

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS  
CURSO DE BIOMEDICINA**

**LUISA PESSOA SOARES**

**ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE PARP-1 E ADIPONECTINA EM PESSOAS COM  
LIPODISTROFIA GENERALIZADA CONGÊNITA TIPO 2**

Natal  
Dezembro 2022

ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE PARP-1 E ADIPONECTINA EM PESSOAS COM  
LIPODISTROFIA GENERALIZADA CONGÊNITA TIPO 2

por

Luisa Pessoa Soares

Monografia Apresentada à  
Coordenação do Curso de  
Biomedicina da Universidade Federal  
do Rio Grande do Norte, como  
Requisito Parcial à Obtenção do  
Título de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Julliane Tamara Araújo de Melo Campos

Natal  
Dezembro 2022

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN

Sistema de Bibliotecas - SISBI

Catálogo de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial Prof. Leopoldo Nelson - -Centro de Biociências - CB

Soares, Luisa Pessoa.

Estudo da relação entre PARP-1 e adiponectina em pessoas com lipodistrofia generalizada congênita tipo 2 / Luisa Pessoa Soares. - 2022.

50 f.: il.

Monografia (graduação) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Biociências, Graduação em Biomedicina. Natal/RN, 2022.

Orientadora: Profa. Dra. Julliane Tamara Araújo de Melo Campos.

1. Adiponectina - Monografia. 2. CGL - Monografia. 3. PARP-1 - Monografia. 4. Regulação gênica - Monografia. I. Campos, Julliane Tamara Araújo de Melo. II. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. III. Título.

RN/UF/BSCB

CDU 577.171.4

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS  
CURSO DE BIOMEDICINA**

A Monografia Estudo da Relação entre PARP-1 e Adiponectina em Pessoas com Lipodistrofia Generalizada Congênita Tipo 2

elaborada por Luisa Pessoa Soares

e aprovada por todos os membros da Banca examinadora foi aceita pelo Curso de Biomedicina e homologada pelos membros da banca, como requisito parcial à obtenção do título de

BACHAREL EM BIOMEDICINA

Natal, 12 de dezembro de 2022

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Julliane Tamara Araújo de Melo Campos  
(Departamento de Morfologia)

---

Prof. Dr. Josivan Gomes de Lima  
(Hospital Universitário Onofre Lopes)

---

Prof. Dr. Raimundo Fernandes de Araujo Junior  
(Departamento de Morfologia)

## AGRADECIMENTOS

À Julliane Tamara Araújo de Melo, minha orientadora, que é um exemplo de discente e de mulher. Ela não só me ajudou a construir esse projeto, mas também me mostrou que é possível conciliar a responsabilidade e excelência com cooperação e compreensão.

Aos exemplares professores e preceptores que me guiaram nessa jornada pela Biomedicina, na teoria e na prática, e que me mostraram a beleza e os desafios das mais diversas áreas desse curso.

Aos amigos do laboratório, que me acolheram e acompanharam durante essa fase decisiva com muitos ensinamentos e risadas. E aos meus companheiros de estágio, que estavam ao meu lado no momento em que tudo foi posto à prova, me proporcionando momentos de desabafo, gargalhadas e afeto.

À meus colegas e amigos da Biomedicina e Farmácia, que sobreviveram e conquistaram comigo cada etapa. Em especial, à Rayssa, Georggia, Rayanne, Julliany, Deborah e Matheus, que seguraram na minha mão nas vitórias e nas adversidades.

À minha família, que me apoiou desde o primeiro momento, que tornou tudo isso possível e me deu carinho e suporte sempre que precisei, me ajudando a trilhar esse caminho. E ao meu esposo, Marcelo, que acredita fielmente no meu potencial e no meu talento, mesmo quando eu mesma perco a fé. E que me ajuda a ter forças para persistir e sonhar.

A Deus, pelas oportunidades que me foram dadas, por colocar na minha vida pessoas incríveis e me dar saúde, amor e sabedoria.

A todos os envolvidos direta ou indiretamente com esse trabalho, muito obrigada!

## RESUMO

A adipogênese é fortemente influenciada pela poli(ADP-ribose) polimerase-1 (PARP-1), que regula fatores de transcrição como PPAR $\gamma$  e C/EBP $\beta$ . PARP-1 medeia obesidade e hipertrofia de adipócitos, e sua alteração causa acúmulo de gordura hepática e dislipidemia em camundongos, características também presentes na Lipodistrofia Generalizada Congênita (CGL), um conjunto de doenças raras caracterizadas por deficiência de tecido adiposo subcutâneo (sWAT). Indivíduos afetados apresentam baixos níveis de adiponectina (APN), que possui propriedades metabólicas importantes. Em fibroblastos cardíacos murinos, PARP-1 é um repressor transcricional de APN através da poli(ADP-ribosilação) do PPAR $\gamma$ . Posto isso, observamos a expressão de PARP-1 em pessoas com CGL tipos 1 e 2 e, nos indivíduos com CGL2 (CGL tipo 2), analisamos sua relação com os níveis de APN. Coletamos amostras de sangue periférico de 4 indivíduos com CGL1 (CGL tipo 1), 16 com CGL2 e 29 controles, separamos o plasma, extraímos e quantificamos o DNA de leucócitos, a fim de confirmar o diagnóstico de CGL2 por meio de sequenciamento capilar de DNA, e analisamos os níveis de mRNA de PARP-1 por qPCR. Western blotting para APN foi feito usando o plasma. Percebemos que a expressão de PARP-1 foi significativamente mais baixa nos pacientes CGL2 em comparação aos controles ( $p < 0,05$ ). Além disso, tal expressão se correlaciona negativamente com os níveis de APN ( $p = 0,034$ ), indicando que PARP-1 pode ser um regulador de APN em CGL2. Mais estudos são necessários sobre o papel dessa relação no contexto de uma perda generalizada congênita de sWAT.

**Palavras-Chave:** CGL, PARP-1, Adiponectina, Regulação gênica.

## ABSTRACT

Adipogenesis is strongly influenced by poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1), which regulates transcription factors such as PPAR $\gamma$  and C/EBP $\beta$ . PARP-1 mediates obesity and adipocyte hypertrophy, and its alteration causes hepatic fat accumulation and dyslipidemia in mice, features also present in Congenital Generalized Lipodystrophy (CGL), a set of rare diseases characterized by subcutaneous adipose tissue (sWAT) deficiency. Affected individuals have low levels of adiponectin (APN), which has important metabolic properties. In murine cardiac fibroblasts, PARP-1 is a transcriptional repressor of APN through poly(ADP-ribosylation) of PPAR $\gamma$ . That said, we observed PARP-1 expression in people with CGL types 1 and 2 and, in individuals with CGL2 (CGL type 2), we analyzed its relationship with APN levels. We collected peripheral blood samples from 4 individuals with CGL1 (CGL type 1), 16 with CGL2 and 29 controls, separated the plasma, extracted and quantified leukocyte DNA in order to confirm the diagnosis of CGL2 through capillary DNA sequencing, and analyzed PARP-1 mRNA levels by qPCR. Western blotting for APN was done using plasma. We found that PARP-1 expression was significantly lower in CGL2 patients compared to controls ( $p < 0.05$ ). Furthermore, such expression is negatively correlated with APN levels ( $p = 0.034$ ), indicating that PARP-1 may be an APN regulator in CGL2. More studies are needed on the role of this relationship in the context of a generalized congenital sWAT loss.

**Key-words:** CGL, PARP-1, Adiponectin, Gene regulation.

## ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS .....	10
LISTA DE TABELAS .....	13
LISTA DE FIGURAS .....	14
1      INTRODUÇÃO .....	15
1.1    Fisiologia adipocitária .....	15
1.2    Adipogênese .....	17
1.3    PARP-1 e Tecido Adiposo .....	19
1.4    Lipodistrofias e a síndrome de Berardinelli-Seip (BSCL) .....	23
1.5    Adiponectina .....	25
1.6    Justificativas .....	26
2      OBJETIVOS .....	26
3      MATERIAIS E MÉTODOS .....	27
3.1    Recrutamento de Pacientes .....	27
3.2    Coleta de Sangue e Processamento de Amostras .....	28
3.3    Extração de <i>DNA</i> , <i>RNA</i> e proteínas .....	28
3.4    Quantificação de <i>DNA</i> .....	29
3.5    Sequenciamento Capilar .....	30
3.6    Síntese de <i>cDNA</i> (RT-PCR) .....	31
3.7    PCR Quantitativa (qPCR) .....	32
3.8    Western Blot .....	33
3.9    Testes Estatísticos .....	35
3.10   Análise de Bioinformática .....	36
4      RESULTADOS .....	36
4.1    Indivíduos CGL2 possuem uma expressão diminuída de PARP-1....	36
4.2    As análises de purinas danificadas não demonstraram diferenças médias entre o grupo controle e o grupo dos portadores da BSCL ..	37
4.3    Análise de interactoma entre genes de reparo e de adipogênese ....	38

5	DISCUSSÃO .....	39
6	CONCLUSÃO .....	43
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	44
8	ANEXO I - Artigo publicado .....	50

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>ABCA1</b>	Transportadores de Cassetes de Ligação de ATP, do inglês: <i>ATP-Binding Cassette Transporters</i>
<b>ADP-Ribose</b>	Adenosina Difosfato Ribose, do inglês: <i>Adenosine diphosphate Ribose</i>
<b>APN</b>	Adiponectina
<b>APS</b>	Ammonium Persulfate
<b>ATP</b>	Adenosina Trifosfato, do inglês: <i>Adenosine triphosphate</i>
<b>BAT</b>	Tecido Adiposo Marrom, do inglês: <i>Brown Adipose Tissue</i>
<b>BSCL</b>	Lipodistrofia Congênita de Berardinelli-Seip, do inglês: <i>Berardinelli-Seip Congenital Lipodystrophy</i>
<b>C/EBPs</b>	Proteína de Ligação ao Intensificador CCAAT, do inglês: <i>CCAAT/Enhancer-Binding Proteins</i>
<b>C/EBP<math>\alpha</math></b>	Proteína $\alpha$ de Ligação ao Intensificador CCAAT, do inglês: <i>CCAAT/enhancer-binding Protein <math>\alpha</math></i>
<b>CGL</b>	Lipodistrofia Generalizada Congênita, do inglês: <i>Congenital Generalized Lipodystrophy</i>
<b>CGL1</b>	CGL tipo 1
<b>CGL2</b>	CGL tipo 2
<b>CNPq</b>	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
<b>CREB</b>	Proteína de Ligação ao Elemento Responsiva a AMPc, do inglês: <i>cAMP Response Element-Binding Protein</i>
<b>CS</b>	Síndrome de Cockayne, do inglês: <i>Cockayne Syndrome</i>
<b>Ct</b>	<i>Cycle Threshold</i>

<b>DH</b>	Dieta Hipercalórica
<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
<b>EDTA</b>	Ácido Etilenodiamino Tetra-Tcético, do inglês <i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>
<b>FFA</b>	Ácidos Graxos Livres, do inglês: <i>Free Fatty Acids</i>
<b>GAPDH</b>	Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase, do inglês: <i>Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase</i>
<b>GLUT4</b>	Transportador de Glicose 4, do inglês: <i>Glucose Transporter Type 4</i>
<b>HGPS</b>	Síndrome de Hutchinson-Gilford, do inglês: <i>Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome</i>
<b>HUOL</b>	Hospital Universitário Onofre Lopes
<b>kDa</b>	kilodaltons
<b>NAD+</b>	Nicotina Adenina Dinucleotídeo
<b>NGPS</b>	Síndrome de Nestor-Guillermo, do inglês: <i>Nestor-Guillermo Progeria Syndrome</i>
<b>PAR</b>	polímeros de ADPR
<b>PARP-1</b>	poli(ADP-ribose)polimerase-1, do inglês: <i>Poly [ADP-ribose] Polymerase 1</i>
<b>PBS</b>	Salina Tamponada com Fosfato, do inglês: <i>Phosphate Buffered Saline</i>
<b>PPAR</b>	Receptor Ativado por Proliferador de Peroxissomo, do inglês: <i>Peroxisome Proliferator-activated Receptor</i>
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	Receptor $\gamma$ Ativado por Proliferador de Peroxissoma, do inglês: <i>Peroxisome Proliferator-activated Receptor <math>\gamma</math></i>
<b>IPP</b>	Interações Proteína-Proteína

<b>PVDF</b>	<i>Polyvinylidene Fluoride</i>
<b>RN</b>	Rio Grande do Norte
<b>RNA</b>	<i>Ribonucleic Acid</i>
<b>SDS</b>	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
<b>sWAT</b>	Tecido Adiposo Branco Subcutâneo, do inglês: <i>Subcutaneous White Adipose Tissue</i>
<b>TCLE</b>	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
<b>TEMED</b>	<i>Tetramethylethylenediamine</i>
<b>TGs</b>	triacilgliceróis
<b>TRIS-HCl</b>	<i>Tris Hydrochloride</i>
<b>U</b>	<i>Mann-Whitney</i>
<b>UCP-1</b>	Proteína Desacopladora 1, do inglês: <i>Uncoupling Protein 1</i>
<b>UFRN</b>	Universidade Federal do Rio Grande do Norte
<b>WAT</b>	Tecido Adiposo Branco, do inglês: <i>White Adipose Tissue</i>

**LISTA DE TABELAS**

	Página
Tabela 1: Iniciadores utilizados no sequenciamento capilar .....	31
Tabela 2: Anticorpos utilizados para western blotting .....	35

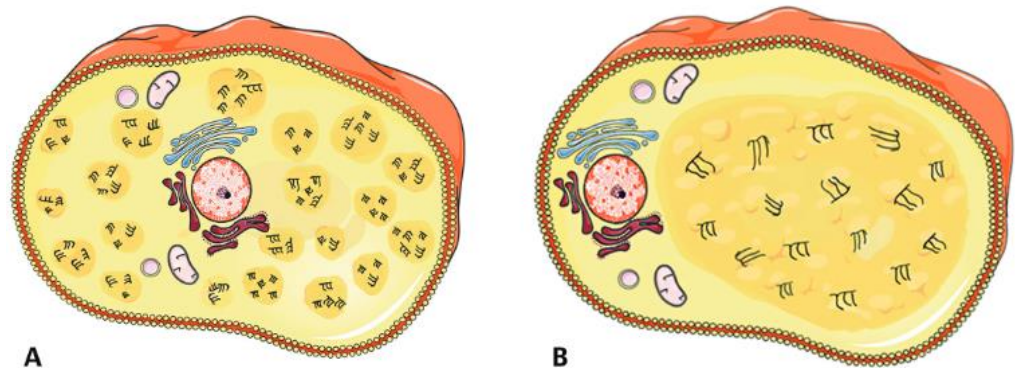
## LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Representação esquemática dos adipócitos .....	16
Figura 2: Modelo representativo da adipogênese .....	18
Figura 3: Alterações no reparo do DNA em doenças progeróides com variação significativa da função de PARP-1 .....	21
Figura 4: Comorbidades metabólicas resultantes da redução de SWAT nos casos de lipodistrofia congênita .....	24
Figura 5: Expressão de PARP-1 em leucócitos de sangue periférico .....	37
Figura 6: Correlação da expressão de PARP-1 e de APN em indivíduos CGL2 .....	38
Figura 7: Redes compreendendo os genes relacionados ao reparo do DNA e à lipodistrofia revisados no artigo publicado pelo grupo .....	39

## 1 – INTRODUÇÃO

### 1.1 – Fisiologia adipocitária

O tecido adiposo é composto por adipócitos e faz parte da classificação do tecido conjuntivo, possuindo funções de estocagem, metabolismo lipídico e amortecimento mecânico, assim como a distribuição de peso e atenuação de pressão (ZWICK et al., 2018). O aspecto morfofisiológico das vesículas lipídicas presentes nessas células define sua nomenclatura. O tecido adiposo branco (do inglês: *White Adipose Tissue*, WAT), ou unilocular, possui apenas uma única vesícula citoplasmática em cada célula, ocupando quase todo o citoplasma, enquanto que o tecido adiposo marrom (do inglês: *Brown Adipose Tissue*, BAT), ou multilocular, possui várias vesículas menores distribuídas no citoplasma de suas células (Figura 1). O BAT possui localização bastante limitada no organismo adulto e é especializado na termogênese, por meio das ações de desacoplamento da proteína desacopladora 1 (do inglês: *Uncoupling Protein 1*, UCP-1), localizada dentro das mitocôndrias. A UCP-1 catalisa um vazamento de prótons por meio da membrana mitocondrial interna, assim “desacoplando” a oxidação do combustível da síntese de Adenosina Trifosfato (do inglês: *Adenosine triphosphate*, ATP) (ROSEN; SPIEGELMAN, 2000, 2014). Vale ressaltar a presença do tecido adiposo bege, que é formado pela exposição prolongada ao frio, à ativação crônica do receptor  $\gamma$  ativado por proliferador de peroxissoma (do inglês: *Peroxisome Proliferator-activated receptor  $\gamma$* , PPAR $\gamma$ ), ou à sinalização adrenérgica, sendo ele UCP-1<sup>+</sup> (SARJEANT; STEPHENS, 2012; XUE et al., 2005).



**Figura 1 – Representação esquemática dos adipócitos.** A) Adipócito multilocular presente no tecido adiposo marrom, contendo diversas vesículas lipídicas menores distribuídas no citoplasma e núcleo centralizado; B) Adipócito unilocular característico do tecido adiposo branco, com apenas uma vesícula lipídica e núcleo excêntrico. Fonte: CARDOSO, Maria Eduarda Melo et al. AGPAT2: um gene, uma Lipodistrofia. *Genética na Escola* 2020, março, Edição XV nº1 p. 72-79 (CARDOSO DE MELO et al., 2020).

Os adipócitos uniloculares, que compõem o tecido adiposo subcutâneo (do inglês: *Subcutaneous White Adipose Tissue*, SWAT) estão relacionados à diversas síndromes hereditárias, como as lipodistrofias. Suas vesículas são responsáveis pelo armazenamento de triacilgliceróis (TGs), que advém tanto de síntese endógena como da absorção alimentar, via exógena, com conseqüente transporte pelas lipoproteínas plasmáticas. Em situações de saciedade, os TGs são estocados nas vesículas e, quando há a necessidade de energia para o organismo, algumas enzimas são responsáveis por modular a sua saída para o uso por outras células. Assim, por existirem danos teciduais associados ao excesso de armazenamento (em casos de aterosclerose, diabetes e obesidade) e à sua falta (nas lipodistrofias), o processo de estoque dessas moléculas deve ser bastante controlado (GOMES DE LIMA; CAMPOS, 2020).

A atenção para os adipócitos aumentou desde que se descobriu que essas células diferenciadas não só são capazes de armazenar e liberar TGs, mas também têm uma importante atividade endócrina (DE PAUW et

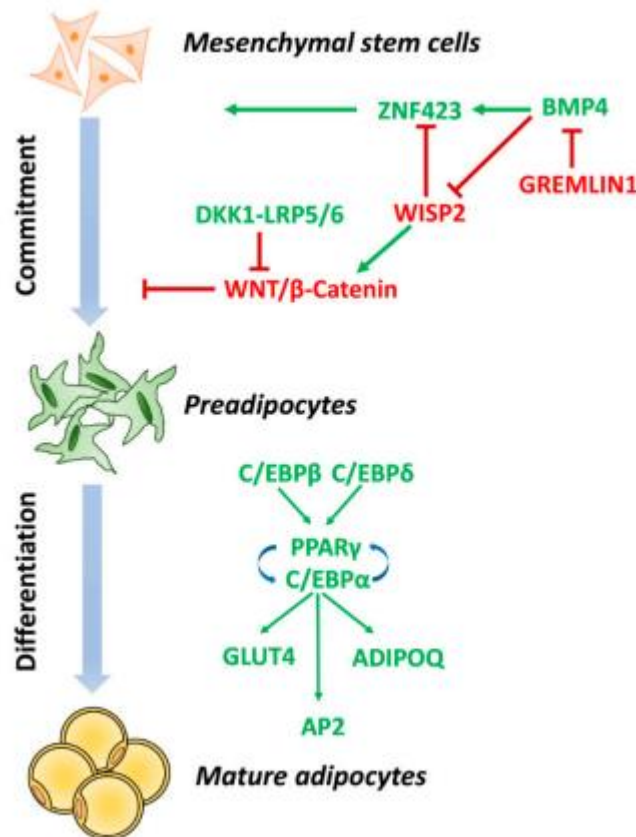
al., 2009). Nesse sentido, novos estudos têm demonstrado que esse tecido também regula importantes funções celulares por meio da secreção de hormônios, de fatores de crescimento e de citocinas, tornando-o um “órgão” endócrino. Tais moléculas, como a Leptina, Adiponectina (APN) e Adipsina, têm uma importante ação no equilíbrio energético e, provavelmente, no desenvolvimento de complicações no metabolismo (GOMES DE LIMA; CAMPOS, 2020; PETTO et al., 2015).

## 1.2 – Adipogênese

A fim de que o tecido adiposo tenha uma formação adequada, é necessário que o processo da adipogênese suceda de forma íntegra. Ela ocorre tanto como consequência normal da renovação celular, quanto da necessidade de mais tecido adiposo após armazenamento significativo de calorias e ganho de peso (PRINS; O’RAHILLY, 1997; ROSEN; SPIEGELMAN, 2000). Nesse processo, os adipoblastos indiferenciados sofrem numerosos eventos. A aquisição do fenótipo mais especializado é caracterizada por alterações cronológicas e sequenciais na atividade de vários fatores de transcrição, como a proteína de ligação ao elemento responsiva a AMPc (do inglês: *cAMP response element-binding protein*, CREB), a proteína de ligação ao intensificador CCAAT (do inglês: *CCAAT/enhancer-binding proteins*, C/EBPs) e receptor ativado por proliferador de peroxissomo (do inglês: *Peroxisome Proliferator-activated Receptor*, PPAR). Estes controlam a expressão de vários genes que codificam proteínas e efetores envolvidos no metabolismo e função dos adipócitos diferenciados (ROSEN; SPIEGELMAN, 2000).

A adipogênese engloba alterações morfológicas: cessação do crescimento, coincidente com a expressão dos fatores de transcrição do receptor  $\gamma$  ativado pelo PPAR $\gamma$  e proteína  $\alpha$  de ligação ao intensificador CCAAT (do inglês: *CCAAT/enhancer-binding protein*  $\alpha$ , C/EBP $\alpha$ ) (Figura Fatores de Transcrição); expressão de enzimas lipogênicas; extenso acúmulo de lipídios; e o estabelecimento de sensibilidade à maioria ou a todos os principais hormônios que afetam esse tipo de célula, incluindo a

insulina. Posteriormente, há a expansão clonal e as linhagens celulares pré-adipocíticas entram em um segundo e último período de parada de crescimento, que é seguida por diferenciação em tecido adiposo maduro (Figura 2) (ROSEN; SPIEGELMAN, 2000).



**Figura 2 – Modelo representativo da adipogênese.** A partir de células-tronco mesenquimais, os fatores de transcrição são ativados e regulados, levando à diferenciação em adipócitos maduros. Os marcadores de diferenciação, incluindo **PPAR $\gamma$**  e **C/EBP $\alpha$** , induzem e mantêm a expressão de genes adipogênicos chave, como **GLUT4** e **ADIPOQ**, que são necessários para a função adipocitária normal. Fonte: LONGO, M. et al. Adipose Tissue Dysfunction as Determinant of Obesity-Associated Metabolic Complications. *International Journal of Molecular Sciences* 2019, 20, 2358 (LONGO et al., 2019).

O “regulador mestre” da formação dos adipócitos maduros é o **PPAR $\gamma$** , um receptor nuclear hormonal, importante para adipogênese. Ele é

um fator de transcrição adipogênico tão potente que pode levar células não adipogênicas como fibroblastos e mioblastos a se tornarem adipócitos (ROSEN; SPIEGELMAN, 2000; SARJEANT; STEPHENS, 2012). Dessa forma, consistentes com estudos em murinos, indivíduos humanos com mutações raras de perda de função no gene PPAR $\gamma$  têm lipodistrofia e resistência à insulina grave. (ROSEN; SPIEGELMAN, 2014; SARJEANT; STEPHENS, 2012).

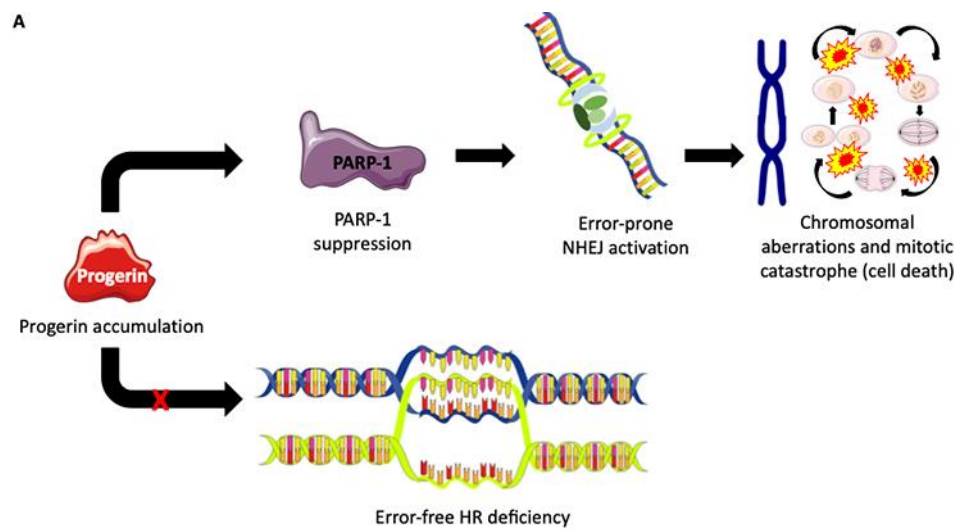
### 1.3 – PARP-1 e Tecido Adiposo

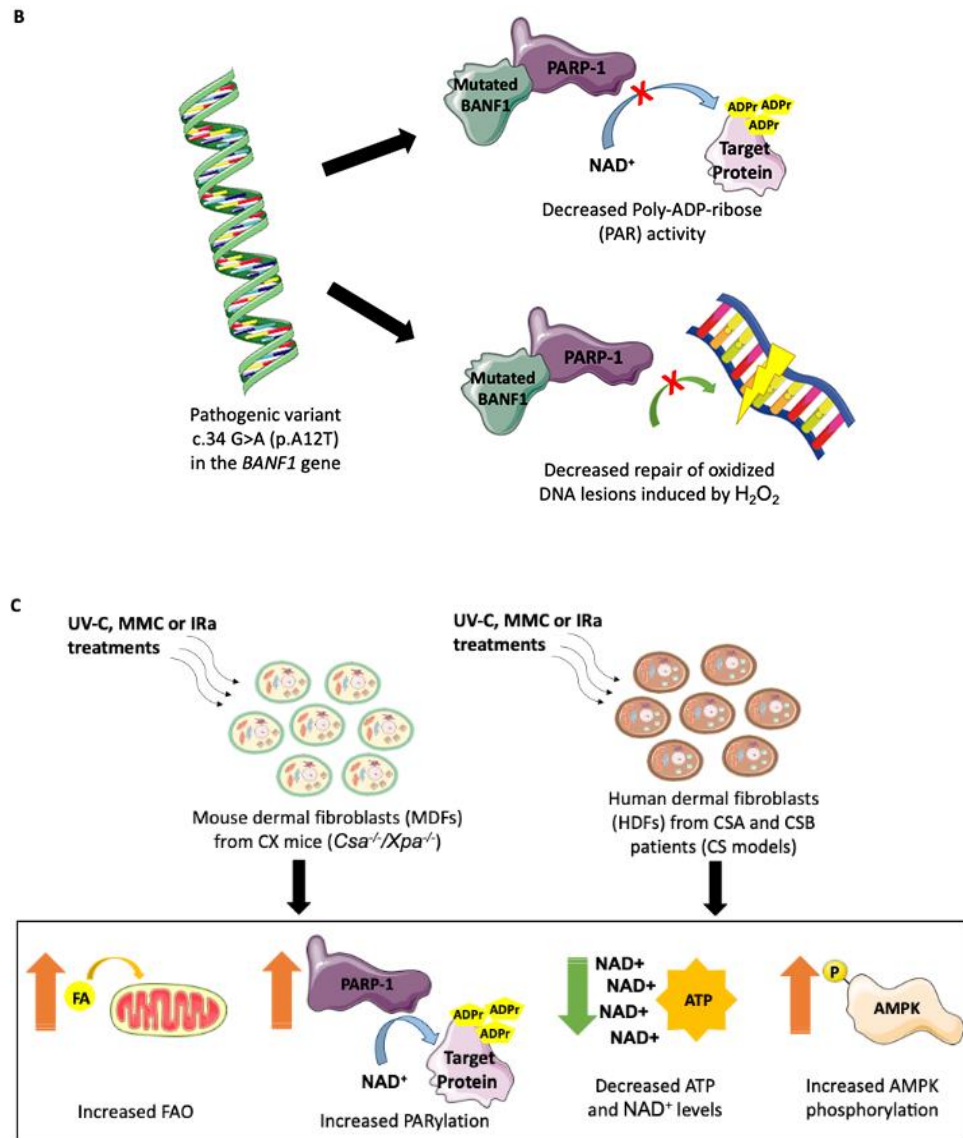
Um dos reguladores de PPAR $\gamma$  é a poli(ADP-ribose)polimerase-1 (do inglês: *Poly [ADP-ribose] Polymerase 1*, PARP-1), cuja presença é essencial nas primeiras 48 horas da adipogênese (LUO et al., 2017). PARP-1 é ativada por estruturas de *DNA* (do inglês: *Deoxyribonucleic acid*) ou estresse de torção criados durante a clivagem pela Topoisomerase II (LEHMANN et al., 2015) e catalisa a adição Nicotina Adenina Dinucleotídeo (NAD<sup>+</sup>) dependente de polímeros de Adenosina Difosfato Ribose (do inglês: *Adenosine diphosphate Ribose*, ADP-Ribose) (PAR) em uma variedade de proteínas alvo e, dentre elas, a PPAR $\gamma$  (ERENER et al., 2012a).

Esta proteína foi observada pela primeira vez na fração particulada de extratos de fígado de galinha e de ratos, intitulada primariamente de poli(ADPR) sintase (CHAMBON et al., 1966; FUJIMURA et al., 1967; NISHIZUKA et al., 1967). Ela teve sua função propriamente caracterizada e foi nomeada como PARP-1 no final da década de 1970 (HAYAISHI; UEDA, 1977; KUROSAKI et al., 1987; OKAYAMA et al., 1977; PURNELL; WHISH, 1980). Desde então, sua atividade na detecção e reparo de danos ao *DNA* vem sendo amplamente explorada (WANG; LUO; WANG, 2019). Tal associação é constatada em algumas doenças progeróides. Na Síndrome de Hutchinson-Gilford (do inglês: *Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome*, HGPS) oriunda de uma mutação no gene *LMNA*, na Síndrome de Cockayne (do inglês: *Cockayne Syndrome*, CS) proveniente de uma mutação nos genes *ERCC8* e *XPA*, e na Síndrome de Nestor-Guillermo (do inglês: *Nestor-Guillermo Progeria Syndrome*, NGPS) pela mutação do gene

*BANF1*, há uma alteração na função de PARP-1 e, como consequência, uma variação no reparo do *DNA* (Figura 3) (CAMPOS et al., 2022).

Nas quebras de fita simples (do inglês: *Single Strand Breaks*, SSBs), PARP-1 liga-se aos sítios danificados, onde sofre homodimerização por meio da síntese local de um PAR, a partir de  $\text{NAD}^+$ . A clivagem do  $\text{NAD}^+$  resulta em nicotinamida e ADP-ribose, sendo esta última utilizada para a síntese de PAR. A parilação resulta em proteínas nucleares altamente carregadas negativamente, que levam ao reparo do *DNA* danificado. Em contraste, nos casos de dano extenso ao *DNA*, PARP-1 torna-se superativado e esgota rapidamente  $\text{NAD}^+$  e ATP intracelulares, resultando em uma profunda perda de energia da célula. Com isso, a taxa de glicólise e respiração mitocondrial diminui, levando à disfunção celular, ou à morte celular, e estando envolvida na patogênese de várias doenças (SAS; SZABÓ; VÉCSEI, 2018).





**Figura 3 – Alterações no reparo do *DNA* em doenças progeróides com variação significativa da função de PARP-1.** (A) No HGPS, o acúmulo de progerina resulta na supressão de PARP-1, que tem como decorrência aberrações cromossômicas e morte celular. (B) Mutações em *BANF1* acarreta em uma atividade diminuída de formação de PAR e do reparo de dano ao *DNA*. (C) Agentes potencialmente causadores de mutação genômica, como radiações com luz UV, podem levar células de modelos CSA a aumentarem a parilação. Adaptado de: (CAMPOS et al., 2022).

A atividade de PARP-1 resulta na parilação de vários fatores de transcrição, como na modulação da atividade transcrional de C/EBP $\beta$ , na remodelação da cromatina, causando a modificação desta, e na regulação

da expressão gênica. Além disso, essa enzima também regula os processos de *splicing* e metilação do *DNA*, e está associado a processos de desenvolvimento e diferenciação celular, incluindo embriogênese, desenvolvimento de linhagem germinativa e diferenciação celular (JUBIN et al., 2017).

Em 2012, começou-se a estudar a ação dessa enzima no desenvolvimento do tecido adiposo visto que a formação de PAR por PARP-1 pode afetar a adipogênese por meio da: 1) exclusão ou retenção fatores de transcrição de um local especial da cromatina; 2) dissociação de correpressores que ocupam PPAR $\gamma$ 2 e seus promotores alvo durante a diferenciação de adipócitos, permitindo o recrutamento de coativadores transcripcionais; 3) regulando as enzimas modificadoras de histonas e subsequentemente alterando as modificações dessas proteínas (ERENER et al., 2012a). Tais processos são possíveis devido ao aumento da síntese de NAD<sup>+</sup>, que alimenta a síntese substancial de PAR e, portanto, permite uma renovação constante dessa polimerase durante a adipogênese. A ação de PARP-1 como um regulador positivo da adipogênese e da função dos adipócitos foi posteriormente relatada *in vivo*, de modo que camundongos PARP-1<sup>(-/-)</sup> expostos a uma dieta hipercalórica (DH) apresentaram alterações significativas no metabolismo e armazenamento lipídico, como acúmulo de gordura hepática e dislipidemia (ERENER et al., 2012b; LEHMANN et al., 2015).

Contraditoriamente, estudos posteriores observaram um efeito inibitório da PARP-1 na adipogênese (HUANG et al., 2020; LUO et al., 2017; RYU et al., 2018). Huang e colaboradores, em 2020, relataram que esse gene possui um papel definitivo na repressão da expansão de precursores de adipócitos, para limitar a adipogênese, corroborando a literatura que observa que a depleção ou inibição de PARP-1 por meio da limitação da disponibilidade de NAD<sup>+</sup> nuclear, ou a mutação de sítios específicos de (ADP-ribosil)ação nas principais proteínas substrato de PARP-1, libera essa repressão, permitindo que a adipogênese prosseguir. Além disso, a perda de *PARP-1* nos precursores de adipócitos teria consequências metabólicas

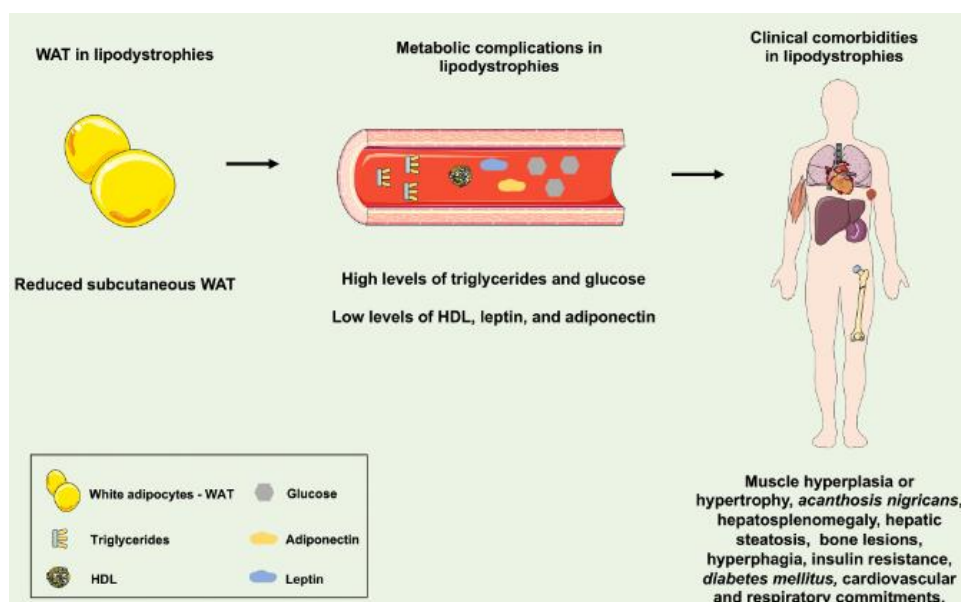
mais amplas para o animal, como aumento significativo no peso corporal e massa gorda quando colocado em uma dieta rica em gordura. Uma explicação plausível para essa divergência é que o modelo estudado e o tempo da atividade de PARP-1 podem ser críticos na interpretação dos resultados desses experimentos (HUANG et al., 2020; LUO et al., 2017).

Interessantemente, algumas das características fenotípicas observadas nos estudos supracitados são também percebidas em portadores da Lipodistrofia Generalizada Congênita (do inglês: *Congenital Generalized Lipodystrophy*, CGL). Nesses indivíduos, o quadro é agravado principalmente pela presença de uma DH causada pelo apetite voraz, especialmente em crianças, em razão dos menores níveis de produção de leptina. Assim, essa diminuição inibe insuficientemente os neurônios hipotalâmicos reguladores do apetite, que liberam peptídeos orexígenos, e estimula insuficientemente os neurônios que estimulam fatores anorexígenos (HAQUE et al., 2002; LIMA et al., 2016; MCDUFFIE et al., 2004; PARDINI et al., 1998; PATNI; GARG, 2015).

#### **1.4 – Lipodistrofias e a síndrome de Berardinelli-Seip (BSCL)**

As lipodistrofias são um conjunto de doenças heterogêneas raras caracterizadas por uma deficiência de tecido adiposo sem evidência de privação nutricional ou estado catabólico. Dentre elas, as CGLs, ou Lipodistrofia Congênita de Berardinelli-Seip (do inglês: *Berardinelli-Seip Congenital Lipodystrophy*, BSCL), têm sua importância devido à herança genética e à gravidade dos sintomas. Esse conjunto de síndromes podem ser classificadas em 4 tipos, variando de acordo com o gene e loci a conter a mutação patogênica: CGL tipo 1 (CGL1) está associado ao gene *AGPAT2*, que codifica 1-AGPAT 2; CGL tipo 2 (CGL2) ao gene *BSCL2*, que codifica Seipina; CGL tipo 3 ao gene *CAV1*, que codifica caveolina-1; e CGL tipo 4 ao gene *CAVIN1*, que codifica Cavin-1. As principais características presentes em portadores de CGLs incluem resistência à insulina, que pode levar à diabetes *mellitus*, hepatomegalia, esteatose hepática, esplenomegalia, hipoadiponectinemia, dislipidemia, *acanthosis nigricans*,

uma aparência musculosa generalizada e veias proeminentes (Figura 4) (ARAÚJO-VILAR; SANTINI, 2019; CRAVEIRO SARMENTO et al., 2019; GARG, 2004). As BSCLs foram descritas primeiramente por Waldemar Berardinelli (BERARDINELLI, 1954) e posteriormente por Martin Seip (SEIP, 1959), e possuem uma prevalência mundial estimada de cerca de 1 em 12 milhões de pessoas, além de apresentar um elevado índice de subnotificação (GARG, 2004). Entretanto, ao estudar a prevalência no estado do Rio Grande do Norte (RN), no Nordeste brasileiro, Medeiros e colaboradores revelaram a existência de uma alta prevalência da CGL no estado do RN, de 32 casos para cada 1 milhão de habitantes, cuja maioria possui uma mutação no gene *BSCL2* (BATISTA et al., 2017), um achado significativo que destaca a urgência em desenvolver esforços direcionados ao melhor conhecimento da patogênese da doença.



**Figura 4 – Comorbidades metabólicas resultantes da redução de sWAT nos casos de lipodistrofia congênita.** A redução de WAT causa um acúmulo sanguíneo de triacilgliceróis e glicose, além de menores níveis de HDL, Leptina e APN. Como consequência sinais como hiperplasia ou hipertrofia muscular, hepatoesplenomegalia, esteatose hepática, lesão óssea, hiperfagia, resistência à

insulina, diabetes mellitus, *acanthosis nigricans* e comprometimentos respiratórios e cardíacos são observados. Fonte: ARAÚJO DE MELO CAMPOS, J. T. et al. Endoplasmic reticulum stress and muscle dysfunction in congenital lipodystrophies. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 2021 (ARAÚJO DE MELO CAMPOS et al., 2021).

A mutação no gene *BSCL2*, associada à CGL2, codifica Seipina. Essa proteína tem papel na promoção da iniciação precoce da vesícula lipídica e na regulação da sua morfologia, além de ser um possível regulador da remodelação do citoesqueleto de actina mediada por cofilina-1, que é importante para o desenvolvimento e maturação de adipócitos (CARTWRIGHT et al., 2015; YANG; SUGII; HAN, 2014). Pessoas com essa síndrome possuem, além dos sintomas clássicos, cardiomiopatia, disfunção mitocondrial e problemas cognitivos, de forma que esse tipo de CGL foi postulada como o subtipo mais severo, tendo uma maior predisposição a uma morte prematura. A disfunção de Seipina está associada com uma perda mais significativa de adipócitos, afetando o tecido adiposo mecânico e o metabólico (CRAVEIRO SARMENTO et al., 2019; LIMA et al., 2016).

### **1.5 – Adiponectina**

É notório que hipoadiponectinemia é um dos sinais mais importantes da CGL, uma vez que os níveis de APN estão diminuídos em pacientes com todos os tipos de lipodistrofia em comparação aos controles, apesar da relação contrária existente entre a produção de APN e a quantidade de tecido adiposo em indivíduos controle. Ademais, o nível de APN é minimamente maior em CGL2 em comparação com CGL tipo 1 (ANTUNAPUENTE et al., 2010; FANTUZZI, 2008). Essa proteína é codificada pelo gene *ADIPOQ* presente no cromossomo 3q27, e possui aproximadamente 30 kDa (kilodaltons), composta por 244 aminoácidos. Sua expressão ocorre principalmente no tecido adiposo, embora haja outros órgãos capazes de expressá-la em níveis baixos, como a glândula adrenal, a vesícula biliar, glândulas salivares e o coração (NCBI, 2018). Dentre suas diversas funções, é responsável por aumentar a captação de glicose mediada pelo transportador de glicose 4 (do inglês: *Glucose Transporter Type 4*, GLUT4,

enquanto estimula adipogênese e o armazenamento de lipídios nos adipócitos. Sua expressão pode ser aumentada em resposta a diferentes fatores de transcrição, dentre eles o PPAR $\gamma$  (MELO, 2020). Os seus receptores são AdipoR1 e AdipoR2, sendo eles expresso mais abundantemente no músculo esquelético e no fígado, respectivamente. AdipoR1 é essencial para o seu efeito anti-inflamatório (HUANG et al., 2009; PETTO et al., 2015)

A APN possui propriedades de sensibilização à insulina, anti-aterogênicas e anti-inflamatórias, podendo ter um efeito modulador no estresse oxidativo em cardiomiócitos e no músculo esquelético (REN et al., 2017). Assim, pacientes CGL, por possuírem menores níveis desse hormônio, podem apresentar piores prognósticos de diabetes mellitus e cardiopatias, além de múltiplos fatores de risco para doença arterial coronariana (GOMES DE LIMA; CAMPOS, 2020; MATSUURA et al., 2007).

## **1.6 – Justificativas**

A alta prevalência de CGL no RN, particularmente de CGL2, a gravidade dos sintomas, já que essa síndrome causa morte prematura, reduzindo a expectativa de vida dos pacientes em 30 anos ou mais (LIMA et al., 2018), e a necessidade de se aprimorar os conhecimentos acerca da patogênese da doença em prol da construção de tratamentos mais eficazes torna essencial o estudo das vias enzimáticas e metabólicas afetadas. Com isso em mente, este trabalho teve como objetivo analisar o papel de PARP-1 na regulação dos níveis de APN, visto que essa adipocina possui funções de proteção cardíaca e metabólica. Assim, baixos níveis, como em indivíduos com lipodistrofia do tipo CGL, podem levar a um maior risco de doença aterosclerótica, a um estado metabólico e oxidativo prejudicado, e, portanto, a um pior prognóstico das pessoas afetadas.

## **2 – OBJETIVOS**

Para contribuir com tal finalidade, os objetivos específicos do trabalho são:

1. Analisar a expressão de PARP-1 em indivíduos CGL 1 e 2 em relação aos controles.
2. Avaliar a relação entre PARP-1 e APN em indivíduos com CGL.
3. Discutir a importância dos resultados encontrados para a patogênese desse grupo de síndromes.

### **3 – MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 – Recrutamento de Pacientes**

O presente projeto de pesquisa trata-se de um dos desdobramentos do projeto universal aprovado e intitulado como: “Avaliação das funções da via de reparo de *DNA* por excisão de bases em portadores da Síndrome de Berardinelli-Seip: Rara lipodistrofia prevalente no nordeste do Brasil” sob o número 42287315.9.0000.5568, proposto pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Julliane Tamara Araújo de Melo Campos por meio da instituição Faculdade de Ciências da Saúde do Trairi da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). Seu principal patrocinador é o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Os pacientes com CGL do RN atendidos no Ambulatório de Endocrinologia do Hospital Universitário Onofre Lopes (HUOL) foram convidados a participarem da pesquisa após todos os esclarecimentos e a assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Recrutamos 4 indivíduos CGL1, 16 indivíduos CGL2 e 29 controles. A descrição e estratificação genotípica e fenotípica das pessoas com CGL1 e CGL2 incluídas nessa análise foram anteriormente publicadas pelo nosso grupo de pesquisa (CRAVEIRO SARMENTO, 2016; MELO, 2020).

A análise da expressão de PARP-1 e a dosagem de APN para os

indivíduos contemplados no presente estudo foi anteriormente realizada pelo nosso grupo. A partir desses dados, a investigação da possível relação supracitada nessas pessoas foi possível.

### **3.2 – Coleta de Sangue e Processamento de Amostras**

Com um número amostral total de 20 pessoas com CGL tipos 1 ou 2 e 29 controles através de estudos anteriores do grupo, foi possível diferenciar geneticamente os diferentes grupos (CRAVEIRO SARMENTO, 2016; MELO, 2020). Para que isso ocorra, foram coletadas amostras de sangue periférico de cada participante. Previamente à coleta propriamente dita, foi realizado uma breve conversa com o participante da pesquisa, na qual foi explicado o destino do material coletado, os resultados obtidos de pesquisas anteriores do grupo. Em seguida, 5 mL do sangue periférico é coletado em tubos cônicos de 15mL contendo Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (do inglês *Ethylenediaminetetraacetic acid*, EDTA) 10%.

Para a etapa de processamento de amostras, a fração celular das amostras foi centrifugada a 1648 rcf por 10 minutos, para a separação de três frações, o plasma, o *pellet* de células nucleadas e as hemácias. Retirou-se o plasma, o qual foi armazenado a -80 °C em alíquotas para futuras análises, restando no tubo apenas as outras duas frações. Realizou-se a lise das hemácias utilizando 5 volumes de tampão de lise de hemácias 1X, seguido pela agitação vigorosa da amostra por 30 segundos, pela incubação em gelo por 15 minutos, com agitação a cada 5 minutos (MCCOY, JR., 1997), pela centrifugação a 1648 rcf, por 15 minutos a 4°C, e pelo descarte do sobrenadante. Restando apenas o precipitado de leucócitos, o processo é repetido por mais duas vezes.

### **3.3 – Extração de DNA, RNA e proteínas**

Essa etapa foi conduzida por nosso grupo de estudo, cujos resultados foram publicados anteriormente (CRAVEIRO SARMENTO, 2016; MELO, 2020). A extração dos ácidos nucleicos e proteínas dos

glóbulos brancos foi realizada com o *kit Illustra Triple Prep* (GE healthcare, Chicago, Illinois, EUA, #28942544), utilizando o protocolo do próprio kit (GE HEALTHCARE, 2009). Primeiramente, as frações restantes do processamento das amostras foram lavadas com Salina Tamponada com Fosfato (do inglês: *Phosphate Buffered Saline*, PBS) e centrifugadas, para que o sobrenadante pudesse ser removido. No mais, foi adicionado 5 volumes de tampão de lise de hemácias (NH<sub>4</sub>Cl 150mM; NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 10mM; EDTA, 1mM) e o precipitado foi ressuspendido, para que o homogeneizado pudesse ser transferido para a coluna correspondente ao filtro para *DNA* genômico para posterior centrifugação. Em seguida foram adicionadas à coluna tampão de lise, tampão de lavagem e tampão de eluição, para melhor purificação do *DNA*.

Para a extração do *RNA* (do inglês: *Ribonucleic acid*), a acetona absoluta foi adicionada e a mistura foi transferida para a coluna correspondente ao *RNA*, acoplada a um tubo coletor. Então, após uma centrifugação, a *DNase* foi adicionada no centro da coluna e incubada a temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida foi adicionado o tampão de lavagem e realizada mais uma centrifugação. Por último, foi adicionado o tampão de eluição e ocorre a última centrifugação antes da obtenção do *RNA* purificado, que corresponde ao que passou da coluna para o tubo de 1,5mL.

As proteínas foram extraídas utilizando-se o tampão de precipitação específico e misturando vigorosamente a solução. Em seguida, após uma incubação prévia de 10 minutos, ocorreu uma centrifugação e o sobrenadante foi removido para que então água destilada fosse adicionada. Outra centrifugação foi realizada e o sobrenadante foi novamente retirado. Por último, ureia foi adicionada à solução para a ressuspensão das proteínas.

### **3.4 – Quantificação de *DNA* e *RNA***

As quantificações foram realizadas por nosso grupo de estudos no aparelho NanoDrop™ One/OneC Microvolume UV-Vis Spectrophotometer, segundo as instruções do fabricante. Foram utilizados 2µL de Água MilliQ para o Branco do aparelho e 2µL da amostra a ser quantificada (CRAVEIRO SARMENTO, 2016; CRAVEIRO SARMENTO et al., 2020; INVITROGEN, 2010; MELO, 2020).

### 3.5 – Sequenciamento Capilar

O DNA obtido a partir da extração foi sequenciado para então confirmar os grupos amostrais da pesquisa. Essa fase foi realizada e publicada por nosso grupo de estudo (CRAVEIRO SARMENTO, 2016; MELO, 2020). Nesse sentido, a sequência genômica alvo foi amplificada por PCR convencional de acordo com o kit Platinum Supermix Kit (Thermofisher Scientific, #11306152). Em um tubo de PCR foram colocados PCR buffer 1x, dNTP's à 0,2mM, MgCl<sub>2</sub> à 1,5mM, iniciadores direto e inverso para cada respectivo genes estudados (Tabela 1), a 0,5 µM cada, e a Taq polimerase à concentração de 0,04 U/µl (ou 1 U/rxn\*), adicionados à uma quantidade de 400ng de DNA e um volume de H<sub>2</sub>O para que o volume final da reação fosse de 25µl. A reação aconteceu a 95 °C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 45 segundos, anelamento de 66,8° por 30 segundos, e extensão a 72 °C por 1 minuto e 30 segundos. Por fim, uma última etapa a 72 °C por 10 minutos foi realizada. Em seguida, os produtos dessa amplificação foram purificados com o kit Exosap-It™ PCR Product Cleanup Kit (Thermofisher Scientific, #78201) seguindo as recomendações do fabricante (APPLIED BIOSYSTEMS, 2017). Então, de acordo com a metodologia de sequenciamento de Sanger (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977), a presença de um didesoxinucleotídeo interrompe a polimerização em cada base complementar, gerando produtos com tamanhos crescentes. Para tal, foi utilizado o *BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit* ("BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit", 2016), de acordo com a instruções do fabricante. Os novos amplicons de tamanhos crescentes foram purificados usando o *BigDye Xterminator Purification Kit* ("BigDye XTerminator™ Purification Kit", 2007) e

adicionados no equipamento ABI 3500 para a eletroforese capilar (APPLIED BIOSYSTEMS, 2016a). Os resultados do sequenciamento foram demonstrados através de eletroferogramas. A partir desse método, puderam ser encontradas as mutações que classificaram os pacientes inclusos na pesquisa.

**Tabela 1** - Iniciadores utilizados no sequenciamento capilar.

Gene (Proteína Codificada)	Tipo de CGL	Iniciadores	Referência
<i>AGPAT2</i> (1- <i>AGPAT 2</i> )	CGL1	Direto: CCTACTGTGGGTGGGCTAAG Inverso: TGTCACACCCAAGACGCAA	(DE AZEVEDO MEDEIROS et al., 2017)
<i>BSCL2</i> (Seipina)	CGL2	Direto: TGGCAACATGATGGTTCCT Inverso: CCATTCTGATCCTGCCATCT	(MELO, 2020)

Fonte: autoria própria, com base nas referências citadas.

### 3.6 – Síntese de *cDNA* (RT-PCR)

Nas amostras de *RNA* devidamente quantificadas, nosso grupo realizou a transcrição reversa para *cDNA* usando a enzima transcriptase reversa do High Capacity *cDNA* Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems®), bem como as instruções do fabricante (APPLIED BIOSYSTEMS, 2016b; CRAVEIRO SARMENTO, 2016; MELO, 2020). Para tal, todos os *RNAs* devidamente quantificados tiveram suas concentrações normalizadas para até 0,1 µg/µL de reação. Então, foram misturados: tampão, dNTP, primers randômicos fornecidos pelo kit, a enzima transcriptase reversa, água sem nuclease e o *RNA* extraído. Após uma breve centrifugação, as amostras foram submetidas a uma reação RT-PCR

a 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos, 85°C por 5 minutos e, por último, 4°C. Completada a transcrição reversa, os microtubos foram armazenados a -20°C.

### 3.7 – PCR Quantitativa (qPCR)

O nosso grupo mensurou os níveis de expressão gênica dos mRNAs PARP-1 por meio de PCR quantitativa (qPCR). Os iniciadores escolhidos foram o Sense 5' GTGTGGGAAGACCAAAGGAA 3' e Antissense 5' TTCAAGAGCTCCCATGTTCA 3' (FRIZZELL et al., 2009). O gene endógeno normalizador (*housekeeping*) escolhido foi o Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase (do inglês: *Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase*, GAPDH). Num tubo de PCR do conjunto MicroAmp® Fast Optical 48-Well Reaction Plate (Applied Biosystems) foram colocados uma mistura de SYBR® Green PCR MasterMix (Applied Biosystems), iniciadores sense, antissense e água mili-Q autoclavada para cada amostra. Então, também foram colocados 5ng de cDNA em cada reação, totalizando um volume final de 10 µL/tubo. As amostras foram aplicadas em triplicata e as condições de amplificação no aparelho Applied Biosystems StepOne™ Real-time PCR System foram: desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos repetidos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento e extensão a 60°C por 1 minuto (APPLIED BIOSYSTEMS, 2011). Durante a qPCR, a AmpliTaq Gold® DNA Polymerase amplificou o fragmento-alvo, criando amplicons que são intercalados pelo SYBR® Green I Dye. O ciclo no qual o sinal fluorescente associado ao acúmulo de amplicons cruzou uma determinada linha conhecida como *threshold* é conhecido como de *Cycle Threshold (Ct)*. Ao final da reação, obteve-se o valor de *Ct* para PARP-1 em cada amostra. Os valores de *Ct* obtidos em cada reação foram normalizados com os valores de *Ct* do GAPDH, gerando o valor de  $\Delta Ct$ .

$$\Delta Ct = (Ct \text{ do gene de interesse}) - (Ct \text{ do GAPDH})$$

Obtendo-se os valores de  $\Delta Ct$ , três grupos de análise foram montados: controles (n = 29), portadores da CGL1 (n = 4) e portadores de CGL2 (n = 16). A distribuição dos  $\Delta Ct$ s dos três grupos foi colocada em diagramas de caixas para melhor visualização. Então, foi usada a metodologia de quantificação relativa média adaptada de Livak para comparar os grupos em relação à expressão gênica (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Para tal, foi usada a seguinte fórmula:

$$\Delta\Delta CT \text{ médio} = (\Delta Ct \text{ médio dos portadores}) - (\Delta Ct \text{ médio dos controles})$$

Então, esse resultado foi utilizado para calcular o *Fold Change* médio, valor que mostra quantas vezes uma amostra pode estar expressando um gene em relação a outra, por meio da fórmula:

$$\text{Fold Change médio} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

### 3.8 – Western Blot

As concentrações da proteína APN no plasma das pessoas do grupo ‘caso’, contendo pessoas com CGL2, foram comparadas com as do grupo ‘controle’. O protocolo apresentado a seguir está adaptado de acordo com o livro “Western Blotting: Principles and Methods” da empresa GE Healthcare, desempenhado pela nossa equipe de estudo (GE HEALTHCARE, 2014; MELO, 2020). Os dados da produção de APN no plasma de pessoas com CGL1 foi publicado anteriormente (MELO, 2020). O gel de corrida, que contém Acrilamida/Bisacrilamida 12,5%; *TRIS-HCl* (do inglês: Tris Hydrochloride) 375mM pH 8,8; *APS* (do inglês: Ammonium Persulfate) 0,05%; *SDS* (do inglês: Sodium Dodecyl Sulfate) 0,1%; e *TEMED* (do inglês: Tetramethylethylenediamine) 0.03325%, foi produzido no dia anterior à corrida, para a polimerização overnight. O gel de empilhamento (4% de acrilamida/bisacrilamida, 125mM de *TRIS-HCl* pH 6.8, *APS* 0.05%; *SDS* 0,1%; e *TEMED* 0.05%) foi feito no dia da corrida e

deixado para polimerização por 40 minutos.

As amostras foram misturadas (1:1 v/v) com o tampão de carregamento 2x (*TRIS-HCl* 125mM pH 6,8; *SDS* 4%; Glicerol 20%, Azul de Bromofenol 0.02%; e  $\beta$ -mercaptoetanol 5%) e submetidas a 95°C por 5 minutos. A corrida de eletroforese aconteceu por cerca de 90 minutos em tampão de corrida (*TRIS* 25mM; Glicina 192mM; *SDS* 0,1%, pH 8,3). Para evidenciação das bandas, FOI utilizado o marcador *Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards #1610375* (Bio-Rad®).

Após a corrida, as proteínas embebidas no gel foram transferidas para a Immuno-Blot *PVDF* (do inglês: Polyvinylidene Fluoride) Membrane (Bio-Rad®). Para isso, esse gel primeiramente repousa por 15 minutos no tampão de transferência (*TRIS* 25mM; Glicina 192mM; Etanol 20%, pH 8,3), enquanto a membrana é mergulhada por 60 segundos em Etanol. O processo de transferência dura 100 minutos para as proteínas maiores e 90 minutos para as proteínas menores. Após esse período, a membrana é mergulhada brevemente em tampão *TBS* pH 7.6 (*TRIS* base 20 mM; NaCl 150 mM). O bloqueio de sítios inespecíficos da membrana aconteceu em solução de bloqueio - 3% de Leite Desnatado, dissolvido em *TBS-Tween 20* pH 7,6 (*TRIS* base 20 mM; NaCl 150 mM; *Tween 20* 0,1%) por 1 hora à temperatura ambiente. Então, a membrana foi lavada brevemente em *TBS* para início das incubações com os anticorpos.

A membrana foi incubada com os anticorpos primários (diluídos em solução de bloqueio) overnight. No dia seguinte, elas foram lavadas 4x por 5 minutos à temperatura ambiente com *TBS-Tween 20*. A incubação com os anticorpos secundários (diluídos em solução de bloqueio) acontece por 1h. Então, a membrana foi lavada 4x por 10 minutos com *TBS-Tween 20*. Os anticorpos primários foram reutilizados por até 4x, enquanto que os secundários por até 2x (Tabela 2).

A imunodeteção da proteína  $\beta$ -Actina foi realizada para todas as

membranas de *western blotting* com o objetivo de normalizar a quantidade de proteínas carregadas no gel. A imunodeteção de Adiponectina também é feita em todas as membranas. A revelação ocorre no aparelho ChemiDoc™ Gel Imaging System (bio-rad, Hercules, Califórnia, EUA). Dessa forma, enquanto as proteínas intracelulares foram previamente quantificadas e suas concentrações normalizadas para a aplicação no gel, as proteínas plasmáticas foram normalizadas pelo mesmo volume aplicado, diluído 1:60 (v:v) em tampão de carregamento 2X, uma vez que o plasma não sofreu nenhum processo de extração ou modificação da quantidade total de proteínas. Para as proteínas intracelulares, as quantificações relativas foram obtidas segundo a razão: (densitometria da proteína alvo) / (densitometria da anti- $\beta$ -actina).

**Tabela 1:** Anticorpos utilizados para western blotting.

	Anticorpos Primários		Anticorpo Secundário
Anticorpo	Anti- $\beta$ -Actina (sc-47778)	Anti-Adiponectina (ab22554)	Anti-Rato IgG-HRP (sc-2031)
Origem	Rato	Rato	Cabra
Empresa	Abcam	Santa Cruz Biotechnology	Santa Cruz Biotechnology
Concentração	1:1000	1:1000	
Reatividade	-	-	Rato

### 3.9 – Testes Estatísticos

As comparações deste estudo foram feitas em três grupos, sendo cada um composto por indivíduos: a) portadores de CGL1 (n=4), b) portadores de CGL2 (n=16), e c) controles (n=29). Tal comparação é

realizada a fim de dar continuidade aos estudos do laboratório acerca das doenças genéticas que afetam o tecido adiposo, de forma a melhor compreender a relação entre diferentes genes e as alterações moleculares e morfofuncionais similares destas doenças. Os resultados obtidos foram então confrontados no Shapiro-Wilk Test para observação da distribuição dos dados. Como a distribuição encontrada nos resultados obtidos não foi normal, foi utilizado o teste estatístico não paramétrico de *Mann-Whitney (U)* para comparar as distribuições dos dois grupos não pareados e amostras independentes em um nível de significância de 0,05. Foi analisada a expressão de mRNA de *PARP-1* em células sanguíneas e a produção de APN no plasma, que foram contrapostas nos indivíduos com CGL2.

### **3.10 – Análise de Bioinformática**

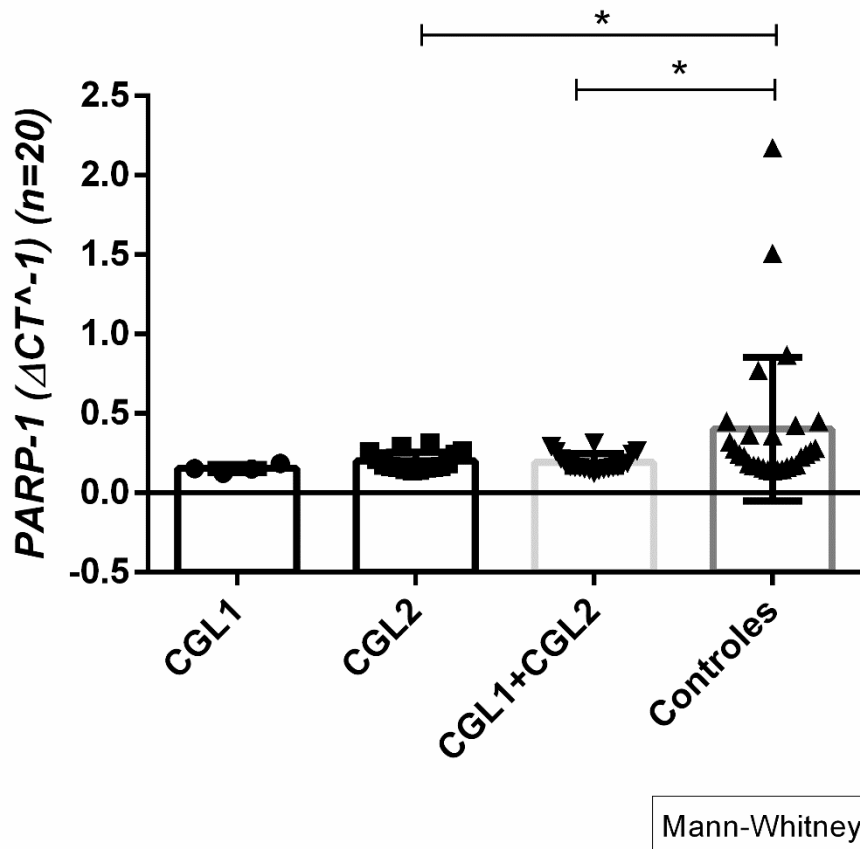
Para evidenciar melhor a interação entre as vias relacionadas com o reparo de DNA, como PARP-1, e os modelos celulares das lipodistrofias associadas a essas alterações, realizamos algumas análises de biologia de sistemas, que foram previamente publicadas pelo nosso grupo de pesquisa (CAMPOS et al., 2022). A rede completa publicada contém 49 proteínas e foi inicialmente construída usando STRING, que coleta e integra interações físicas (diretas) e funcionais (indiretas). Posteriormente, a rede foi analisada usando o Cytoscape, que identificou os parâmetros de centralidade, determinando os nós da rede que são experimental e topologicamente relevantes.

## **4 – RESULTADOS**

### **4.1 – Indivíduos CGL2 possuem uma expressão diminuída de PARP-1**

A análise de expressão de PARP-1 por meio de RT-PCR e qPCR revelou que os indivíduos CGL1 e CGL2 possuem menores níveis de expressão desse gene em comparação com leucócitos totais de indivíduos controle. Uma diminuição significativa dessa expressão é vista nos

indivíduos CGL2 em comparação aos indivíduos controles ( $p < 0,05$ ). Tais resultados são vistos na Figura 5 e representam um estado no qual a adipogênese está gravemente prejudicada.

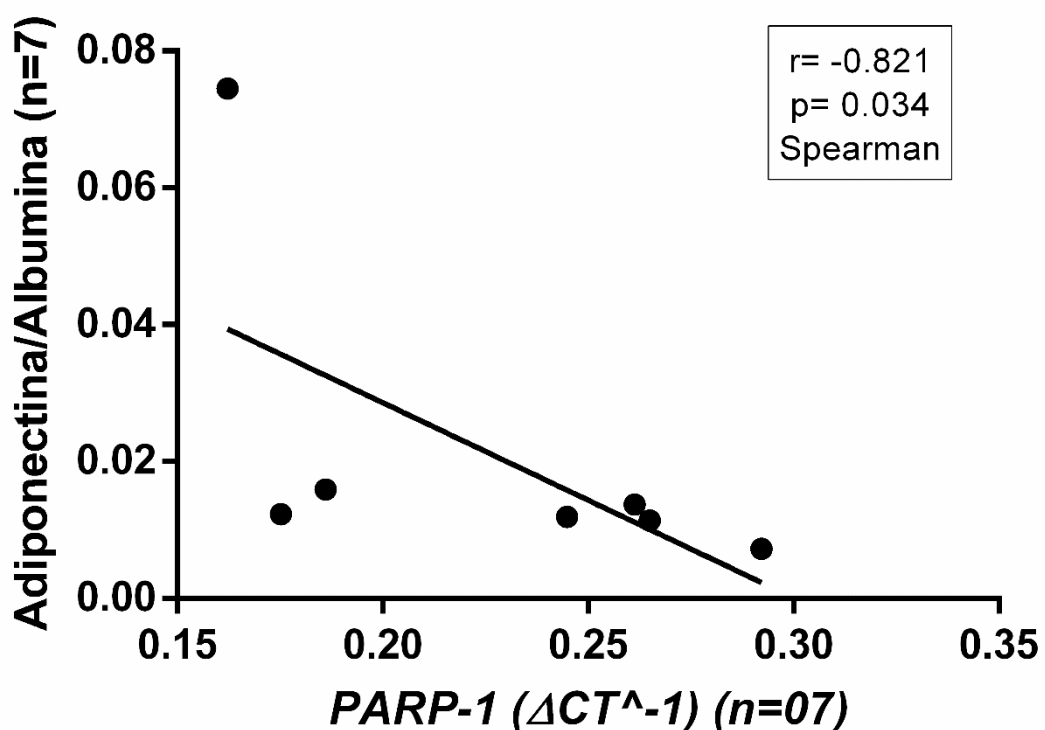


**Figura 5 - Expressão de PARP-1 em leucócitos de sangue periférico.** Para avaliação da expressão gênica de PARP-1, foi realizada uma RT-PCR seguida de qPCR para a obtenção dos valores replicados de Ct. O procedimento foi feito para a análise de expressão gênica de 29 controles, 4 portadores de CGL 1 e 16 portadores de CGL2. Os valores de Ct foram normalizados com o do gene GAPDH, gerando o  $\Delta Ct$ . O teste de Mann-Whitney foi escolhido para comparar a distribuição dos dois grupos, com um nível de significância de 0,05. Os resultados apontam evidências de que a distribuição dos  $\Delta Ct$ s dos portadores de CGL2 é diferente da dos controles ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2 – Relação negativa entre expressão de PARP-1 e produção de APN em indivíduos CGL2

A Figura 6 evidencia que mesmo em uma expressão significativamente diminuída de *PARP-1*, os níveis de mRNA ainda presente em indivíduos CGL2 correlacionam-se negativamente com os níveis de

APN observados por *Western Blot* a partir do plasma ( $p= 0,034$ ). Foram incluídas nessa análise as amostras de pessoas com CGL2 cujas quantificações de APN no plasma foram realizadas ( $n = 7$ ). A albumina foi utilizada como proteína padrão já que, assim como a APN, trata-se de uma proteína plasmática. Desse modo, dentre os indivíduos estudados, os que possuem menores expressões de PARP-1 se encontram com níveis comparativamente maiores de APN.

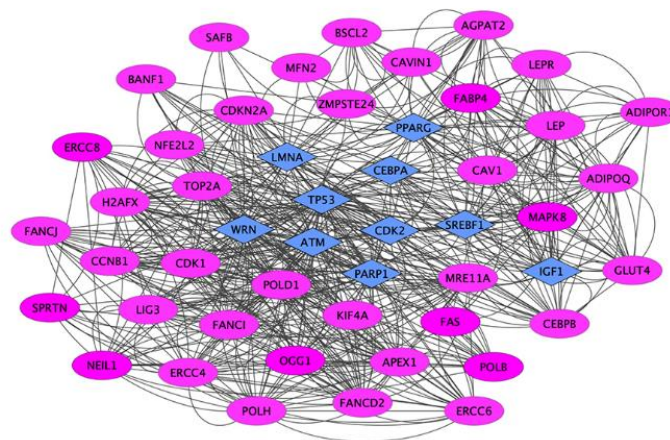


**Figura 6 - Correlação da expressão de PARP-1 e de APN em indivíduos CGL2.** Para a averiguação da relação entre a expressão de PARP-1 e a produção de APN em indivíduo com CGL2, foram comparados os valores de  $\Delta Ct$  da quantificação do mRNA de PARP-1 com a quantificação de APN/Albumina. O teste de Spearman foi escolhido para confrontar os dois resultados, apontando evidências de que há uma relação negativa significativa ( $p= 0,034$ ). Assim, nas pessoas com CGL2, quanto maior a expressão de PARP-1, é possível que menor seja a produção de APN.

#### 4.3 – Análise de interactoma entre genes de reparo e de adipogênese

A partir da análise de bioinformática publicada pelo nosso grupo em um artigo de revisão, as interações proteína-proteína (IPP) da rede revelaram 676 interações entre reparo de DNA e proteínas lipodistróficas (CAMPOS et al., 2022). A análise do CentiScaPe mostrou que os nós mais dinâmicos da rede, referidos como *hub-bottlenecks* (em azul), incluem *PARP1* e *PPARG*. É importante ressaltar que os nós *hub-bottlenecks* são genes centrais para todas as interações analisadas. Logo, os interactomas mostrados na Figuras 7 revelam uma conexão vigorosa entre o reparo do DNA e os genes relacionados ao tecido adiposo.

A) Network: DNA repair and adipose tissue-related genes (49 genes)



**Figura 7- Redes compreendendo os genes relacionados ao reparo do DNA e à lipodistrofia revisados no artigo publicado pelo grupo.** A rede PPI de 49 genes mostrou alta conectividade (676 interações) entre os genes envolvidos com o reparo do DNA e o tecido adiposo. Os parâmetros STRING para o Homo sapiens foram: Experimentos; Base de dados; Vizinhança; e *Textmining*. A pontuação de interação mínima exigida foi: confiança média (0,400). Dez gargalos de hub (em azul) foram representados pelo plug-in CentiScaPe CytoScape: LMNA, WRN, TP53, ATM, PARP1, PPARG, CEBPA, CDK2, SREBF1 e IGF1. Adaptado de: (CAMPOS et al., 2022).

## 5 – DISCUSSÃO

As CGLs, em especial a CGL2, por possuírem alta prevalência no

RN, herança genética e sintomas graves, são síndromes de alta importância (ARAÚJO-VILAR; SANTINI, 2019; BATISTA et al., 2017; CRAVEIRO SARMENTO et al., 2019; GARG, 2004). Entretanto, sua patogênese ainda não foi completamente elucidada. O presente trabalho investigou a relação entre o regulador adipogênico PARP-1 e a APN, uma adipocina essencial para a homeostase metabólica. Acreditamos que essa associação possa ser um elemento interessante para a compreensão da patologia desse grupo de síndromes.

Alguns estudos da relação da deleção ou inibição de PARP-1 com metabolismo e estresse oxidativo publicaram que a inibição de PARP-1 por INO1001 promoveu perda de peso, atenuou a fibrose cardíaca e hipertensão, e preveniu o estresse oxidativo em camundongos diabéticos (WALDMAN et al., 2018). Outros estudos observaram que a deficiência de PARP-1 em camundongos resultou em um grande aumento do conteúdo mitocondrial e um perfil oxidativo melhorado em suas fibras musculares e no BAT, possivelmente por meio da reprogramação celular (BAI et al., 2011; CHUNG; JOE, 2014; LUO; KRAUS, 2011; PIRINEN et al., 2014). Ademais, essa deleção protege os camundongos contra a resistência à insulina induzida pela DH, o ganho de peso, e o acúmulo de gordura, triglicerídeos séricos e ácidos graxos livres (do inglês: *Free Fatty Acids*, FFA), além de proporcionar maior gasto de energia, tolerância à glicose, oxidação de glicose, temperatura corporal mais alta após a exposição ao frio e proteção contra obesidade induzida por dieta (BAI et al., 2011; LUO; KRAUS, 2011; PIRINEN et al., 2014).

Já na adipogênese, o papel regulatório de PARP-1, especialmente em fatores de transcrição PPAR $\gamma$  e C/EBP $\beta$ , e em enzimas modificadoras de histonas é essencial (ERENER et al., 2012a). Assim, estudos *in vivo*, nos quais a deleção de PARP-1 causou aumento do acúmulo de gordura hepática e dislipidemia em camundongos expostos a uma DH, observaram níveis séricos elevados de colesterol, tamanho de adipócitos menor, diferenciação de adipócitos prejudicada e uma atenuação do estado inflamatório. Além disso, a expressão de PPAR $\gamma$ 2, aP2 e GLUT4

permaneceu em níveis significativamente mais baixos em células estromais derivadas do tecido adiposo obtidas do modelo de camundongos *PARP-1*<sup>-/-</sup> ao longo da adipogênese (ERENER et al., 2012b; LEHMANN et al., 2015).

Por *PARP-1* desempenhar um importante papel na regulação da diferenciação de pré-adipócitos comprometidos em adipócitos maduros, pode-se haver uma relação de inibição em determinados contextos. Assim, paradoxalmente, estudos recentes indicam um papel inibitório de *PARP-1* na adipogênese, de forma que níveis menores de *PARP-1* indicam uma liberação da adipogênese (HUANG et al., 2020; LUO et al., 2017; RYU et al., 2018). Segundo Margulies et al., os resultados supracitados demonstram que *PARP-1* reprime a expansão de precursores adipogênicos para limitar a síntese de gordura, mas pode ativar um interruptor nessa síntese sob dietas com alto teor de açúcar e gordura (MARGULIES; LADURNER, 2020).

O presente estudo focou na análise de *mRNA* do gene *PARP-1* em células leucocitárias de indivíduos com uma perda generalizada de tecido adiposo, os quais têm um prejuízo genético e hereditário da adipogênese, principalmente pelas mutações no gene *BSCL2*, que codifica a Seipina. Análises realizadas pelo nosso grupo de pesquisa identificaram uma diminuição média de 65% na expressão de *PARP-1* nas células do sangue periférico dos portadores da CGL2 em relação aos controles. Ao comparar esses dados com a expressão de *PARP-1* em pessoas com CGL1 e controles, por meio de RT q-PCR, é confirmada uma expressão significativamente menor desse *mRNA* em indivíduos CGL2 em comparação com o grupo controle. À vista disso, o resultado obtido corrobora a literatura, visto que o gene *PARP-1* está associado à adipogênese, a qual está gravemente prejudicada nos indivíduos CGL2 (CRAVEIRO SARMENTO, 2016; ERENER et al., 2012a, 2012b; LEHMANN et al., 2015; LUO et al., 2017).

Ainda, os níveis de *mRNA* de *PARP-1* em leucócitos correlacionam-

se negativamente com os níveis de APN no plasma de pessoas com CGL2 ( $p= 0,034$ ). Mesmo dosando APN circulante, os resultados obtidos reproduzem um mesmo padrão de resposta da cultura celular realizada por Huang e colaboradores, em 2009, que, em cultura de fibroblastos cardíacos obtidos de modelos murinos, estipula PARP-1 como um importante repressor transcricional de APN e de seu receptor AdipoR1, por meio da poli(ADP-ribosil)ação de PPAR $\gamma$  (HUANG et al., 2009). Assim, pode-se inferir a possibilidade de PARP-1 estar relacionada com a patogênese da doença, visto a APN ser de grande significância para o prognóstico dos indivíduos afetados. Um exemplo desse processo é que essa adipocina pode acelerar o transporte reverso de colesterol por meio do aumento da montagem de HDL no fígado mediante o estímulo da via de Transportadores de Cassetes de Ligação de ATP (do inglês: ATP-binding cassette transporters, ABCA1) e da síntese de apoA-I. Nesse caso, caso a produção de APN esteja inibida por PARP-1 em pessoas com CGL2, essa via pode estar prejudicada, podendo, portanto, agregar ao quadro de dislipidemia desses indivíduos (MATSUURA et al., 2007; MELO, 2020).

Notadamente, a análise bioinformática mostrada na Figuras 7 reforça a importante conexão entre o reparo do DNA e genes relacionados ao tecido adiposo abordada no presente trabalho. Portanto, as lipodistrofias podem ser um modelo útil para estudar os mecanismos que ligam a instabilidade do genoma e a desregulação metabólica, como as vias de regulação centrais representadas por PARP-1 e PPAR $\gamma$  (CAMPOS et al., 2022). Entretanto, para confirmar se a mesma via estudada por Huang e colaboradores, em 2009, se replica nos modelos utilizados, faz-se necessário um estudo da parilação de PPAR $\gamma$  e da expressão dos receptores de APN, além de uma análise enzimática da funcionalidade das enzimas envolvidas nessa via.

Ademais, uma vez que o principal tratamento medicamentoso atual direcionado para pessoas com CGL é o uso de um análogo recombinante da leptina humana, a metreleptina, que aumenta a saciedade e diminui os níveis de glicose, colesterol e TGs no sangue, além de diminuir o volume

hepático e a mortalidade, a busca por tratamentos mais eficazes e específicos é essencial (CHEVALIER et al., 2021; COOK et al., 2021; MEEHAN et al., 2016). Estudos sobre o potencial uso de inibidores de PARP-1 podem ser feitos. Estes fármacos, como o Paribs, poderiam aumentar o metabolismo oxidativo e o conteúdo mitocondrial, além de aumentar os níveis de APN e, conseqüentemente, ajudar na recuperação do estado metabólico e oxidativo de pessoas com CGL caso esses indivíduos possuíssem uma quantidade suficiente de WAT, principal responsável pela produção de APN (BAI; CANTÓ, 2012; LEHMANN et al., 2015; PIRINEN et al., 2014; XIA et al., 2018). Porém, para este fim, são necessários mais estudos, em especial, utilizando o modelo de CGL. Portanto, existem outros métodos terapêuticos a se considerar. Um deles é o transplante de tecido adiposo, que pode repor a produção de APN e melhorar os níveis de glicose no sangue e insulina plasmática (SAKATA et al., 2021; TRAN; KAHN, 2010).

## **6 – CONCLUSÃO**

Nossos resultados ainda não permitem concluir se proteína PARP-1 está envolvida com a patogenia da CGL, mas sua baixa expressão em um tipo celular não adipocitário pode sugerir que ela seja uma proteína pouco expressa constitutivamente nesses portadores. Além disso, PARP-1 pode ser um regulador da expressão de APN em pacientes portadores CGL2. Tal resultado é condizente com a literatura e, diferentemente dos estudos realizados até então, utiliza um modelo humano para o estudo da função de PARP-1 na homeostase metabólica e oxidativa. Ademais, o presente estudo propõe uma associação entre a PARP-1 e APN em um modelo com a adipogênese prejudicada, processo no qual PARP-1 é um importante regulador. Mais estudos são necessários para entender melhor o papel da expressão e atividade de PARP-1 na modulação das funções de APN no contexto de uma perda generalizada congênita de WAT.

A importância desse trabalho está em abrir novas possibilidades no entendimento tanto da patogênese da CGL, como das suas características

clínicas. Essa investigação incentiva ensaios que pesquisem polimorfismos no gene de PARP-1 e a participação de importantes fatores de transcrição, como PPAR $\gamma$  ou C/EBP, nessa possível via regulatória. Além disso, a comprovação de novas vias enzimáticas e metabólicas que possam estar envolvidas com esse grupo de síndromes abre espaços para o desenvolvimento futuro de novos tratamentos que ajudem na melhoria da qualidade de vida das pessoas acometidas com a CGL.

## 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTUNA-PUENTE, B. et al. Higher adiponectin levels in patients with berardinelli-seip congenital lipodystrophy due to seipin as compared with 1-acylglycerol-3-phosphate-O-acyltransferase-2 deficiency. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 95, n. 3, 2010.

APPLIED BIOSYSTEMS. **SYBR Green PCR Master Mix and SYBR Green RT-PCR Reagents Kit User Guide.**

APPLIED BIOSYSTEMS. **BigDye<sup>TM</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit -User Guide.**

APPLIED BIOSYSTEMS. **High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits Protocol.**

APPLIED BIOSYSTEMS. **ExoSAP-IT<sup>TM</sup>PCR Product Cleanup.**

ARAÚJO DE MELO CAMPOS, J. T. et al. **Endoplasmic reticulum stress and muscle dysfunction in congenital lipodystrophies. Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, 2021.

ARAÚJO-VILAR, D.; SANTINI, F. Diagnosis and treatment of lipodystrophy: a step-by-step approach. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 42, n. 1, p. 61–73, 1 jan. 2019.

BAI, P. et al. PARP-1 inhibition increases mitochondrial metabolism through SIRT1 activation. **Cell Metabolism**, v. 13, n. 4, p. 461–468, 6 abr. 2011.

BAI, P.; CANTÓ, C. The role of PARP-1 and PARP-2 enzymes in metabolic regulation and disease. **Cell metabolism**, v. 16, n. 3, p. 290–295, 5 set. 2012.

BATISTA, L. et al. High prevalence of Berardinelli-Seip Congenital Lipodystrophy in Rio Grande do Norte State, Northeast Brazil. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 9, p. 80, 2017.

BERARDINELLI, W. An undiagnosed endocrinometabolic syndrome: report of 2 cases. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 14, n. 2, 1954.

CAMPOS, J. T. A. DE M. et al. DNA repair-related genes and adipogenesis: Lessons from congenital lipodystrophies. **Genetics and Molecular Biology**, v. 45, n. 3 suppl 1, 2022.

CARDOSO DE MELO, M. E. et al. AGPAT2. **Genética na Escola**, v. 15, n. 1, p. 72–79, 9 maio 2020.

CARTWRIGHT, B. R. et al. Seipin performs dissectible functions in promoting lipid droplet biogenesis and regulating droplet morphology. **Molecular Biology of the Cell**, v. 26, n. 4, 2015.

CHAMBON, P. et al. On the formation of a novel adenylic compound by enzymatic extracts of liver nuclei. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 25, n. 6, 1966.

CHEVALIER, B. et al. **Metreleptin treatment of non-HIV lipodystrophy syndromes. Presse Medicale**, 2021.

CHUNG, H. T.; JOE, Y. Antagonistic crosstalk between SIRT1, PARP-1, and -2 in the regulation of chronic inflammation associated with aging and metabolic diseases. **Integrative Medicine Research**, v. 3, n. 4, p. 198–203, dez. 2014.

COOK, K. et al. Effect of Leptin Therapy on Survival in Generalized and Partial Lipodystrophy: A Matched Cohort Analysis. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 106, n. 8, 2021.

CRAVEIRO SARMENTO, A. S. **Perfil de Expressão dos Genes APEX1, OGG1 e PARP1 em Células do Sangue Periférico de Pessoas com a Síndrome de Berardinelli-Seip do Nordeste do Brasil**. TCC (Graduação) —Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2016.

CRAVEIRO SARMENTO, A. S. et al. The worldwide mutational landscape of Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 781, p. 30–52, 1 jul. 2019.

CRAVEIRO SARMENTO, A. S. et al. Changes in redox and endoplasmic reticulum homeostasis are related to congenital generalized lipodystrophy type 2. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1865, n. 4, 2020.

DE AZEVEDO MEDEIROS, L. B. et al. High prevalence of Berardinelli-Seip Congenital Lipodystrophy in Rio Grande do Norte State, Northeast Brazil. **Diabetology & metabolic syndrome**, v. 9, n. 1, 13 out. 2017.

DE PAUW, A. et al. **Mitochondrial (dys)function in adipocyte (de)differentiation and systemic metabolic alterations**. *American Journal of Pathology*, 2009.

ERENER, S. et al. Poly(ADP-ribose)polymerase-1 (PARP1) controls adipogenic gene expression and adipocyte function. *Molecular Endocrinology*, v. 26, n. 1, 2012a.

ERENER, S. et al. ARTD1 deletion causes increased hepatic lipid accumulation in mice fed a high-fat diet and impairs adipocyte function and differentiation. *The FASEB Journal*, v. 26, n. 6, 2012b.

FANTUZZI, G. Adiponectin and inflammation: Consensus and controversy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 121, n. 2, p. 326–330, fev. 2008.

FRIZZELL, K. M. et al. Global analysis of transcriptional regulation by poly(ADP-ribose) polymerase-1 and poly(ADP-ribose) glycohydrolase in MCF-7 human breast cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, v. 284, n. 49, 2009.

FUJIMURA, S. et al. Polymerization of the adenosine 5'-diphosphate-ribose moiety of nicotinamide-adenine dinucleotide by nuclear enzyme. I. Enzymatic reactions. *BBA Section Nucleic Acids And Protein Synthesis*, v. 145, n. 2, 1967.

GARG, A. Acquired and Inherited Lipodystrophies. *New England Journal of Medicine*, v. 350, n. 12, 2004.

GE HEALTHCARE. *Illustra TriplePrep Kit*.

GE HEALTHCARE. *Western Blotting: Principles and Methods*.

GOMES DE LIMA, J.; CAMPOS, J. T. A. DE M. **Síndrome de Berardinelli-Seip: aspectos genéticos e morfofisiológicos**. Natal: EDUFRRN, 2020.

HAQUE, W. A. et al. Serum Adiponectin and Leptin Levels in Patients with Lipodystrophies. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 85, n. 5, p. 2395–2398, 2002.

HAYAISHI, O.; UEDA, K. **Poly(ADP-ribose) and ADP-ribosylation of proteins**. *Annual review of biochemistry*, 1977.

HUANG, D. et al. PARP-1 suppresses adiponectin expression through poly(ADP-ribosyl)ation of PPAR gamma in cardiac fibroblasts. *Cardiovascular research*, v. 81, n. 1, p. 98–107, 2009.

HUANG, D. et al. Functional Interplay between Histone H2B ADP-Ribosylation and Phosphorylation Controls Adipogenesis. *Molecular Cell*, v. 79, n. 6, p. 934- 949.e14, 17 set. 2020.

INVITROGEN. *Qubit™ Assay Kit*.

JUBIN, T. et al. **Poly ADP-ribose polymerase-1: Beyond transcription and towards differentiation. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 2017.**

KUROSAKI, T. et al. Primary structure of human poly(ADP-ribose) synthetase as deduced from cDNA sequence. ***Journal of Biological Chemistry***, v. 262, n. 33, p. 15990–15997, 1987.

LEHMANN, M. et al. ARTD1-induced poly-ADP-ribose formation enhances PPAR $\gamma$  ligand binding and co-factor exchange. ***Nucleic acids research***, v. 43, n. 1, p. 129–142, 1 set. 2015.

LIMA, J. G. et al. Clinical and laboratory data of a large series of patients with congenital generalized lipodystrophy. ***Diabetology & Metabolic Syndrome***, v. 8, p. 23, 2016.

LIMA, J. G. et al. Causes of death in patients with Berardinelli-Seip congenital generalized lipodystrophy. ***PLoS ONE***, v. 13, n. 6, 2018.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. ***Methods***, v. 25, n. 4, 2001.

LONGO, M. et al. Adipose Tissue Dysfunction as Determinant of Obesity-Associated Metabolic Complications. ***International Journal of Molecular Sciences***, v. 20, n. 9, p. 2358, 13 maio 2019.

LUO, X. et al. PARP-1 Controls the Adipogenic Transcriptional Program by PARylating C/EBP $\beta$  and Modulating Its Transcriptional Activity. ***Molecular Cell***, v. 65, n. 2, p. 260–271, 19 jan. 2017.

LUO, X.; KRAUS, W. L. **A one and a two ... expanding roles for poly(ADP-ribose) polymerases in metabolism. *Cell Metabolism*, 2011.**

MARGULIES, C. E.; LADURNER, A. G. PARP-1 Flips the Epigenetic Switch on Obesity. ***Molecular Cell***, v. 79, n. 6, p. 874–875, 17 set. 2020.

MATSUURA, F. et al. Adiponectin accelerates reverse cholesterol transport by increasing high density lipoprotein assembly in the liver. ***Biochemical and Biophysical Research Communications***, v. 358, n. 4, 2007.

MCCOY, JR., J. P. Handling, Storage, and Preparation of Human Blood Cells. ***Current Protocols in Cytometry***, v. 00, n. 1, 1997.

MCDUFFIE, J. R. et al. Effects of exogenous leptin on satiety and satiation in patients with lipodystrophy and leptin insufficiency. ***Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism***, v. 89, n. 9, 2004.

MEEHAN, C. A. et al. **Metreleptin for injection to treat the complications of leptin deficiency in patients with congenital or acquired generalized lipodystrophy. Expert Review of Clinical Pharmacology**, 2016.

MELO, M. E. C. DE. **Caracterização dos Níveis de Adiponectina e dos Perfis Genético e Metabólico de Pessoas com Lipodistrofia Generalizada Congênita do Tipo 1**. TCC (Graduação) —Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2020.

NCBI. **ADIPOQ adiponectin, C1Q and collagen domain containing [ Homo sapiens (human) ]**.

NISHIZUKA, Y. et al. Studies on the polymer of adenosine diphosphate ribose. I. Enzymic formation from nicotinamide adenine dinucleotide in mammalian nuclei. **Journal of Biological Chemistry**, v. 242, n. 13, 1967.

OKAYAMA, H. et al. Purification and properties of poly(adenosine diphosphate ribose) synthetase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 252, n. 20, p. 7000–7005, out. 1977.

PARDINI, V. C. et al. Leptin levels,  $\beta$ -cell function, and insulin sensitivity in families with congenital and acquired generalized lipodystrophic diabetes. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 83, n. 2, 1998.

PATNI, N.; GARG, A. **Congenital generalized lipodystrophies - New insights into metabolic dysfunction. Nature Reviews Endocrinology**, 2015.

PETTO, J. et al. Adiponectina: Caracterização, Ação Metabólica e Cardiovascular Adiponectin: Characterization, Metabolic and Cardiovascular Action. **Internacional Journal of Cardiovascular Sciences**, v. 28, n. 5, 2015.

PIRINEN, E. et al. Pharmacological inhibition of poly(ADP-ribose) polymerases improves fitness and mitochondrial function in skeletal muscle. **Cell Metabolism**, v. 19, n. 6, p. 1034–1041, 3 jun. 2014.

PRINS, J. B.; O'RAHILLY, S. **Regulation of adipose cell number in man. Clinical Science**, 1997.

PURNELL, M. R.; WHISH, W. J. Novel inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase. **The Biochemical journal**, v. 185, n. 3, 1980.

REN, Y. et al. Adiponectin modulates oxidative stress-induced mitophagy and protects C2C12 myoblasts against apoptosis. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017.

ROSEN, E. D.; SPIEGELMAN, B. M. **Molecular regulation of adipogenesis. Annual Review of Cell and Developmental Biology**, 2000.

ROSEN, E. D.; SPIEGELMAN, B. M. **What we talk about when we talk about fat.** *Cell*, 2014.

RYU, K. W. et al. Metabolic regulation of transcription through compartmentalized NAD<sup>+</sup> biosynthesis. *Science*, v. 360, n. 6389, 2018.

SAKATA, N. et al. Fat-Covered Islet Transplantation using Epididymal White Adipose Tissue. *Journal of visualized experiments : JoVE*, v. 2021, n. 171, 1 maio 2021.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 74, n. 12, 1977.

SARJEANT, K.; STEPHENS, J. M. Adipogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 4, n. 9, set. 2012.

SAS, K.; SZABÓ, E.; VÉCSEI, L. **Mitochondria, oxidative stress and the kynurenine system, with a focus on ageing and neuroprotection.** *Molecules*, 2018.

SEIP, M. Lipodystrophy and gigantism with associated endocrine manifestations. A new diencephalic syndrome? *Acta paediatrica*, v. 48, 1959.

TRAN, T. T.; KAHN, C. R. **Transplantation of adipose tissue and stem cells: Role in metabolism and disease.** *Nature Reviews Endocrinology*, 2010.

WALDMAN, M. et al. PARP-1 inhibition protects the diabetic heart through activation of SIRT1-PGC-1 $\alpha$  axis. *Experimental Cell Research*, v. 373, n. 1–2, 2018.

WANG, Y.; LUO, W.; WANG, Y. **PARP-1 and its associated nucleases in DNA damage response.** *DNA Repair*, 2019.

XIA, Q. et al. PARP-1 inhibition rescues short lifespan in hyperglycemic *C. elegans* and improves GLP-1 secretion in human cells. *Aging and Disease*, v. 9, n. 1, p. 17–30, 1 fev. 2018.

XUE, B. et al. Transcriptional Synergy and the Regulation of Ucp1 during Brown Adipocyte Induction in White Fat Depots . *Molecular and Cellular Biology*, v. 25, n. 18, p. 8311–8322, 15 set. 2005.

YANG, K.; SUGII, W.; HAN, S. Towards a mechanistic understanding of lipodystrophy and seipin functions. *Biosci. Rep*, v. 34, n. 5, p. 141, 2014.

ZWICK, R. K. et al. **Anatomical, Physiological, and Functional Diversity of Adipose Tissue.** *Cell Metabolism*, 2018.

## 8 – ANEXO I – Artigo publicado

Young Brazilian Geneticists - Special Issue - Genet. Mol. Biol. 45 (3 Suppl 1) - 2022 - <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2022-0088> [COPY](#)

## DNA repair-related genes and adipogenesis: Lessons from congenital lipodystrophies

Julliane Tamara Araújo de Melo Campos   Matheus Sena de Oliveira   Luisa Pessoa Soares  
 Katarina Azevedo de Medeiros   Leonardo René dos Santos Campos   Josivan Gomes Lima   [ABOUT THE AUTHORS](#)

## » Abstract

## » Text

Introduction  
 Genes related to DNA rep...  
 Adipose tissue-related ge...  
 Critical roles of DNA dam...  
 Interactome analysis of D...  
 Concluding remarks and f...

» Acknowledgements  
 » References  
 » Internet Resources  
 » Publication Dates  
 » History

**Abstract**

Classical and progeroid congenital lipodystrophies are a collection of rare diseases displaying a large genetic heterogeneity. They occur due to pathogenic variants in genes associated with adipogenesis, DNA repair pathways, and genome stability. Subjects with lipodystrophy exhibit an impairment in the homeostasis of subcutaneous white adipose tissue (sWAT), resulting in low leptin and adiponectin levels, insulin resistance (IR), diabetes, dyslipidemia, ectopic fat deposition, inflammation, mitochondrial and endoplasmic reticulum commitments, among others. However, how pathogenic variants in adipogenesis-related genes modulate DNA repair in some classical congenital lipodystrophies has not been elucidated. In the same way, no data is clarifying how pathogenic variants in DNA repair genes result in sWAT loss in different types of progeroid lipodystrophies. This review will concentrate on the main molecular findings to understand the link between DNA damage/repair and adipogenesis in human and animal models of congenital lipodystrophies. We will focus on classical and progeroid congenital lipodystrophies directly or indirectly related to DNA repair pathways, highlighting the role of DNA repair-related proteins in maintaining sWAT homeostasis.

**Keywords:**

DNA repair; adipogenesis; genetic lipodystrophies; metabolism