RAFAEL JUNGES MOREIRA

Deleção de PPAR γ em adipócitos promove lipodistrofia severa, intolerância à glicose, lipogênese *de novo* e hepatomegalia em camundongos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana.

Orientador: Prof. Dr William Tadeu Lara Festuccia

Versão corrigida.

São Paulo
2019

Resumo

MOEIRA, R.J. Deleção de PPAR γ em adipócitos promove lipodistrofia severa, intolerância à glicose, lipogênese de novo e hepatomegalia em camundongos. 2019. 133 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Introdução: A lipodistrofia engloba um grupo heterogêneo de doenças caracterizadas pela redução da massa adiposa por mecanismo que envolve redução tanto no número (hipoplasia) quanto no diâmetro (hipotrofia) dos adipócitos, sendo frequentemente associada ao desenvolvimento de diversas doenças metabólicas como a resistência à insulina, dislipidemias, hipertensão, esteatose hepática, aterosclerose, entre outras. **Objetivo:** Investigar os mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento da resistência à insulina, inflamação, esteatose hepática e hepatomegalia em animais lipodistróficos pela deleção do receptor ativador da proliferação peroxissomal do tipo gama (PPAR γ) em adipócitos, com ênfase no processo de lipogênese *de novo*. **Materiais e Métodos:** Protocolo 1- Camundongos controles (AT-PPAR γ WT) e lipodistróficos (AT-PPAR γ KO) com idades de 6, 12 e 24 semanas foram avaliados para o peso corporal, eficiência energética, ingestão alimentar, calorimetria indireta, tolerância à glicose e perfil inflamatório, lipidoma e proteoma hepático. Protocolo 2- Camundongos controles (AT-PPAR γ WT) e lipodistróficos (AT-PPAR γ KO) com 6 semanas de idade foram submetidos a tratamento com inibidor da enzima ácido graxo sintase (FAS) denominado Fasnall por 5 semanas e avaliados para o peso corporal, ingestão alimentar, tolerância à glicose e perfil inflamatório e esteatose hepática. Protocolo 3- Camundongos controles (AT-PPAR γ WT) e lipodistróficos (AT-PPAR γ KO) foram alimentados por 5 semanas com dieta normal (ND), dieta hiperlipídica (HF) contendo 60% de lipídeos oriundos do óleo de soja e banha de porco e dieta hiperlipídica (HF ω -3) contendo 60% de lipídeos oriundos do óleo de soja e óleo de peixe foram avaliados para o peso corporal, ingestão alimentar, tolerância à glicose e perfil inflamatório e esteatose hepática. **Resultados: estudo 1-** Os animais lipodistróficos apresentaram ausência completa de tecido adiposo, aumento do consumo alimentar e ganho de peso, intolerância à glicose, hiperinsulinemia, esteatose hepática e hepatomegalia. Adicionalmente os animais lipodistróficos apresentaram aumento no conteúdo hepático das citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α , fibrose progressiva, e alteração no perfil hepático de ácidos graxos com aumento na porcentagem de ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs) e redução dos ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) em especial os ômega 3 (ω -3). Por fim o proteoma do fígado dos animais lipodistróficos com 24 semanas demonstrou que a biossíntese de lipídeos estava aumentada, confirmada pelo aumento das proteínas ACC, FAS e SCD-1

responsáveis pela lipogênese de novo. Estudo 2- A inibição farmacológica da FAS nos animais lipodistróficos reduziu o consumo alimentar, ganho de peso corporal, esteatose hepática e a intolerância à glicose, mas não afetou a inflamação (conteúdo de IL-1 β , IL-6, TNF- α) e a fibrose hepática. **Estudo 3-** A ingestão de dieta HF ω -3 reduziu em camundongos AT-PPAR γ KO a deposição de triacilglicerol e a inflamação (conteúdo de IL-1 β e TNF- α) hepáticas e a intolerância à glicose. **Conclusão:** A ausência total de tecido adiposo está associada a deterioração da homeostase da glicose e ao desenvolvimento de esteatose, inflamação e fibrose hepática. A inibição farmacológica ou nutricional da FAS reduz a intolerância à glicose, mas não afeta a hepatomegalia e a hiperinsulinemia associada a lipodistrofia.

Palavras-chave: Lipodistrofia. Hepatomegalia. Intolerância À Glicose. Proteômica.

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil (CNPq) - Código de Financiamento 154750/2014-0.

Abstract

MOEIRA, R.J. Deletion of PPAR γ in adipocytes promotes severe lipodystrophy, glucose intolerance, de novo lipogenesis and hepatomegaly in mice. 2019. 133 p. Ph. D. These (Phd on Human Physiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Introduction: Lipodystrophy comprises a heterogeneous group of diseases characterized by a reduction of adipose tissue mass through a mechanism that involves reduction in both adipocyte number (hypoplasia) and diameter (hypotrophy). Lipodystrophy is frequently associated with the development of several metabolic diseases such as insulin resistance, dyslipidemia, hypertension, hepatic steatosis and atherosclerosis, among others. **Aim:** We investigate here in the molecular mechanisms by which lipodystrophy is associated with the development of insulin resistance, inflammation, hepatic steatosis and hepatomegaly with special emphasis in involvement of *de novo* lipogenesis. **Materials and methods:** Lipodystrophy was induced by the deletion of the nuclear peroxisomal proliferation receptor gamma (PPAR γ) in adipocytes using the cre-lox system. Protocol 1 - Control (AT-PPAR γ WT) and lipodystrophic (AT-PPAR γ KO) mice 6, 12 and 24 weeks old were evaluated for body weight, energy efficiency, food intake, indirect calorimetry, glucose tolerance, and liver inflammation, fibrosis, lipidome and proteome. Protocol 2- AT-PPAR γ WT and AT-PPAR γ KO 6 weeks old mice were treated with a pharmacological inhibitor of fatty acid synthase (FAS) denominated Fasnall during 5 weeks and evaluated for body weight, food intake, glucose, and liver steatosis, inflammatory and fibrosis. Protocol 3 - Control (AT-PPAR γ WT) and lipodystrophic (AT-PPAR γ KO) mice were fed for 5 weeks either a normal diet (ND), or a high fat diet (HF) containing 60% of lipids derived from soybean oil and lard or a high fat diet (HF ω -3) containing 60% of lipids from soybean oil and fish oil and evaluated for body weight, food intake, glucose homeostasis and liver steatosis, inflammation and fibrosis. **Results: Study 1** - Lipodystrophic mice presented complete absence of adipose tissue, increased food intake and weight gain, glucose intolerance, hyperinsulinemia, hepatic steatosis, inflammation (increased content of IL-1 β , IL-6 and TNF- α), fibrosis and hepatomegaly. In addition, lipodystrophic mice featured important changes in liver lipid profile characterized by an increase in the percentage of monounsaturated fatty acids (MUFAs) and reduction in polyunsaturated fatty acids (PUFAs), especially omega 3 (ω -3). Finally, analysis of liver proteome in lipodystrophic animals revealed an activation of *de novo* lipogenesis, which was confirmed by the increased hepatic content of ACC, FAS and SCD-1. **Study 2-** Pharmacological inhibition of FAS in lipodystrophic mice reduced food intake, body weight gain, hepatic triacylglycerol content and glucose intolerance, without affecting though

hyperinsulinemia and liver inflammation (IL-1 β , IL-6, TNF- α content), fibrosis and hepatomegaly. **Study 3-** Intake of HF ω -3 diet reduced in AT-PPAR γ KO mice glucose intolerance and liver inflammation, without affecting though hyperinsulinemia and hepatic esteatosis, fibrosis and hepatomegaly. **Conclusion:** Total absence of adipose tissue impairs glucose homeostasis and promotes hepatic steatosis, inflammation and fibrosis. Either pharmacological or nutritional inhibition of *de novo* lipogenesis reduces improves glucose tolerance without affecting hyperinsulinemia and hepatomegaly associated to lipodystrophy.

Keywords: Lipodystrophy, hepatomegaly, glucose intolerance, proteomics.

This study was funded (or supported) by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil (CNPq) - Finance Code 154750/2014-0.

1. Introdução e fundamentação do estudo

A lipodistrofia engloba um grupo heterogêneo de doenças caracterizadas pela redução da massa adiposa por mecanismo que envolve redução tanto no número (hipoplasia) quanto no diâmetro (hipotrofia) dos adipócitos. As lipodistrofias de origem genética são geralmente resultado de mutações/deleções em genes que codificam proteínas importantes no controle da formação (adipogênese) e deposição de lipídeos em adipócitos. Alguns exemplos são as mutações nos genes que codificam o receptor ativador da proliferação peroxissomal do tipo gama (PPAR γ , (WANG et al., 2013a) (fator de transcrição que controla a adipogênese, síntese de triacilglicerol e sobrevivência dos adipócitos), Akt2 ((SHEARIN et al., 2016) (quinase que controla a captação de glicose e *turnover* de triacilglicerol), CIDEA (GARG, 2011) proteína que participa na formação de gota unilocular de lipídeos), AGPAT2 e lipina (PHAN; REUE, 2005) enzimas envolvidas na síntese de triacilglicerol), raptor (LEE et al., 2016a)(componente essencial de mTORC1 que controla a lipogênese), entre outras. Já a lipodistrofia de origem farmacológica é encontrada principalmente em pacientes soropositivos para o vírus da imunodeficiência humana (HIV) como resultado secundário à terapia antirretroviral composta por inibidores de proteases e da transcriptase reversa. A síndrome da imunodeficiência adquirida (Aids), é uma doença infectocontagiosa ainda sem prognóstico de cura e que continua aumentando sua incidência. Aproximadamente 40-70% das pessoas vivendo com HIV/Aids sob terapia antirretroviral desenvolvem lipodistrofia, sendo esta a forma mais comum de lipodistrofia encontrada atualmente e um importante efeito colateral destes medicamentos que prejudica não só a adesão ao tratamento como também a qualidade de vida destes pacientes (HUSSAIN; PATNI; GARG, 2018; MALLEWA et al., 2008).

Diversos avanços na compreensão da fisiopatologia das lipodistrofias estão sendo obtidos pelo uso de camundongos geneticamente modificados que reproduzem as mutações/deleções genéticas mais comuns encontradas na clínica. Em nosso laboratório, por exemplo, produzimos utilizando o sistema cre-lox, camundongos com deleção do componente essencial do complexo 1 da mTOR raptor exclusivamente em adipócitos. Estes camundongos apresentaram lipodistrofia parcial caracterizada por inflamação do tecido adiposo remanescente devido a reduzida síntese e estocagem de triacilglicerol e exacerbada produção local de ceramidas, resultando sistemicamente em intolerância à glicose e esteatose hepática (CHIMIN et al., 2017).

Apesar dos avanços obtidos recentemente, pouco se sabe sobre os mecanismos pelos quais a lipodistrofia está associada ao desenvolvimento de diversas doenças metabólicas como a resistência à insulina, dislipidemias, hipertensão, esteatose hepática, aterosclerose, entre outras. Interessante notar que todas estas complicações são também comumente associadas à obesidade, ou seja, ao acúmulo exacerbado de lipídeos no tecido adiposo. Embora possa parecer paradoxal, esta similaridade entre a lipodistrofia e a obesidade quanto a suas complicações enfatiza o importante papel exercido pelo tecido adiposo como órgão essencial no controle do equilíbrio energético e metabolismo. Neste sentido, dois mecanismos tem sido sugeridos para explicar como o tecido adiposo disfuncional pode participar no desenvolvimento de doenças metabólicas: 1- a incapacidade do tecido adiposo de estocar lipídeos promove a deposição ectópica dos mesmos e lipotoxicidade em órgãos como o fígado, rins, coração e pâncreas causando estresse oxidativo, inflamação e resistência à insulina; e 2- o tecido adiposo disfuncional apresenta secreção anormal de adipocinas e lipocinas que prejudicam a homeostase energética e metabólica. Um exemplo é a redução nos níveis circulantes de leptina que acomete pacientes com lipodistrofia e responde por parte das complicações metabólicas (hiperfagia, amenorreia, esteatose hepática e resistência à insulina) encontradas nesta condição. Neste sentido, a administração de metreleptina a pacientes com lipodistrofia está associado, por mecanismos desconhecidos, com melhora na homeostase glicêmica e lipídica e reduções na hiperfagia e lesão renal.

Desta forma, a presente tese de doutorado teve como objetivo geral investigar os mecanismos moleculares pelos quais a lipodistrofia severa promove o desenvolvimento das complicações metabólicas resistência à insulina, esteatose hepática e hepatomegalia. Para atingir este objetivo, realizamos a caracterização temporal das alterações no balanço energético, homeostase da glicose e composição, inflamação e metabolismo hepáticos em camundongos com lipodistrofia severa (completa ausência de tecido adiposo) causada pela deleção de PPAR γ exclusivamente em adipócitos. Posteriormente, mediante os resultados de lipidoma e proteoma hepático indicando um aumento da lipogênese *de novo* no fígado de animais lipodistróficos, nós investigamos a participação deste processo no desenvolvimento da hepatomegalia, inflamação hepática e resistência à insulina encontrados nesta condição. Para isto, utilizamos intervenções tanto farmacológica mediante o tratamento com o Fasnall, um inibidor específico da enzima ácido graxo sintase (FAS), quanto nutricional via administração de dieta rica em ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) do tipo ômega 3, com o objetivo de inibir o processo

de lipogênese *de novo* em camundongos lipodistróficos.

2. Revisão de literatura

2.1 Tecido adiposo branco e obesidade

O tecido adiposo branco (TAB), é um órgão multifuncional composto por diversos tipos celulares incluindo pré-adipócitos, células endoteliais, fibroblastos, leucócitos (macrófagos, neutrófilos, linfócitos, etc), células nervosas e os adipócitos, que são células que apresentam maquinaria enzimática e alta capacidade de armazenamento de energia na forma de triacilglicerol (TAG), um lipídeo neutro que consiste de três moléculas de ácidos graxos (AG) esterificadas à cadeia de carbono de um glicerol. Os TAGs que correspondem a aproximadamente 80% da massa do TAB, são sintetizados por um conjunto de enzimas que catalisam a captação, ativação e esterificação dos AGs (ATTIE; SCHERER, 2009). Além do armazenamento de energia, o TAB atua também como uma glândula endócrina secretando diversas proteínas (adipocinas) e lipídeos (lipocinas) que regulam vários processos. Entre as diversas adipocinas secretadas pelo tecido adiposo estão proteínas que participam do controle da ingestão alimentar e equilíbrio energético (leptina), da função imune e inflamatória (leptina, o fator de necrose tumoral [TNF α], interleucina-6 [IL-6] e a proteína quimiotática de monócitos-1 [MCP-1], do metabolismo de lipídeos e carboidratos (adiponectina, resistina e a proteína de ligação ao retinol [RBP]), entre outras (LAFONTAN, 2014; PIYA; MCTERNAN; KUMAR, 2013).

Um dos principais reguladores da formação, metabolismo e sobrevivência dos adipócitos é o receptor ativador da proliferação peroxissomal do tipo gama (*peroxisome proliferator-activated receptors*, PPAR γ). O PPAR γ é membro de uma família de receptores nucleares que atuam como fatores de transcrição, modulando a expressão de diversos genes. Em mamíferos, os membros desta família são: PPAR α (ou NR1C1), PPAR δ/β (ou NR1C2) e PPAR γ (ou NR1C3), sendo que este último apresenta duas isoformas: $\gamma 1$ e $\gamma 2$ (LEFTEROVA et al., 2014). Os PPAR γ , são expressos principalmente no TAB e tecido adiposo marrom (TAM), onde possuem papel fundamental no controle da diferenciação dos pré-adipócitos em adipócitos maduros, síntese de TAG, função secretora e sobrevivência destas células (CRISTANCHO; LAZAR, 2011). Estes receptores controlam no TAB e TAM a expressão de diversas proteínas envolvidas em diversas etapas do metabolismo de lipídeos incluindo a captação, ativação, esterificação, reciclagem e oxidação dos AGs, sendo essenciais para a

manutenção e o desenvolvimento deste tecido (CRISTANCHO; LAZAR, 2011; LEFTEROVA et al., 2014).

Devido a suas importantes funções metabólicas e endócrinas, o funcionamento inadequado do TAB que ocorre em situações de aumento (obesidade) ou redução (lipodistrofia) excessivos de sua massa está associado, por mecanismos ainda desconhecidos, com o desenvolvimento de diversas complicações metabólicas que incluem a resistência à insulina, esteatose hepática, aterosclerose, hipertensão arterial e câncer. Neste sentido, estudos recentes tem sugerido que a inflamação crônica de baixa intensidade que acomete diversos tecidos na obesidade pode ter participação importante conectando o aumento excessivo da adiposidade com estas complicações metabólicas. Na obesidade, ocorre no TAB o recrutamento, infiltração e polarização dos leucócitos para perfil pró-inflamatório. Estas células em conjunto com adipócitos hipertrofiados secretam diversas citocinas pró-inflamatórias que exercem ações deletérias no TAB, dentre as quais podemos destacar, a inibição da diferenciação e formação de novos adipócitos, a ativação da lipólise e indução de resistência à insulina. Em conjunto, estas alterações reduzem a capacidade do TAB de armazenar lipídeos aumentando os níveis circulantes e a deposição ectópica destes em tecidos periféricos como o fígado, músculo esquelético e pâncreas. Assim, o funcionamento adequado do TAB de armazenamento e tamponamento de lipídeos protege os tecidos periféricos da lipotoxicidade (BÓDIS; RODEN, 2018; IMRIE; ABBAS; KEARNEY, 2010; SNEL et al., 2012).

2.2 Lipodistrofia

Similarmente a obesidade, a lipodistrofia também está associada com o desenvolvimento de diversas doenças metabólicas como a resistência à insulina, dislipidemias, hipertensão, esteatose hepática, aterosclerose, entre outras, por mecanismo que também envolve, pelo menos em parte, inflamação, deposição ectópica de lipídeos e lipotoxicidade. A lipodistrofia consiste em um grupo heterogêneo de doenças, caracterizadas pela ausência parcial ou total de tecido adiposo. Na lipodistrofia, a gravidade das complicações metabólicas é diretamente proporcional ao grau de perda de TAB (GARG, 2000; GARG; AGARWAL, 2009). As lipodistrofias genéticas, geralmente mais graves, podem ser divididas em dois tipos: lipodistrofia generalizada congênita (LGC, síndrome de Berardinelli-Seip) que é a perda generalizada de gordura corporal que ocorre desde o nascimento; e a lipodistrofia parcial familiar (LPF) que é definida como a perda parcial de gordura corporal que ocorre geralmente

durante a infância ou puberdade. Já foram descritos aproximadamente 250 tipos de LGC e um número muito maior de LPF, que são em sua maioria extremamente raras (BROWN et al., 2016; GARG, 2011). Já a lipodistrofia de origem farmacológica é encontrada principalmente em pacientes soropositivos para o vírus da imunodeficiência humana (HIV) como resultado secundário à terapia antirretroviral composta por inibidores de proteases e da transcriptase reversa. Aproximadamente 40-70% das pessoas vivendo com HIV/Aids sob terapia antirretroviral desenvolvem lipodistrofia, sendo esta a forma mais comum de lipodistrofia encontrada atualmente (HUSSAIN; PATNI; GARG, 2018; MALLEWA et al., 2008).

Nos últimos anos houve progresso considerável na compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento dos diversos tipos de lipodistrofias e suas complicações metabólicas, principalmente pelo uso de modelos animais geneticamente modificados que reproduzem muitos dos fenótipos encontrados na clínica (SAVAGE, 2009). Diversos modelos animais de lipodistrofia já foram descritos contendo deficiência específica de algumas proteínas importantes para a formação e funcionamento do TAB e TAM, como receptor de insulina, raptor, PPAR γ , entre outros (LEE et al., 2016a, 2016b; SOFTIC et al., 2016; WANG et al., 2013a). O primeiro modelo animal de lipodistrofia severa com ausência total de TAB denominado de A-ZIP foi produzido por Reitman e colaboradores. Nestes estudos pioneiros foi demonstrado que o transplante de gordura de animais controles para os camundongos A-ZIP atenuava significativamente a resistência à insulina, hiperglicemia, hiperlipidemia, esteatose hepática e hepatomegalia encontrada nestes animais (GAVRILOVA et al., 2000; MOITRA et al., 1998; REITMAN; GAVRILOVA, 2000). Interessantemente, o transplante de gordura de camundongos obesos deficientes em leptina (*ob/ob*) para camundongos A-ZIP atenuou apenas parcialmente as complicações metabólicas associadas a lipodistrofia severa, sugerindo que a deficiência desta adipocina é um fator determinante no desenvolvimento destas complicações (COLOMBO et al., 2002). Em suporte a esta hipótese, a infusão de leptina em camundongos lipodistróficos pela deficiência de SREBP-1c reduziu a resistência à insulina e a hiperlipidemia nestes animais (SHIMOMURA et al., 1999). Resultados similares foram encontrados em pacientes lipodistróficos submetidos à tratamento com leptina recombinante humana (metreleptina). Neste estudo publicado em 2002, 9 mulheres lipodistróficas com níveis séricos de leptina abaixo de 4 ng/mL, sendo 8 delas diabéticas, foram tratadas com metreleptina por 4 meses. Foi verificado nestas pacientes uma redução dos níveis circulantes de hemoglobina glicada e triacilglicerol e do volume hepático (ORAL et al., 2002).

Outros estudos confirmaram os efeitos benéficos da metreleptina em pacientes com diversos tipos de lipodistrofia, incluindo as formas mais graves (AKINCI; MERAL; ORAL, 2018; EBIHARA et al., 2007; HAQUE et al., 2002). Os mecanismos envolvidos nestas ações da leptina, entretanto, ainda não foram completamente elucidados.

2.3 Lipodistrofia e esteatose hepática

Tanto a obesidade quanto a lipodistrofia estão geralmente associadas com uma maior deposição de lipídeos no fígado e resistência hepática à insulina caracterizada pela inabilidade deste hormônio de inibir a gliconeogênese e a produção de glicose por este órgão. A deposição exacerbada de lipídeos em hepatócitos ocorre quando a velocidade de captação e a síntese *de novo* de lipídeos excedem a velocidade de oxidação e secreção destas moléculas na forma de triacilglicerol. A deposição de TAG nos hepatócitos pode ocorrer de duas formas distintas: a macrovesicular caracterizada pela presença de um único e volumoso vacúolo (gota) de lipídeos acompanhada de deslocamento do núcleo para a periferia; e a microvesicular caracterizada por uma grande número de pequenos vacúolos (gotas) de lipídeos, que não interferem com a posição central do núcleo.

A deposição exacerbada de lipídeos no fígado é um fenótipo comum característico de um grupo de doenças denominadas doença hepática gordurosa de origem não-alcóolica (DHGNA). Este grupo engloba desde uma simples esteatose as formas mais graves da doença como a esteatopatite (EHNA), cirrose e hepatocarcinoma (HCC), onde o acúmulo de lipídeos está associado ao desenvolvimento de processo inflamatório hepático e fibrose. Importante ressaltar que o processo inflamatório hepático envolve a complexa interação entre hepatócitos e macrófagos residentes denominados de células de Kupffer, que, através da secreção diversos mediadores pró-inflamatórios, participam do desenvolvimento da resistência à insulina e progressão esteatose-esteatopatite-hepatocarcinoma (LANTHIER; LECLERCQ, 2014). A DHGNA afeta em torno de 25% da população adulta, devido principalmente ao aumento exponencial da incidência da obesidade no mundo (YOUNOSSI et al., 2016). A presença de DHGNA em indivíduos não-obesos, entretanto, não é incomum, afetando aproximadamente 16% da população com peso considerado normal (eutrófica) e praticamente 100% dos pacientes com lipodistrofia severa (KUMAR; MOHAN, 2017; WATTACHERIL; SANYAL, 2016).

A exata sequência de eventos e mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento da esteatose e sua progressão para formas mais graves esteatopatite-

hepatocarcinoma não são bem compreendidos. Na lipodistrofia, a redução da capacidade do TAB de estocar lipídeos, aumenta a oferta de ácidos graxos e outros lipídeos para os hepatócitos promovendo assim maior síntese e deposição de triacilglicerol nestas células. Além dos ácidos graxos pré-formados oriundos da dieta ou da lipólise do TAB, uma outra fonte significativa (aproximadamente 25%) de ácidos graxos para a síntese de TAG é o processo de lipogênese *de novo* hepático. Neste processo, moléculas de acetil-CoA oriundas de diversos processos metabólicos são carboxiladas no citosol à malonil-CoA por reação enzimática catalisada pela acetil-CoA carboxilase (ACC). Em sequência, o malonil-CoA é convertido em ácido graxo pela ação do complexo multienzimático ácido graxo sintase (FAS). O produto principal do processo de lipogênese *de novo* é o ácido palmítico, um ácido graxo saturado de 16 carbonos que pode ser alongado a ácido esteárico (18:0) por uma família de elongases. Ambos ácidos palmítico e esteárico podem ser dessaturados a ácido palmitoleico (16:1) e oleico (18:1), respectivamente, pela ação da enzima estearoil-CoA dessaturase (SCD-1). Importante ressaltar que a verdadeira contribuição do processo de lipogênese *de novo* na geração de ácidos graxos estocados como TAG na DHGNA associada a lipodistrofia ainda é desconhecida.

Em resposta a maior deposição de lipídeos, os hepatócitos aumentam sua capacidade de oxidar ácidos graxos de maneira não eficiente promovendo assim uma maior produção de espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo, que excedem a capacidade anti-oxidante de defesa, causando disfunção mitocondrial, inflamação e resistência à insulina (KOLIAKI et al., 2015). Além do estresse oxidativo, ácidos graxos em excesso, principalmente os saturados, podem promover inflamação e resistência à insulina hepáticas ativando diretamente a via canônica de sinalização TLR4-NFκB ou indiretamente por meio da indução de estresse de retículo e/ou aumento da síntese local de diacilglicerol e outros mediadores lipídicos como as ceramidas e prostaglandinas. Cronicamente, estas alterações podem acarretar em lesão hepática, deposição excessiva de matriz extracelular e fibrose, processos que envolvem a ativação de células estreladas de Ito localizadas no espaço perissinusóide (CHALASANI et al., 2012, 2018; WANG et al., 2013b).

Importante ressaltar que ao contrário dos ácidos graxos saturados, ácidos graxos poli-insaturados do tipo ômega 3 (ω -3) apresentam efeitos benéficos no fígado aumentando o metabolismo oxidativo, reduzindo a deposição de lipídeos e esteatose, inflamação e resistência à insulina (HOWELL et al., 2009; JUMP, 2008). Diversos mecanismos parecem estar envolvidos nestas ações benéficas dos ω -3 como a ativação de PPAR α e do metabolismo

oxidativo peroxissomal e mitocondrial, ativação de GPR120, produção de mediadores lipídicos anti-inflamatórios como as resolvinas, protectinas e maresinas, entre outros (GONZALEZ-PERIZ et al., 2009; OH et al., 2011; SPITE; CLÀRIA; SERHAN, 2014; WHITE et al., 2014).

2.4 Tratamento da lipodistrofia e suas complicações

Devido à complexidade causal e heterogeneidade fenotípica, até o momento não existem fármacos disponíveis para o tratamento/prevenção da lipodistrofia. Desta forma a terapêutica para pacientes lipodistróficos tem como objetivo minimizar as complicações comuns associadas a esta condição como a resistência à insulina, diabetes, esteatose hepática e dislipidemias. Por este motivo, além da administração de leptina discutido anteriormente, o uso de fármacos sensibilizantes à insulina costumam ser a principal intervenção utilizada em pacientes lipodistróficos (Akinci, Meral e Oral, 2018; Chalasani et al., 2018).

A metformina, por exemplo, um fármaco largamente utilizado no tratamento da resistência à insulina em pacientes com diabetes tipo 2 obesos ou não, teve sua eficiência investigada em pacientes HIV positivos que apresentavam lipodistrofia como consequência secundária à terapia antiviral. Em dois estudos clínicos distintos, o tratamento com metformina reduziu significativamente a resistência à insulina, o peso corporal e a pressão arterial em pacientes HIV positivos lipodistróficos (Hadigan et al., 2000; Hadigan, Rabe e Grinspoon, 2002). Em outro estudo, a efetividade da metformina foi comparada a da rosiglitazona no tratamento de pacientes HIV positivos lipodistróficos. Neste estudo foi encontrado que a metformina e a rosiglitazona possuem efeitos benéficos equiparáveis na sensibilidade à insulina, mas em relação ao perfil lipídico e função endotelial, a metformina mostrou-se mais efetiva que a rosiglitazona em melhorar estes parâmetros (van Wijk et al., 2005). Importante ressaltar que alguns estudos não encontraram efeitos positivos na homeostase da glicose ou perfil lipídico (E. et al., 2003; Diehl et al., 2008) ou encontraram uma aceleração da perda de tecido adiposo periférico (Kohli et al., 2007) em pacientes lipodistróficos tratados com metformina.

Outra classe de fármacos utilizada no tratamento das morbidades associadas a lipodistrofia são as tiazolidinedionas (TZDs), principalmente a pioglitazona e rosiglitazona, ligantes sintéticos e potentes ativadores de PPAR γ . Nós demonstramos recentemente em camundongos, que a rosiglitazona abole a intolerância à glicose e a hiperinsulinemia, mas exacerba a hepatomegalia associada à lipodistrofia severa (Blanchard et al., 2018).

Similarmente aos roedores, o tratamento de pacientes lipodistróficos com pioglitazona atenua a resistência à insulina, hiperinsulinemia e hipertrigliceridemia, bem como os quadros de esteatoepatite e outras comorbidades resistentes ao tratamento com metformina isolado (Moreau et al., 2007; Gambineri et al., 2008; Collet-Gaudillat, Billon-Bancel e Beressi, 2009; Iwanishi et al., 2009). Já a rosiglitazona melhorou a sensibilidade à insulina, atenuou a hiperglicemia, mas afetou negativamente o perfil lipídico de pacientes lipodistróficos portadores de diabetes mellitus tipo 2 (Owen et al., 2003; Lüdtke et al., 2005; Schindler et al., 2009). Dados conflitantes, entretanto, foram encontrados referentes aos efeitos das TZDs na prevenção/recuperação da massa adiposa em pacientes lipodistróficos com estudos relatando efeitos positivos, negativos ou ausência de efeitos (Simha, Rao e Garg, 2008; Raboud et al., 2010; Gelato et al., 2002; Sutinen et al., 2003; Carr et al., 2004; Hadigan et al., 2004; Feldt et al., 2006; Cavalcanti et al., 2007). Importante ressaltar, que o tratamento com rosiglitazona está associado a maior risco de morte por eventos cardiovasculares, principalmente em pacientes com histórico prévio de doença cardiovascular (GR et al., 2008; Kahn et al., 2008; Nissen e Wolski, 2010).

Outros fármacos que estão sendo investigados para uso na lipodistrofia são os análogos de ação prolongada do glucagon-like peptide-1 (GLP-1) e os inibidores do cotransportador sódio-glicose 2 (SGLT-2). O primeiro já está licenciado para o tratamento do diabetes mellitus tipo 2 associado ao sobrepeso desde 2009 e atua estimulando a secreção de insulina pelas células beta pancreáticas, inibindo a liberação de glucagon e melhorando a homeostase da glicose. Em pacientes lipodistróficos, porém, os análogos de GLP-1 promovem apenas redução da hemoglobina glicada e aumento no risco de pancreatite (Armstrong et al., 2013; Akinci, Meral e Oral, 2018). Os inibidores de SGLT-2 atuam diminuindo a reabsorção renal, a absorção intestinal e a captação de glicose pelo coração. Em pacientes lipodistróficos, estes inibidores reduziram os níveis circulantes de hemoglobina glicada e triacilgliceróis e em alguns estudos de caso, reduziram a esteatose hepática (Akinci, Meral e Oral, 2018). Embora esses agentes estejam sendo usados na prática clínica, nenhuma avaliação sistemática da eficácia em pacientes com lipodistrofia foi realizada até o momento.

Do ponto de vista nutricional, é recomendado para pacientes lipodistróficos, adesão as diretrizes da *American Heart Association* (AHA) e *American Diabetes Association* (ADA). Ambos recomendam uma dieta com 30% de gordura, principalmente monoinsaturadas, e 70% de carboidratos e proteínas (Howard et al., 2000; ADA, 2002). Nesse sentido um estudo

transversal mostrou que a adesão a dieta mediterrânea (compatível com as indicações da AHA e ADA) atenua a resistência à insulina e aumenta os níveis de colesterol HDL em pacientes HIV positivos lipodistróficos (Tsiodras et al., 2009). Adicionalmente a suplementação com fibras e o uso do óleo de peixe que contém altas doses de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 (ω -3) poderiam beneficiar portadores de lipodistrofia (KM et al., 2003; M et al., 2005). As primeiras evidências sobre o possível efeito dos ω -3 em pacientes com lipodistrofia surgiram na década de 80. A substituição de ácidos graxos de cadeia média por ω -3 na dieta reduziu significativamente os níveis de triacilgliceróis circulantes e a resistência à insulina (Wilson et al., 1983). Em um outro, estudo pacientes lipodistróficos que fizeram ingestão de dieta rica em ω -3 apresentaram diminuição do peso do fígado e reversão da hiperinsulinemia (STACPOOLE et al., 1988). Os dados sobre o efeito do ω -3 no contexto da lipodistrofia são escassos e limitados a estudos de caso, contudo apresentam grande potencial para o tratamento das morbidades associadas a lipodistrofia.

3. Conclusão

Diante do apresentado podemos concluir que a deleção de PPAR γ em adipócitos induz lipodistrofia severa, intolerância à glicose, hiperinsulinemia, e crescimento anormal do fígado. Nossas análises mostraram que o aumento do tecido hepático foi associado com aumento da deposição de TAG e glicogênio e do conteúdo celular do tecido, promovendo aumento das citocinas inflamatórias e a piora do fenótipo ao avanço da idade. Ao investigar molecularmente as alterações, encontramos que as principais alterações no modelo estavam ligadas ao metabolismo glicídico e lipídico, sobretudo com a lipogênese *de novo* apontado pela proteômica e confirmado por *western blot* como possível responsável pela esteatose apresentada em nosso modelo. Contudo como pode ser observado no estudo 2, o Fasnall se mostrou efetivo como uma opção terapêutica para nosso modelo de lipodistrofia severa, sua atuação se mostrou efetiva nas principais características apresentadas pelo modelo, através de redução de ganho de peso corporal, diminuição da hiperfagia, menor acúmulo de TAG hepático, melhora na tolerância da glicose independente da inflamação tecidual. Assim como o Fasnall, a partir dos dados apresentados pelo estudo 3, podemos sugerir que uma dieta com alto teor de ω -3 pode também ser usada como terapêutica para alguns parâmetros característicos da lipodistrofia como intolerância à glicose e inflamação tecidual. Estudos futuros com suplementação dos AGs eicosapentaenoico (C20:5 ω -3) e docosahexaenoico (C22:6 ω -3) podem melhor avaliar o potencial do ômega 3 frente a um quadro de lipodistrofia severa.

4. Referências bibliográficas

- AKINCI, B.; MERAL, R.; ORAL, E. A. Update on Therapeutic Options in Lipodystrophy. **Current Diabetes Reports**, v. 18, n. 12, p. 139, 29 dez. 2018.
- ATTIE, A. D.; SCHERER, P. E. Adipocyte metabolism and obesity. **Journal of Lipid Research**, v. 50, n. Supplement, p. S395–S399, 2009.
- BÓDIS, K.; RODEN, M. Energy metabolism of white adipose tissue and insulin resistance in humans. **European Journal of Clinical Investigation**, n. March, 2018.
- BROWN, R. J. et al. The diagnosis and management of lipodystrophy syndromes: A multi-society practice guideline. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 101, n. 12, p. 4500–4511, 2016.
- CHALASANI, N. et al. Erratum: The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice guideline by the american association for the study of liver diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association (American Jo. **American Journal of Gastroenterology**, v. 107, n. 10, p. 1598, 2012.
- CHALASANI, N. et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. **Hepatology**, v. 67, n. 1, p. 328–357, jan. 2018.
- CHIMIN, P. et al. Adipocyte mTORC1 deficiency promotes adipose tissue inflammation and NLRP3 inflammasome activation via oxidative stress and de novo ceramide synthesis. **Journal of Lipid Research**, v. 58, n. 9, p. 1797–1807, 2017.
- COLOMBO, C. et al. Transplantation of adipose tissue lacking leptin is unable to reverse the metabolic abnormalities associated with lipoatrophy. **Diabetes**, v. 51, n. 9, p. 2727–2733, 2002.
- CRISTANCHO, A. G.; LAZAR, M. A. Forming functional fat: A growing understanding of adipocyte differentiation. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 12, n. 11, p. 722–734, 2011.
- EBIHARA, K. et al. Efficacy and safety of leptin-replacement therapy and possible mechanisms of leptin actions in patients with generalized lipodystrophy. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 92, n. 2, p. 532–541, 2007.
- GARG, A. Lipodystrophies. **American Journal of Medicine**, v. 108, n. 2, p. 143–152, 2000.
- GARG, A. Lipodystrophies: Genetic and acquired body fat disorders. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 96, n. 11, p. 3313–3325, 2011.
- GARG, A.; AGARWAL, A. K. Lipodystrophies: Disorders of adipose tissue biology. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1791, n. 6, p. 507–513, jun. 2009.

GAVRILOVA, O. et al. Surgical implantation of adipose tissue reverses diabetes in lipotrophic mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 105, n. 3, p. 271–278, 2000.

GONZALEZ-PERIZ, A. et al. Obesity-induced insulin resistance and hepatic steatosis are alleviated by ω -3 fatty acids: a role for resolvins and protectins. **The FASEB Journal**, v. 23, n. 6, p. 1946–1957, 2009.

HAQUE, W. A. et al. Serum Adiponectin and Leptin Levels in Patients with Lipodystrophies. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 87, n. 5, p. 2395–2395, maio 2002.

HOWELL, G. et al. N-3 polyunsaturated fatty acids suppress insulin-induced SREBP-1c transcription via reduced trans-activating capacity of LXR α . **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1791, n. 12, p. 1190–1196, 2009.

HUSSAIN, I.; PATNI, N.; GARG, A. Lipodystrophies, dyslipidaemias and atherosclerotic cardiovascular disease. **Pathology**, n. xxx, p. 1–11, 2018.

IMRIE, H.; ABBAS, A.; KEARNEY, M. Insulin resistance, lipotoxicity and endothelial dysfunction. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1801, n. 3, p. 320–326, 2010.

JUMP, D. B. N-3 polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription. **Current Opinion in Lipidology**, v. 19, n. 3, p. 242–247, jun. 2008.

KOLIAKI, C. et al. Adaptation of Hepatic Mitochondrial Function in Humans with Non-Alcoholic Fatty Liver Is Lost in Steatohepatitis. **Cell Metabolism**, v. 21, n. 5, p. 739–746, 2015.

KUMAR, R.; MOHAN, S. Non-alcoholic Fatty Liver Disease in Lean Subjects: Characteristics and Implications. **Journal of Clinical and Translational Hepatology**, v. XX, n. XX, p. 1–8, 2017.

LAFONTAN, M. Adipose tissue and adipocyte dysregulation. **Diabetes and Metabolism**, v. 40, n. 1, p. 16–28, 2014.

LANTHIER, N.; LECLERCQ, I. A. Liver and systemic insulin resistance. **Hepatology**, v. 60, n. 3, p. 1113–1114, set. 2014.

LEE, P. L. et al. Raptor/mTORC1 loss in adipocytes causes progressive lipodystrophy and fatty liver disease. **Molecular Metabolism**, v. 5, n. 6, p. 422–432, jun. 2016a.

LEE, S.-A. et al. Adipocyte-specific overexpression of retinol-binding protein 4 causes hepatic steatosis in mice. **Hepatology**, v. 64, n. 5, p. 1534–1546, nov. 2016b.

LEFTEROVA, M. I. et al. PPAR γ and the global map of adipogenesis and beyond. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 25, n. 6, p. 293–302, 2014.

MALLEWA, J. E. et al. HIV-associated lipodystrophy: A review of underlying mechanisms and therapeutic options. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, n. 4, p. 648–660, 2008.

MOITRA, J. et al. Life without white fat: A transgenic mouse. **Genes and Development**, v. 12, n. 20, p. 3168–3181, 1998.

OH, D. Y. et al. NIH Public Access. **Cell**, v. 142, n. 5, p. 687–698, 2011.

ORAL, E. A. et al. Leptin-Replacement Therapy for Lipodystrophy. **New England Journal of Medicine**, v. 346, n. 8, p. 570–578, 21 fev. 2002.

PHAN, J.; REUE, K. Lipin, a lipodystrophy and obesity gene. **Cell Metabolism**, v. 1, n. 1, p. 73–83, 2005.

PIYA, M. K.; MCTERNAN, P. G.; KUMAR, S. Adipokine inflammation and insulin resistance: The role of glucose, lipids and endotoxin. **Journal of Endocrinology**, v. 216, n. 1, 2013.

REITMAN, M. L.; GAVRILOVA, O. A-ZIP/F-1 mice lacking white fat: A model for understanding lipotrophic diabetes. **International Journal of Obesity**, v. 24, p. S11–S14, 2000.

SAVAGE, D. B. Mouse models of inherited lipodystrophy. **Disease Models & Mechanisms**, v. 2, n. 11–12, p. 554–562, 2009.

SHEARIN, A. L. et al. Lack of AKT in adipocytes causes severe lipodystrophy. **Molecular Metabolism**, v. 5, n. 7, p. 472–479, 2016.

SHIMOMURA, I. et al. Leptin reverses insulin resistance and diabetes mellitus in mice with congenital lipodystrophy. **Nature**, v. 401, n. 6748, p. 73–76, 1999.

SNEL, M. et al. Ectopic fat and insulin resistance: Pathophysiology and effect of diet and lifestyle interventions. **International Journal of Endocrinology**, v. 2012, 2012.

SOFTIC, S. et al. Lipodystrophy due to adipose tissue-specific insulin receptor knockout results in progressive NAFLD. **Diabetes**, v. 65, n. 8, p. 2187–2200, 2016.

SPITE, M.; CLÀRIA, J.; SERHAN, C. N. Resolvins, Specialized Proresolving Lipid Mediators, and Their Potential Roles in Metabolic Diseases. **Cell Metabolism**, v. 19, n. 1, p. 21–36, jan. 2014.

WANG, F. et al. Lipotrophy and severe metabolic disturbance in mice with fat-specific deletion of PPAR. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 46, p. 18656–18661, 2013a.

WANG, Y. et al. Hepatic stellate cells, liver innate immunity, and hepatitis C virus. **Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)**, v. 28, n. SUPPL 1, p. 112–115, 2013b.

WATTACHERIL, J.; SANYAL, A. J. Lean NAFLD: an Underrecognized Outlier. **Current Hepatology Reports**, v. 15, n. 2, p. 134–139, 2016.

WHITE, P. J. et al. Protectin DX alleviates insulin resistance by activating a myokine-liver glucoregulatory axis. **Nature Medicine**, v. 20, n. 6, p. 664–669, 2014.

YOUNOSSI, Z. M. et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. **Hepatology**, v. 64, n. 1, p. 73–84, 2016.