutations: the p.R482W in exon 8 or the p.R644C in exon 11. Missense mutations in the *LMNA* gene (1q21-22), which codifies lamin A and C, are responsible for FPLD2 (7). The dominant heterozygous missense *LMNA* mutations causing FPLD2 typically cluster in the Ig-like domain, especially exon 8, codon 482, interrupting both splice forms, lamins A and C (6,23). The mutation p.R644C found in our series is located in the lamin A specific region, has been previously associated with FPLD2 (24) and, more commonly, with atypical progeria forms, cardiomyopathy and musculoskeletal abnormalities (24,25).

These mutations may result in adipocyte apoptosis and degeneration by affecting interaction of mutated lamins with nuclear chromatin and other proteins of the inner nuclear membrane, modulating gene and microRNA expressions or by affecting their posttranslational modifications (18,19). The adipose tissue distribution observed in patients harboring mutations in *LMNA* gene could be due either to the inability of adipose tissue to adequately store triacylglycerol or to signaling abnormalities affecting SREBP1 (sterol-regulatory-element-binding protein 1) and MAPK (mitogen-activated protein kinase) (20). The intrinsic dysfunction of adipose tissue itself could lead to the development of the anthropometric and metabolic abnormalities also observed in our patients.

Indeed, our FPLD2 patients presented increased waist and neck circumferences, decreased hip circumference and decreased peripheral skinfold thickness at three out of four evaluated sites. In addition, they also exhibited decreased total fat mass and increased fat-free mass evaluated by BIA. Patients with FPLD2 also presented insulin resistance demonstrated by elevated HOMA-IR; decreased insulin sensitivity confirmed by QUICKI, in addition to dyslipidemia, mainly due to hypertriglyceridemia and decreased HDL-cholesterol. These adipose distribution and metabolic profile have been described by Dunnigan in the earlier seventies and confirmed by others (3,15-17) and might underlie the high risk of cardiovascular disease and chronic disorders observed in FPLD2 patients.

Patients with FPLD2 harboring the p.R482W exhibited a typical phenotype, while the patients with the p.R644C mutation presenting a mild or an atypical phenotype. In addition, p.R482W patients also presented signs and symptoms earlier in life compared with p.R644C mutation patients. Of note,

the pathogenicity of the pR644C has been questioned and "likely benign" or "uncertain pathogenicity" has been attributed by the OMIM or ClinVar public databases. Altogether, we can affirm that there is a phenotypic heterogeneity, probably related to the site of *LMNA* gene mutations (8,22). These data reinforce the growing perception that partial lipodystrophy is a heterogeneous disease with a large spectrum of manifestations (26).

In our series, the p.R482W was observed in 13 women and 1 man and the p.R644C in 5 women and 5 men, with a more severe phenotype observed in women, suggesting a possible role for sexual steroids, in accordance with previous series (4,5,21). This can be ascribed to either a gender involvement, mainly in patients with the p.R482W mutation, or an underdiagnosis bias in men. Thus, due to the prevalence and phenotype severity in female patients, we also analyzed data excluding male subjects.

We observed reduced circulating levels of adiponectin and leptin in FPLD2 patients compared with controls, independently of gender, findings consistent with previous discoveries (21,27-29). Circulating plasma levels of adiponectin seem to be more related to redistribution of fat and visceral adiposity than to the absolute degree of adiposity in FPLD2 (30,31). It remains to be established whether the reduced plasma leptin levels result from the decreased adipose mass or the subcellular effects of mutant *LMNA*(6). The recombinant leptin has been successfully used in FPLD2 patients, however, it is not yet known if patients with different *LMNA* mutations could respond differently to metreleptin treatment (32).

Increased levels of plasma proinflammatory cytokines (TNF α , IL1- β , and IL-6) as well as a putative compensatory IL-10 increment were also observed in our cohort of FPLD2 patients compared with controls. Of note, marked abnormalities in cytokine profile were seen mainly in patients with the p.R482W mutation. TNF- α is known to promote lipolysis and to increase free fatty acid levels (33), contributing to the pathogenesis of insulin resistance, abnormal adiposity, and lipid disorders. In addition, an inverse relationship between adiponectin and TNF- α may result directly from their reciprocal regulatory effects on adipocytes and macrophages (34,35). Regarding TNF- α production, our data are in agreement with Wong *et al.*, who had already reported increased TNF- α associated with low plasma leptin and adiponectin in FPLD2 patients. However, in contrast to us, they found decreased IL-6 concentrations reflecting reduced total fat mass in FPLD2 (31). On the other hand, Hegele *et al.* found no changes in plasma TNF- α and IL-6 in FPLD2 (21). We can speculate that

increased IL-6 might result from other effects of the *LMNA* mutation on adipocyte function and could be related to the pathogenesis of insulin resistance instead of being a marker of fat mass in FPLD2. We also found elevated IL-1 β in our patients, which may suppress the plasma levels of adiponectin and leptin in FPLD2 patients, as shown in human adipose tissue *in vitro* (36,37).

FPLD2 clinical features resemble some of the features of Cushing's syndrome. To our knowledge this is the first study assessing the HPA axis sensitivity in FPLD2 patients. While no difference was observed between basal cortisol levels, FPLD2 patients showed decreased ability to suppress the HPA axis compared with controls after 0.5mg DEX. Indeed, previous study demonstrated that the majority of healthy individuals suppress salivary and plasma cortisol with DEX doses of approximately 0.5 mg (38). This dose seems to be the most effective to expose the spectral HPA axis sensitivity among healthy and FPLD2 groups, while 0.25mg or 1.0mg DEX seem to be too low or too high to detect individual differences in the sensitivity of the HPA axis to GC in both healthy and FPLD2 subjects. The variation of the HPA axis sensitivity to GC in FPLD2 appears to be more significant in female patients, suggesting another phenotypic heterogeneity observed in this disease which might contribute to the more severe phenotype observed in women. However, there are limitations to prove gender involvement in HPA axis sensitivity to GC in FPLD2, because of the rarity of the disease and due to the underdiagnosis bias in man.

GC resistance can be ascribed to increased inflammatory state, *GR β* overexpression, and increased conversion of active/inactive cortisol by *11 β HSD2* isoform (39,40). As we have previously demonstrated in Metabolic Syndrome (41), our data in FPLD2 patients also suggest that the increased proinflammatory cytokines might contribute to the HPA axis decreased GC sensitivity. Although no differences on *GR α* , *GR β* , *11 β HSD1*, and *11 β HSD2* expressions were observed in peripheral mononuclear blood cells of FPLD2 patients compared with controls, *GR β* overexpression was observed in female FPLD2 patients compared with female controls, which may contribute to decreased HPA axis sensitivity to GC in female FPLD2 patients.

There are some strengthen in the present study: the cohort is large, patients are well characterized, and all approaches were done by the same investigator, avoiding bias. One limitation of the present study would be the use of immune peripheral blood cells instead of adipose tissues to perform gene expression, as previous studies yielded no consensus about whether A-type lamins are expressed in immune cells (42-45). More studies, evaluating visceral and peripheral adipose tissues

are necessary to clarify the role of tissue-specific GC resistance in FPLD2 patients. Finally, we cannot rule out the possibility of nuclear lamina *per se* being important to properly regulate Glucocorticoid Response Element (GRE) transcription in humans, a mechanism previously reported in bovine aortic endothelial cells (46).

In conclusion, FPLD2 patients exhibited anthropometric, clinical, and biochemical phenotypic heterogeneity related to *LMNA* mutation sites and also to gender. *LMNA* mutations affecting both lamins A and C lead to more severe phenotype. FPLD2 patients also showed blunted HPA axis response to DEX, probably due to the association of increased levels of proinflammatory cytokines with *GR β* overexpression leading to a more severe phenotype in female.

5. Acknowledgments: We thank Dr José Gilberto Henrique Vieira for kindly providing the anti-DEX antibody. We also thank Mr José Roberto Silva, Rogério Lenotti Zuliani, and Wendy Turatti for technical assistance.

6. Funding: This work was supported by the National Council of Technological and Scientific Development (CNPq) (Grant 150569/2015-7) and by the Sao Paulo Research Foundation (FAPESP) (Grant 2007/58365-3).

7. Disclosure summary: The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

8. Author contributions: A.T.P.R, C.S.M, M.C.F.F and M.C planned the study. A.T.P.R, C.S.M, and M.C analyzed data and wrote the manuscript. A.T.P.R. and C.S.M. performed the patients' recruitment, the dexamethasone suppression tests, the genotyping, and qPCR. A.T.P.R and A.C.B performed the anthropometric and body composition measurements. M.C.F.F was responsible for patients' clinical follow-up. A.C.M also contributed with critical analysis of the data. All authors reviewed the manuscript.

6. References

1. Lightbourne M, Brown RJ. Genetics of Lipodystrophy. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2017; 46:539-554
2. Vantyghem MC, Balavoine AS, Douillard C, Defrance F, Dieudonne L, Mouton F, Lemaire C, Bertrand-Escoufflaire N, Bourdelle-Hego MF, Devemy F, Evrard A, Gheerbrand D, Girardot C, Gumuche S, Hober C, Topolinski H, Lamblin B, Mycinski B, Ryndak A, Karrouz W, Duvivier E,

- Merlen E, Cortet C, Weill J, Lacroix D, Wemeau JL. How to diagnose a lipodystrophy syndrome. *Ann Endocrinol (Paris)* 2012; 73:170-189
3. Dunnigan MG, Cochrane MA, Kelly A, Scott JW. Familial lipoatrophic diabetes with dominant transmission. A new syndrome. *Q J Med* 1974; 43:33-48
 4. Garg A. Gender differences in the prevalence of metabolic complications in familial partial lipodystrophy (Dunnigan variety). *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:1776-1782
 5. Vigouroux C, Magre J, Vantyghem MC, Bourut C, Lascols O, Shackleton S, Lloyd DJ, Guerci B, Padova G, Valensi P, Grimaldi A, Piquemal R, Touraine P, Trembath RC, Capeau J. Lamin A/C gene: sex-determined expression of mutations in Dunnigan-type familial partial lipodystrophy and absence of coding mutations in congenital and acquired generalized lipoatrophy. *Diabetes* 2000; 49:1958-1962
 6. Hegele RA. Familial partial lipodystrophy: a monogenic form of the insulin resistance syndrome. *Molecular genetics and metabolism* 2000; 71:539-544
 7. Shackleton S, Lloyd DJ, Jackson SN, Evans R, Niermeijer MF, Singh BM, Schmidt H, Brabant G, Kumar S, Durrington PN, Gregory S, O'Rahilly S, Trembath RC. LMNA, encoding lamin A/C, is mutated in partial lipodystrophy. *Nat Genet* 2000; 24:153-156
 8. Garg A, Vinatheerthan M, Weatherall PT, Bowcock AM. Phenotypic heterogeneity in patients with familial partial lipodystrophy (dunnigan variety) related to the site of missense mutations in lamin a/c gene. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:59-65
 9. Monteiro LZ, Foss-Freitas MC, Junior Montenegro RM, Foss MC. Body fat distribution in women with familial partial lipodystrophy caused by mutation in the lamin A/C gene. *Indian J Endocrinol Metab* 2012; 16:136-138
 10. Fatkin D, MacRae C, Sasaki T, Wolff MR, Porcu M, Frenneaux M, Atherton J, Vidaillet HJ, Jr., Spudich S, De Girolami U, Seidman JG, Seidman C, Muntoni F, Muehle G, Johnson W, McDonough B. Missense mutations in the rod domain of the lamin A/C gene as causes of dilated cardiomyopathy and conduction-system disease. *N Engl J Med* 1999; 341:1715-1724
 11. Durnin JV, Womersley J. Body fat assessed from total body density and its estimation from skinfold thickness: measurements on 481 men and women aged from 16 to 72 years. *Br J Nutr* 1974; 32:77-97
 12. Castro M, Elias PC, Quidute AR, Halah FP, Moreira AC. Out-patient screening for Cushing's syndrome: the sensitivity of the combination of circadian rhythm and overnight dexamethasone suppression salivary cortisol tests. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:878-882
 13. Newell-Price J, Trainer P, Besser M, Grossman A. The diagnosis and differential diagnosis of Cushing's syndrome and pseudo-Cushing's states. *Endocr Rev* 1998; 19:647-672
 14. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25:402-408
 15. Burn J, Baraitser M. Partial lipoatrophy with insulin resistant diabetes and hyperlipidaemia (Dunnigan syndrome). *J Med Genet* 1986; 23:128-130
 16. Garg A, Peshock RM, Fleckenstein JL. Adipose tissue distribution pattern in patients with familial partial lipodystrophy (Dunnigan variety). *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:170-174

17. Joy T, Kennedy BA, Al-Attar S, Rutt BK, Hegele RA. Predicting abdominal adipose tissue among women with familial partial lipodystrophy. *Metabolism* 2009; 58:828-834
18. Elzeneini E, Wickstrom SA. Lipodystrophic laminopathy: Lamin A mutation relaxes chromatin architecture to impair adipogenesis. *J Cell Biol* 2017; 216:2607-2610
19. Oldenburg A, Briand N, Sorensen AL, Cahyani I, Shah A, Moskaug JO, Collas P. A lipodystrophy-causing lamin A mutant alters conformation and epigenetic regulation of the anti-adipogenic MIR335 locus. *J Cell Biol* 2017; 216:2731-2743
20. Bidault G, Vazier C, Capeau J, Vigouroux C, Bereziat V. LMNA-linked lipodystrophies: from altered fat distribution to cellular alterations. *Biochem Soc Trans* 2011; 39:1752-1757
21. Hegele RA, Kraw ME, Ban MR, Miskie BA, Huff MW, Cao H. Elevated Serum C-Reactive Protein and Free Fatty Acids Among Nondiabetic Carriers of Missense Mutations in the Gene Encoding Lamin A/C (LMNA) With Partial Lipodystrophy. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2003; 23:111-116
22. Mory PB, Crispim F, Freire MB, Salles JE, Valerio CM, Godoy-Matos AF, Dib SA, Moises RS. Phenotypic diversity in patients with lipodystrophy associated with LMNA mutations. *Eur J Endocrinol* 2012; 167:423-431
23. Speckman RA, Garg A, Du F, Bennett L, Veile R, Arioglu E, Taylor SI, Lovett M, Bowcock AM. Mutational and haplotype analyses of families with familial partial lipodystrophy (Dunnigan variety) reveal recurrent missense mutations in the globular C-terminal domain of lamin A/C. *Am J Hum Genet* 2000; 66:1192-1198
24. Rankin J, Auer-Grumbach M, Bagg W, Colclough K, Duong NT, Fenton-May J, Hattersley A, Hudson J, Jardine P, Josifova D, Longman C, McWilliam R, Owen K, Walker M, Wehnert M, Ellard S. Extreme phenotypic diversity and nonpenetrance in families with the LMNA gene mutation R644C. *American Journal of Medical Genetics Part A* 2008; 146A:1530-1542
25. Mercuri E, Brown SC, Nihoyannopoulos P, Poulton J, Kinali M, Richard P, Piercy RJ, Messina S, Sewry C, Burke MM, McKenna W, Bonne G, Muntoni F. Extreme variability of skeletal and cardiac muscle involvement in patients with mutations in exon 11 of the lamin A/C gene. *Muscle & Nerve* 2005; 31:602-609
26. Ajluni N, Meral R, Neidert AH, Brady GF, Buras E, McKenna B, DiPaola F, Chenevert TL, Horowitz JF, Buggs-Saxton C, Rupani AR, Thomas PE, Tayeh MK, Innis JW, Omary MB, Conjeevaram H, Oral EA. Spectrum of disease associated with partial lipodystrophy: lessons from a trial cohort. *Clinical Endocrinology* 86:698-707
27. Hegele RA, Anderson CM, Wang J, Jones DC, Cao H. Association Between Nuclear Lamin A/C R482Q Mutation and Partial Lipodystrophy with Hyperinsulinemia, Dyslipidemia, Hypertension, and Diabetes. *Genome Research* 2000; 10:652-658
28. Hegele RA, Cao H, Huff MW, Anderson CM. LMNA R482Q Mutation in Partial Lipodystrophy Associated with Reduced Plasma Leptin Concentration*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2000; 85:3089-3093

29. Haque WA, Shimomura I, Matsuzawa Y, Garg A. Serum Adiponectin and Leptin Levels in Patients with Lipodystrophies. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2002; 87:2395-2398
30. Cnop M, Havel PJ, Utzschneider KM, Carr DB, Sinha MK, Boyko EJ, Retzlaff BM, Knopp RH, Brunzell JD, Kahn SE. Relationship of adiponectin to body fat distribution, insulin sensitivity and plasma lipoproteins: evidence for independent roles of age and sex. *Diabetologia* 2003; 46:459-469
31. Wong SPY, Huda M, English P, Bargiotta A, Wilding JPH, Johnson A, Corrall R, Pinkney JH. Adipokines and the insulin resistance syndrome in familial partial lipodystrophy caused by a mutation in lamin A/C. *Diabetologia* 2005; 48:2641-2649
32. Polyzos SA, Mantzoros CS. Lipodystrophy: Time for a global registry and randomized clinical trials to assess efficacy, safety and cost-effectiveness of established and novel medications. *Metabolism* 2017; 72:A4-A10
33. Moller DE. Potential Role of TNF- α in the Pathogenesis of Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 2000; 11:212-217
34. Bruun JM, Lihn AS, Verdich C, Pedersen SB, Toubro S, Astrup A, Richelsen Br. Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism* 2003; 285:E527-E533
35. Yokota T, Oritani K, Takahashi I, Ishikawa J, Matsuyama A, Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Tenner AJ, Tomiyama Y, Matsuzawa Y. Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages. *Blood* 2000; 96:1723-1732
36. Lihn AS, Bruun JM, He G, Pedersen SB, Jensen PF, Richelsen Br. Lower expression of adiponectin mRNA in visceral adipose tissue in lean and obese subjects. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2004; 219:9-15
37. Bruun JM, Pedersen SB, Kristensen K, Richelsen Br. Effects of pro-inflammatory cytokines and chemokines on leptin production in human adipose tissue in vitro. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2002; 190:91-99
38. Chrguer RS, Elias LL, da Silva IM, Jr., Vieira JG, Moreira AC, de Castro M. Glucocorticoid sensitivity in young healthy individuals: in vitro and in vivo studies. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90:5978-5984
39. de Castro M, Elliot S, Kino T, Bamberger C, Karl M, Webster E, Chrousos GP. The non-ligand binding beta-isoform of the human glucocorticoid receptor (hGR beta): tissue levels, mechanism of action, and potential physiologic role. *Mol Med* 1996; 2:597-607
40. Morgan SA, McCabe EL, Gathercole LL, Hassan-Smith ZK, Lerner DP, Bujalska IJ, Stewart PM, Tomlinson JW, Lavery GG. 11 β -HSD1 is the major regulator of the tissue-specific effects of circulating glucocorticoid excess. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111:E2482-2491

41. Martins CS, Elias D, Colli LM, Couri CE, Souza MC, Moreira AC, Foss MC, Elias LL, de Castro M. HPA axis dysregulation, NR3C1 polymorphisms and glucocorticoid receptor isoforms imbalance in metabolic syndrome. *Diabetes Metab Res Rev* 2017; 33
42. Gonzalez-Granado JM, Silvestre-Roig C, Rocha-Perugini V, Trigueros-Motos L, Cibrian D, Morlino G, Blanco-Berrocal M, Osorio FG, Freije JMP, Lopez-Otin C, Sanchez-Madrid F, Andres V. Nuclear Envelope Lamin-A Couples Actin Dynamics with Immunological Synapse Architecture and T Cell Activation. *Science Signaling* 7:ra37
43. Hale JS, Frock RL, Mamman SA, Fink PJ, Kennedy BK. Cell-Extrinsic Defective Lymphocyte Development in *Lmna*(^{-/-}) Mice. *PLOS ONE* 5:e10127
44. Rober RA, Sauter H, Weber K, Osborn M. Cells of the cellular immune and hemopoietic system of the mouse lack lamins A/C: distinction versus other somatic cells. *Journal of Cell Science* 1990; 95:587
45. Guilly M-NI, Kolb J-P, Gosti Fo, Godeau Fo, Courvalin J-C. Lamins A and C are not expressed at early stages of human lymphocyte differentiation. *Experimental Cell Research* 1990; 189:145-147
46. Nayeibosadri A, Ji JY. Endothelial nuclear lamina is not required for glucocorticoid receptor nuclear import but does affect receptor-mediated transcription activation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2013; 305:C309-322

Table 1: Prevalence of chronic diseases in patients with Familial Partial Lipodystrophy type 2 (FPLD2) according to *LMNA* mutations.

Chronic disease	FPLD2			<i>p</i>
	Total (n=24)	p.R482W (n=14)	p.R644C (n=10)	
Reduced HDL cholesterol	18 (75%)	13 (93%)	5 (50%)	0.05
Hypertriglyceridemia	16 (67%)	12 (86%)	4 (40%)	0.03
T2DM	12 (50%)	9 (64%)	3 (30%)	0.2
Liver steatosis	10 (42%)	8 (57%)	2 (20%)	0.09
Hypertension	8 (33%)	7 (50%)	1 (10%)	0.08
Pancreatitis	2 (8%)	1 (7%)	1 (10%)	1.00

T2DM: Type 2 Diabetes Mellitus

Table 2: Anthropometric characteristics of patients with Familial Partial Lipodystrophy Type 2 (FPLD2) and controls.

	Controls	FPLD2		FPLD2		
			<i>p</i>	p.R482W	p.R644C	<i>p</i>
Sex	18 F / 6 M	18 F / 6 M		13 F / 1 M	5 F / 5 M	
Age (years)	38.7 ± 11.2	37.8 ± 13.8	0.7	37.7 ± 16.6	36.6 ± 9.3	0.7
weight (Kg)	65.6 ± 12.0	64.4 ± 10.0	0.7	62.3 ± 9.0	68.0 ± 10.0	0.1
height (m)	1.65 ± 0.1	1.60 ± 0.07	0.1	1.61 ± 0.05	1.59 ± 0.1	0.04
BMI (kg/m²)	23.9 ± 3.1	25.0 ± 3.1	0.2	24.0 ± 3.06	26.6 ± 2.5	0.01
<u>Circumferences (cm)</u>						
waist	79.0 ± 9.0	85.7 ± 7.0	0.008	83.2 ± 8.0	88.9 ± 4.0	0.1
hip	100.0 ± 5.0	93.0 ± 7.0	0.0007	91.3 ± 7.0	95.5 ± 6.0	0.05
waist to hip ratio	0.78 ± 0.08	0.93 ± 0.08	<0.0001	0.91 ± 0.07	0.95 ± 0.07	0.2
neck	33.0 ± 3.0	39.7 ± 4.0	<0.0001	39.6 ± 4.0	38.4 ± 2.0	0.2
calf	34.0 ± 2.0	33.0 ± 3.0	0.2	32.6 ± 2.0	33.2 ± 3.0	0.6
upper arm	29.0 ± 3.0	30.0 ± 5.0	0.8	26.7 ± 3.0	33.9 ± 4.0	<0.001
<u>Skinfold thickness (mm)</u>						
<u>Truncal</u>						
chest	17.9 ± 8.0	17.6 ± 9.0	0.8	12.1 ± 8.0	23.6 ± 6.0	<0.001
midaxillary	18.3 ± 11.0	17.6 ± 10.0	0.9	10.7 ± 5.0	23.1 ± 9.0	<0.001
abdominal	25.0 ± 8.4	19.7 ± 9	0.1	14.4 ± 9.0	26.1 ± 4.0	0.01
subscapular	16.9 ± 7.0	20.6 ± 8.0	0.2	18.7 ± 9.0	22.8 ± 7.0	0.1
suprailiac	21.4 ± 12.0	16.6 ± 10.0	0.2	8.8 ± 5.0	25.1 ± 8.0	<0.001
<u>Peripheral</u>						
biceps	9.8 ± 6.0	6.3 ± 5.0	0.06	3.0 ± 2.0	10.3 ± 6.0	<0.001
triceps	19.0 ± 8.0	9.9 ± 7.4	0.001	5.1 ± 3.0	15.7 ± 7.0	<0.001
thigh	32.3 ± 15.0	8.2 ± 5.0	<0.0001	4.4 ± 0.7	12.3 ± 5.0	0.02
calf	20.9 ± 8.0	4.4 ± 3.0	<0.0001	2.5 ± 2.0	6.8 ± 3.0	0.007
<u>Body composition</u>						
body fat (%)*	29.4 ± 9.0	26.8 ± 6.7	0.2	24.0 ± 4.0	30.1 ± 8.0	0.1
fat mass (%)**	29.0 ± 8.0	24.0 ± 5.0	0.01	22.0 ± 4.0	26.7 ± 4.0	0.02
fat-freemass (%)**	70.0 ± 8.0	76.0 ± 5.0	0.01	77.9 ± 4.0	73.2 ± 4.0	0.02

Data expressed in mean ± SD. F: female; M: male; BMI: body mass index. Percentage of body fat estimated by the *Durin and Womersley's equation and **by BIA (Bioelectrical Impedance Analysis).

Table 3: Laboratorial parameters of patients with Familial Partial Lipodystrophy Type 2 (FPLD2) and controls.

	Controls	FPLD2	<i>p</i>	FPLD2		
				p.R482W	p.R644C	<i>p</i>
<u>Biochemical Evaluation</u>						
Glycemia (mmol/L)	4.6 ± 0.34	5.9 ± 1.89	0.02	6.28 ± 2.2	5.28 ± 1.2	0.3
HbA1C (%)	5.5 ± 0.4	7.3 ± 2.1	0.001	7.7 ± 2.4	6.7 ± 1.4	0.4
Insulin (pmol/L)	92.8 ± 73.4	327 ± 231	<0.0001	401 ± 221	225 ± 213	0.02
HOMA IR	3.2 ± 2.7	14.8 ± 12.4	<0.0001	18 ± 12.0	9.8 ± 11.0	0.02
QUICKI	0.33 ± 0.03	0.28 ± 0.03	<0.0001	0.26 ± 0.02	0.3 ± 0.04	0.02
Cholesterol (mmol/L)	4.7 ± 0.62	5.02 ± 1.38	0.9	5.2 ± 1.5	4.7 ± 1.08	0.4
HDLc (mmol/L)	1.45 ± 0.44	1.0 ± 0.23	0.0004	0.96 ± 0.23	1.11 ± 0.18	0.08
LDLc (mmol/L)	2.8 ± 0.6	2.7 ± 0.77	0.5	2.64 ± 0.88	2.76 ± 0.67	0.6
Triglycerides (mmol/L)	0.94 ± 0.4	4.2 ± 8.7	<0.0001	5.7 ± 10.9	1.82 ± 1.41	0.03
Uricacid (umol/L)	274 ± 59	357 ± 279	0.02	446 ± 416	297 ± 59	0.5
AST (UI/L)	22.0 ± 6.0	33.0 ± 18.0	0.03	35.0 ± 22.0	30.0 ± 7.0	0.9
ALT (UI/L)	22.0 ± 9.0	43.0 ± 39.0	0.005	47.0 ± 49.0	36.0 ± 8.0	0.6
Creatinine (mg/dL)	0.88 ± 0.1	0.89 ± 0.2	0.9	0.8 ± 0.1	1.01 ± 0.2	0.04
<u>Adipokines (ng/mL)</u>						
Adiponectin	48.5 ± 19.0	27.7 ± 16.0	0.0002	31.0 ± 18.0	24.0 ± 14.0	0.2
Leptin	18.3 ± 15.0	9.0 ± 8.0	0.03	7.6 ± 6.0	11.0 ± 10.0	0.6
<u>Cytokines (pg/mL)</u>						
TNF-α	6.8 ± 3.0	10.9 ± 6.0	0.001	13.0 ± 6.0	8.0 ± 5.0	0.02
IL-1β	1.4 ± 1.0	4.9 ± 8.0	0.01	6.8 ± 10.0	2.2 ± 3.0	0.07
IL-6	2.8 ± 3.0	8.0 ± 10.0	0.01	11.0 ± 12.0	3.7 ± 5.0	0.03
MCP-1	556.0 ± 200.0	535.0 ± 237.0	0.5	616.0 ± 275.0	421.0 ± 100.0	0.08
IL-10	7.2 ± 4.0	12.8 ± 9.0	0.01	14.0 ± 9.0	11.0 ± 8.5	0.3

Data expressed in mean ± SD. AST: aspartate aminotransferase, ALT: alanine aminotransferase, HbA1c: glycated hemoglobin, HDLc: high density lipoprotein cholesterol, LDLc: low density lipoprotein cholesterol.

Table 4: Plasma and salivary cortisol (nmol/L) in basal conditions and after different dexamethasone doses in patients with Familial Partial Lipodystrophy type 2 (FPLD2) and controls.

	Total group			Female group			FPLD2		
	Controls	FPLD2	<i>p</i>	Controls	FPLD2	<i>p</i>	p.R482W	p.R644C	<i>p</i>
<u>Plasma Cortisol</u>									
Basal	413.8 ± 121	375 ± 163	0.1	421 ± 128	371 ± 174	0.07	380 ± 190	372 ± 124	0.8
Post 0.25 mg	140.7 ± 132	187.6 ± 177	0.6	158 ± 202	227 ± 146	0.1	157 ± 201	226 ± 146	0.1
Post 0.5 mg	24.8 ± 38.6	41.4 ± 44	0.09	9.5 ± 5	41 ± 50	0.01	49,6 ± 52	27,6 ± 30	0.2
Post 1.0 mg	8.3 ± 7	13.8 ± 10	0.1	10 ± 8	15 ± 11	0.1	16.5 ± 11	9.9 ± 5.5	0.3
<u>Salivary Cortisol</u>									
Basal	15.4 ± 4.8	14.3 ± 6.2	0.3	16 ± 4.7	14 ± 6.7	0.2	15.6 ± 7	12.9 ± 4.6	0.5
23 h	3.2 ± 1.54	3.9 ± 1.6	0.07	3.2 ± 1.4	3.8 ± 1.4	0.2	3.9 ± 1.9	3.8 ± 1.1	0.6
Post 0.25 mg	5.5 ± 4	7 ± 4.6	0.3	5.3 ± 4	5.7 ± 4.6	1.0	5.6 ± 5	8.6 ± 3.8	0.1
Post 0.5 mg	2.2 ± 1	3 ± 1.6	0.04	2.1 ± 0.8	3.4 ± 1.9	0.01	3.9 ± 1.8	2.2 ± 0.7	0.03
Post 1.0 mg	1.7 ± 0.0006	2 ± 0.6	0.05	1.7 ± 0.0	1.9 ± 0.4	0.08	1.8 ± 0.08	2.3 ± 0.8	0.1

Data expressed in mean ± SD.