



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**  
Centro Biomédico  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Tamiris Ingrid Petito da Silva


**Efeitos pleiotrópicos do inibidor SGLT2, empagliflozina, em  
modelo experimental de esteatose hepática**

Rio de Janeiro

2019

Tamiris Ingrid Petito da Silva

**Efeitos pleiotrópicos do inibidor SGLT2, empagliflozina, em modelo experimental de esteatose hepática**



Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra Sandra Barbosa da Silva

Rio de Janeiro

2019

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

S586 Silva, Tamiris Ingrid Petito da.  
Efeitos pleitrópicos do inibidor SGLT2, empagliflozina, em modelo experimental de esteatose hepática / Tamiris Ingrid Petito da Silva. – 2019.  
81f.

Orientadora: Sandra Barbosa da Silva.

Mestrado (Dissertação) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. Fígado Gorduroso - Teses. 2. Gorduras na dieta - Teses. 3. Esteatose Hepática - Teses. 4. Hipoglicemiantes. 5. Estresse do Retículo Endoplasmático. I. Silva, Sandra Barbosa da. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Humana e Experimental. III. Título.

CDU 615.33

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira  
CRB/7 – 6382

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Tamiris Ingrid Petito da Silva

**Efeitos pleitrópicos do inibidor SGLT2, empagliflozina, em modelo experimental de esteatose hepática**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 21 de fevereiro de 2019.

Banca examinadora:

---

Prof<sup>a</sup> Dra Sandra Barbosa da Silva (Orientadora)  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

---

Prof<sup>a</sup> Dra Renata Frauches Medeiros Coimbra  
Universidade Federal Fluminense

---

Prof<sup>a</sup> Dra Angela de Castro Resende  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Rio de Janeiro

2019

## DEDICATÓRIA

Dedico às mulheres fortes da minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, preciso agradecer à minha orientadora Sandra, a pessoa que me aceitou e acreditou em mim. Obrigada por me dar liberdade e asas, sem cortá-las, mas me ensinando sempre, principalmente a manter os pés no chão.

Ao meus amigos do LMMC, se não fosse por vocês nada seria possível, a pressão seria insuportável, os obstáculos seriam altos demais. Obrigada por todas risadas e quilos a mais. E obviamente as discussões científicas, sobre livros, política, vidas alheias.

A meus pais por não duvidarem de mim, estarem sempre tentando entender o que eu faço, e por estarem felizes por mim. Sem vocês não estaria aqui.

Meus amigos UERJianos, quase todos, Marcos, Junior, Danilo, Mariana, Izabela, Luiza obrigada por acreditarem em mim e dividirem momentos especiais.

Gabriela foram 2 anos difíceis para nós, a distância nos separou fisicamente, mas você esteve presente em todos os momentos. Obrigada por ser a amiga maravilhosa.

A meu namorado por acreditar em mim até quando eu não acreditava, me dar forças até quando não sabia que estava dando, só de estar do meu lado e lutando comigo. Que nosso futuro seja brilhante, assim como esses 9 anos.

Principalmente obrigada pela paciência.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Nunca tenha certeza de nada,  
A sabedoria começa com a dúvida.

*Freud*

## RESUMO

SILVA, Tamiris Ingrid Petito da. *Efeitos pleiotrópicos do inibidor SGLT2, empagliflozina, em modelo experimental de esteatose hepática*. 81f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

A doença hepática gordurosa não alcoólica não possui terapia exclusiva até o momento, embora alguns fármacos apresentem efeitos pleiotrópicos. Recentemente foi descrita uma nova classe farmacológica de hipoglicemiantes orais, o inibidor seletivo do cotransportador de sódio e glicose 2 (SGLT2), que apresenta efeitos pleiotrópicos cardiovasculares e hepáticos, com destaque para a empagliflozina, que promove a glicosúria pela inibição da reabsorção renal da glicose e com isso, a perda de peso. Como objetivo, foram avaliados os efeitos induzidos pela dieta hiperlipídica em camundongos C57Bl/6 sobre a massa corporal e tolerância à glicose anteriores ao período de tratamento e após, foram avaliados os efeitos pleiotrópicos da empagliflozina no fígado, através das vias da lipogênese,  $\beta$ -oxidação e estresse do retículo endoplasmático. Para tal, camundongos machos C57Bl/6 (3 meses de idade) receberam dieta controle (C, 10% de lipídios, n=20) ou uma dieta rica em gordura saturada (HL, 50% de lipídios, n=20) durante 10 semanas. Após esse período, os grupos foram subdivididos para receber o tratamento com empagliflozina (n=10 por grupo), durante 5 semanas na dose 10 mg/kg/dia adicionados às respectivas dietas, totalizando 4 grupos experimentais: C, C-EMPA, HL e HL-EMPA. Foram realizadas análises bioquímicas, teste oral de tolerância à glicose, sensibilidade à insulina, calorimetria indireta, estereologia hepática, imunofluorescência, RT-qPCR para os genes relacionados a  $\beta$ -oxidação, lipogênese e estresse do retículo. No período pré-tratamento, utilizado para induzir alterações metabólicas foi observado no grupo HL aumento da massa corporal +11% (MC), hiperglicemia e intolerância à glicose +25%, além de aumento de +164% da esteatose hepática comparado ao grupo C. Em contraste, após o tratamento com empagliflozina, houve aumento de +4% no gasto energético, com consequente redução de -5% na MC, melhora tanto na tolerância à glicose, quanto na sensibilidade à insulina, todos em comparação ao grupo HL não tratado. No que se refere a expressão de PPAR $\alpha$ , relacionado a  $\beta$ -oxidação, houve maior expressão no grupo HL-EMPA, ao mesmo tempo que redução na expressão dos genes lipogênicos (FAS, SREBP-1c e PPAR  $\gamma$ ). Além disso, o grupo HL-EMPA apresentou redução significativa na expressão dos genes relacionados ao estresse do retículo endoplasmático (CHOP, ATF4 e GADD45). Nossos resultados indicam que a empagliflozina reduziu a massa corporal, favorecendo melhor sensibilidade a insulina e redução potencial da esteatose hepática que é consistente com a redução na expressão dos genes que atuam na lipogênese hepática, somando a redução dos genes envolvidos no estresse do retículo endoplasmático. Dessa forma, a inibição do SGLT2, utilizando empagliflozina pode ser uma ferramenta importante para evitar a progressão da esteatose hepática.

Palavras chave: Esteatose hepática. Doença hepática gordurosa não alcoólica.

Estresse do retículo endoplasmático. Hipoglicemiantes.



## ABSTRACT

SILVA, Tamiris Ingrid Petito da. *Pleiotropic effects of the SGLT2 inhibitor, empagliflozin, on the experimental model of hepatic steatosis*. 81f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019

There is no exclusive therapy for non-alcoholic fatty liver disease until the present moment, although some drugs have pleiotropic effects. Recently, a pharmacological class of oral hypoglycemic agents, a selective inhibitor of sodium and glucose cotransporter 2 (SGLT2), has been shown to have cardiovascular and hepatic pleiotropic effects, notably empagliflozin, which promotes glycosuria by inhibiting renal resorption and weight loss. As aims, were evaluate , we evaluated the effects induced with high fat diet in C57Bl/6 mice on body mass and glucose tolerance prior to the treatment period and afterwards, were evaluated the pleiotropic effects of empagliflozin in the liver, through the pathways of lipogenesis,  $\beta$ - oxidation and endoplasmic reticulum stress. For this, C57BL/6 male mice (3 months-old) received a control diet (C, 10% lipids, n = 20) or a rich saturated fat diet (HL, 50% lipids, n=20) for 10 weeks. After this period, the groups were subdivided to receive empagliflozin treatment (N=10 per group), for 5 weeks at a dose of 10 mg/kg/day, added the respective diets, in total 4 experimental groups: C, C-EMPA, HL and HL-EMPA. Biochemical analyzes, oral glucose tolerance test, insulin sensitivity, indirect calorimetry, hepatic stereology, immunofluorescence, RT-qPCR for the genes related to  $\beta$ -oxidation, lipogenesis and endoplasmic reticulum stress were performed. In the pre-treatment period, used to induce metabolic alterations, it was observed in the HL group an increase in body mass +11% (BM), hyperglycemia and glucose intolerance +25%, 164% of hepatic steatosis, compared to C group. In contrast, after treatment with empagliflozin, there was an increase of +4% in energy expenditure, with a consequent reduction of -5% in BM, improvement in both glucose tolerance and insulin sensitivity, all compared to the untreated HL group. As regards the expression of PPAR $\alpha$ , related to  $\beta$ -oxidation, there was a greater expression in the HL-EMPA group, at the same time as reduction in the expression of the lipogenic genes (FAS, SREBP-1c and PPAR $\gamma$ ). In addition, the HL-EMPA group showed a significant reduction in the expression of genes related to endoplasmic reticulum stress (CHOP, ATF4 and GADD45). Our results indicate that empagliflozin reduced body mass, favoring a insulin sensitivity improved and a potential reduction of hepatic steatosis, which is consistent with the reduction in the expression of the genes that act in the hepatic lipogenesis, adding the reduction of the genes involved in the endoplasmic reticulum stress. Thus, inhibition of SGLT2 using empagliflozin may be an important tool to prevent progression of hepatic steatosis.

Keywords: Hepatic steatosis. Non-alcoholic fatty liver disease. Endoplasmic reticulum stress. Hypoglycemic agents.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Progressão da doença hepática gordurosa não-alcoólica.....	18
Figura 2 – Prevalência mundial da DHGNA. ....	20
Figura 3 – Hipóteses dos fatores.....	22
Figura 4 – Mecanismos moleculares da esteatose hepática. ....	25
Figura 5 – Estresse do retículo endoplasmático.....	27
Figura 6 – Mecanismo de ação da empagliflozina .....	31
Figura 7 – Massa corporal período de pré-tratamento .....	41
Figura 8 – Teste de tolerância à glicose no período de pré-tratamento .....	42
Figura 9 – Massa corporal no período de tratamento.....	43
Figura 10 – Parâmetros urinários.....	44
Figura 11 – Teste oral de tolerância à glicose no período de tratamento.....	45
Figura 12 – Glicose em jejum.....	46
Figura 13 – Insulina plasmática.....	46
Figura 14 – Índice quantitativo de sensibilidade à insulina.....	47
Figura 15 – Temperatura corporal.....	48
Figura 16 – Calorimetria indireta .....	49
Figura 17 – Bioquímica plasmática .....	50
Figura 18 – Parâmetros do tecido adiposo.....	51
Figura 19 – Parâmetros hepáticos. ....	53
Figura 20 – Expressão gênica da via lipogênica. ....	54
Figura 21 – Expressão gênica da via da $\beta$ -oxidação.....	55
Figura 22 – Expressão gênica relacionada a gotículas lipídicas. ....	56
Figura 23 – Expressão gênica da via do estresse do retículo endoplasmático. ....	57
Figura 24 – Fotomicrografias da imunofluorescência para as proteínas Plin2 e eIF2 $\alpha$ . .....	58
Figura 25 – Resumo gráfico. ....	64

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição das dietas .....	34
Tabela 2 - Sequência dos iniciadores senso e antisenso do RT-qPCR .....	40
Tabela 3 - Ingestão alimentar.....	42

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC	<i>Acety-coA carboxylase</i>
ATF4	<i>Activating transcription factor-4</i>
ATF6	<i>Activating transcription factor-6</i>
BiP/Grp78	<i>Binding immunoglobulin protein/Glucose-regulated protein 78</i>
CHC	Carcinoma hepatocelular
CHOP	<i>C/EBP Homologous Protein</i>
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcóolica
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
EHNA	Esteatohepatite não-alcóolica
ERE	Estresse do retículo endoplasmático
FAS	<i>Fatty acid synthase</i>
GLUT	<i>Glucose transporter</i>
IRE1	<i>Inositol requiring enzyme 1</i>
LDN	Lipogênese <i>de novo</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
MC	Massa corporal
NF- $\kappa$ B	<i>Factor nuclear kappa B</i>
PERK	<i>PKR-like eukaryotic initiation factor 2<math>\alpha</math> kinase</i>
PPAR $\alpha$	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor <math>\alpha</math></i>
PPAR $\gamma$	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
RI	Resistência à insulina
RE	Retículo endoplasmático
SCD1	<i>Stearoyl-CoA desaturase 1</i>
SGLT	<i>Sodium glucose co-transporter/Cotransportador de sódio e glicose</i>
SREBP1c	<i>Sterol regulatory element-binding transcription factor 1</i>
TAG	Triacilglicerol
UPR	Resposta a proteínas mal-dobradas

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>1 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	15
1.1 <b>Dieta hiperlipídica</b> .....	15
1.2 <b>Doença hepática gordurosa não-alcoólica</b> .....	17
1.2.1 <u>Progressão</u> .....	17
1.2.2 <u>Epidemiologia</u> .....	19
1.2.3 <u>Patogênese</u> .....	20
1.2.4 <u>Mecanismos Moleculares</u> .....	22
1.2.5 <u>Estresse do retículo endoplasmático</u> .....	25
1.3 <b>Inibidores do SGLT2</b> .....	28
1.3.1 <u>Empagliflozina</u> .....	29
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	32
2.1 <b>Objetivo Geral</b> .....	32
2.2 <b>Objetivos específicos</b> .....	32
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	33
3.1 <b>Animais e dietas</b> .....	33
3.2 <b>Ingestão alimentar e massa corporal</b> .....	34
3.3 <b>Glicose urinária</b> .....	34
3.4 <b>Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG)</b> .....	35
3.5 <b>Análise da Insulina Plasmática e QUICKI</b> .....	35
3.6 <b>Temperatura corporal</b> .....	35
3.7 <b>Calorimetria Indireta</b> .....	35
3.8 <b>Morte dos animais</b> .....	36
3.9 <b>Bioquímica plasmática</b> .....	36
3.10 <b>Índice de Adiposidade</b> .....	36
3.11 <b>Fígado</b> .....	36
3.12 <b>Imunofluorescência</b> .....	37
3.13 <b>RT-qPCR (Transcriptase reversa-PCR quantitativo)</b> .....	38
3.14 <b>Análise de dados</b> .....	38
<b>4 RESULTADOS</b> .....	41
4.1 <b>Massa corporal (MC)</b> .....	41

4.2 Ingestão alimentar .....	41
4.3 Teste de tolerância oral à glicose (TOTG).....	42
4.4 Massa corporal (MC) .....	43
4.5 Ingestão alimentar .....	43
4.6 Volume urinário .....	44
4.7 Glicose urinária .....	44
4.8 Metabolismo dos Carboidratos .....	44
4.8.1 <u>Teste de tolerância oral à glicose (TOTG)</u> .....	44
4.8.2 <u>Glicemia de jejum</u> .....	45
4.8.3 <u>Insulina plasmática</u> .....	46
4.8.4 <u>QUICKI</u> .....	47
4.9 Temperatura corporal .....	47
4.10 Gasto energético .....	48
4.11 Bioquímica plasmática.....	49
4.11.1 <u>Triacilglicerol plasmático</u> .....	49
4.11.2 <u>Colesterol total plasmático</u> .....	49
4.12 Índice de adiposidade e distribuição do tecido adiposo .....	50
4.13 Parâmetros hepáticos .....	51
4.13.1 <u>Massa do fígado</u> .....	51
4.13.2 <u>Triacilglicerol hepático</u> .....	51
4.13.3 <u>Esteatose hepática</u> .....	52
4.12.4 <u>Via lipogênica</u> .....	54
4.13.5 <u>Via da <math>\beta</math>-oxidação</u> .....	55
4.13.6 <u>Gotícula lipídica</u> .....	55
4.13.7 <u>Estresse do retículo endoplasmático</u> .....	56
5 DISCUSSÃO.....	59
CONCLUSÃO .....	65
REFERÊNCIAS.....	66
ANEXO A – Comitê de ética .....	80
ANEXO B - Submissão do artigo .....	81

## INTRODUÇÃO

O aumento do consumo de alimentos de alta densidade energética levou a um crescimento das morbidades e comorbidades, nas quais destacam-se a obesidade central, conseqüentemente o diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) e doenças cardiovasculares. A obesidade central é caracterizada como um acúmulo anormal de gordura na região abdominal, que está relacionado ao acúmulo ectópico de gordura em órgãos chave do metabolismo, tais como o fígado e o pâncreas (Moryani *et al.*, 2016).

A Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica (DHGNA) é considerada uma manifestação hepática da síndrome metabólica, que constitui uma forma importante de doença hepática crônica não associada ao consumo significativo de álcool (Sporea *et al.*, 2018). É caracterizada pela deposição ectópica de triacilglicerol (TAG) no hepatócito e tem múltiplas causas, onde uma interação de diversos fatores leva a essa condição ou a sua progressão (Diehl, 2002; Friedman *et al.*, 2018).

Ademais, o consumo de dieta rica em gordura saturada está amplamente descrito na literatura como causa para fatores da síndrome metabólica e esteatose hepática. A dieta rica em lipídios saturados leva a uma maior produção de TAG e seu maior acúmulo nos adipócitos, este aumento leva a um estresse do tecido adiposo gerando inflamação sistêmica e deposição ectópica (Stojsavljevic *et al.*, 2014). Até o presente momento não há uma terapia farmacológica eficaz para o tratamento exclusivo da DHGNA, contudo uma nova classe de fármacos vem sendo utilizada e estudada pelo seu efeito benéfico ao controle glicêmico do DM2, com efeitos pleiotrópicos cardiovasculares (Tikkanen *et al.*, 2015) e hepáticos (Jojima *et al.*, 2016).

Os inibidores do co-transportador de sódio-glicose (SGLT) são uma classe de medicamentos antidiabéticos orais que agem para reduzir a hiperglicemia promovendo a excreção da glicose urinária, independente da secreção ou ação da insulina (Farese *et al.*, 2012). Os SGLTs são uma família de co-transportadores de sódio e glicose presentes no néfron que medeiam um processo ativo de transporte ligado ao sódio contra um gradiente eletroquímico. Duas importantes isoformas de SGLTs são descritas até o momento, o SGLT1 e o SGLT2 (Vallon e Thomson, 2017)

A empagliflozina foi a primeira desse novo grupo de fármacos hipoglicemiantes a mostrar benefícios num ensaio de resultados cardiovasculares, em que os pacientes diabéticos tratados com a empagliflozina apresentaram uma menor mortalidade por doenças cardiovasculares (Scheen, 2016). A partir disso, em estudos sobre seus efeitos pleiotrópicos descobriu-se a ação sobre a esteatose hepática em humanos (Sattar *et al.*, 2018) e modelos experimentais, com benefícios na redução de marcadores da lipogênese *de novo* (LDN) (Jojima *et al.*, 2016), mas que até o momento não estão totalmente esclarecidos.

Dessa forma, a hipótese do presente estudo é de que o tratamento com empagliflozina em modelo experimental de esteatose hepática, causada com a ingestão de dieta hiperlipídica, apresentará benefícios hepáticos, através da modulação das vias de lipogênese,  $\beta$ -oxidação e estresse do retículo endoplasmático (ERE).



## 1 REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1 Dieta hiperlipídica

Os lipídios são parte da estrutura celular e estão envolvidos em funções fundamentais, como homeostase celular, comunicação célula-célula e regulação de inflamação e imunidade. Também são uma fonte densa de energia, e a mobilização dos lipídios para energia é uma função biológica crítica (Marra e Svegliati-Baroni, 2018). Os lipídios podem ser absorvidos a partir da dieta através da absorção intestinal (fonte exógena) ou sintetizado *de novo* no fígado (endógena) (Brown *et al.*, 1981).

Os ácidos graxos são as formas mais simples de lipídios, atuando como blocos de construção para síntese de lipídios mais complexos, como por exemplo os TAG. Desta forma, são classificados pelo número de ligações duplas na cadeia de hidrocarboneto, os ácidos graxos saturados são os que contêm exclusivamente ligações simples entre os carbonos, enquanto os insaturados contêm pelo menos 1 ligação dupla entre os carbonos, e chamados monoinsaturados, enquanto os que possuem 2 ou mais são chamados poliinsaturados (Kalish *et al.*, 2015).

As enzimas envolvidas na síntese do TAG são controladas por muitos dos mesmos fatores que regulam a LDN. Além disso, moduladores da síntese de TAG podem ser determinantes importantes das doenças metabólicas como a DHGNA. As enzimas que catalisam a adição de ácidos graxos ao esqueleto de glicerol estão aumentadas em pacientes obesos com DHGNA (Hall *et al.*, 2012).

O aumento e desregulação da composição de lipídios intracelular causa a lipotoxicidade, também associada com disfunção de organelas, injúria ou morte celular (Ibrahim *et al.*, 2018; Marra e Svegliati-Baroni, 2018). Com isso, o risco de lipotoxicidade difere de acordo com o tipo de lipídio que acumula (Alkhoury *et al.*, 2009), descrito como mais tóxicos os ácidos graxos de cadeia longa saturados estão presente sobretudo em produtos de origem animal, e na composição dos lipídios celulares (Akazawa *et al.*, 2010). O ácido palmítico, o mais abundante ácido graxo saturado de cadeia longa, tem sido reportado por desenvolver estresse oxidativo e

ERE, causando lipotoxicidade, relacionada a morte celular (Li *et al.*, 2008; Wei *et al.*, 2009).

Assim, a qualidade da gordura na dieta influencia a sensibilidade à insulina e as anormalidades metabólicas associadas, independentemente de seus efeitos no peso corporal em humanos (Sharp *et al.*, 2018). A gordura saturada piora significativamente a RI, enquanto os ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados são menos prejudiciais (Storlien *et al.*, 1991), isso ocorre devido, principalmente, ao grau de saturação, alterando a fluidez da membrana e a sinalização da insulina (Perona, 2017).

Corroborando, em 10 mulheres metabolicamente saudáveis, a indução por 2 semanas de uma dieta hiperlipídica saturada (56% da energia total), apresentaram um aumento de 35% do acúmulo de lipídios no fígado, sem afetar a massa corporal (Westerbacka *et al.*, 2005). Em adição, em 39 homens com peso “normal” que consumiram um extra de 750 kcal por dia, onde um grupo consumiu ácidos graxo saturados e outro de poliinsaturado, nas suas dietas habituais por 7 semanas, ambos apresentaram um aumento de 1,6 kg na massa corporal, porém o aumento da esteatose hepática foi maior no grupo que consumiu o acréscimo de ácido graxo saturado comparado ao poliinsaturado (0.56% vs 0.04%,  $P = 0.033$ ) (Rosqvist *et al.*, 2014).

Assim como os dados acima, os estudos em modelo experimental com administração a longo prazo de uma dieta composta de 40 a 60% de lipídios saturados promove desordens metabólicas, como o aumento de citocinas inflamatórias, RI, hipertensão e obesidade (Flanagan *et al.*, 2008), e a esteatose hepática (Aguila *et al.*, 2003; Barbosa-da-Silva *et al.*, 2014). Num estudo prévio do nosso grupo além da presença da esteatose hepática, o fígado dos animais que receberam dieta hiperlipídica durante 12 semanas, na qual era composta por 50% de ácidos graxos saturados, apresentaram também ativação de células estreladas, na qual causa deposição de fibras colágenas e conseqüente formação de fibrose (Marinho *et al.*, 2017).

## 1.2 Doença hepática gordurosa não-alcoólica

O fígado é o órgão central do metabolismo de lipídios e glicose (Koo, 2013; Dietrich e Hellerbrand, 2014; Gruzdeva *et al.*, 2018) e é também o principal órgão de desintoxicação e processamento de xenobióticos ambientais (Kim e Lee, 2018).

O fígado é um intermediário entre as fontes de substrato energético exógeno(ex, dieta) e endógeno e os vários órgãos que consomem estes substratos energéticos, necessária para a homeostase do organismo (Fabbrini e Magkos, 2015). Entretanto, quando há um excesso de energia, particularmente lipídios, está associado com efeito adverso no fígado e outros órgãos (Dietrich e Hellerbrand, 2014). Nesse contexto, a DHGNA tem sido associada com alterações em muitas funções fisiológicas do fígado (Fabbrini e Magkos, 2015).

A DHGNA é um espectro de doenças hepáticas (Dietrich e Hellerbrand, 2014), relacionada com o acúmulo ectópico de lipídios, em geral TAGs no citoplasma do hepatócito em macro- ou micro- vesículas lipídicas (Burt *et al.*, 1998; Ress e Kaser, 2016). O primeiro estágio reconhecível da DHGNA é a esteatose hepática, quando o conteúdo de gordura excede 5% do volume do fígado (Fargion *et al.*, 2014; Kim e Lee, 2018). Sendo esta não relacionada a eventos secundários, como ao consumo excessivo de álcool, nem a infecções virais, ou medicamentos (Chalasani *et al.*, 2012).

A etiologia da DHGNA é complexa e multifatorial pois envolve determinantes genéticos (Hooper *et al.*, 2011) e fatores ambientais, como a supernutrição, composição dos alimentos ingeridos, o estilo de vida sedentários (Gan *et al.*, 2015). Também envolve patologias como a resistência à insulina (RI) ou o DM2 (Zelber-Sagi *et al.*, 2013), obesidade, disbiose (Machado e Diehl, 2016), dislipidemias.e hipertensão (Adams *et al.*, 2005).

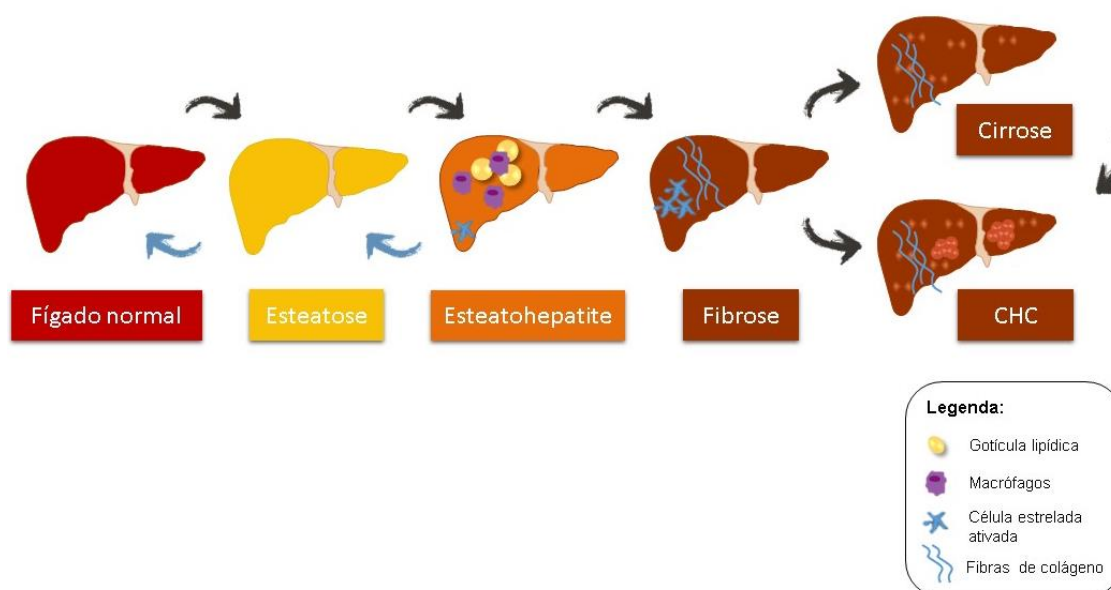
### 1.2.1 Progressão

A diferença entre as doenças do espectro da DHGNA está na sua complexidade e severidade, apresentado na figura 1. A esteatose hepática (em inglês, NAFL – nonalcoholic fatty liver) ou “gordura no fígado”, popularmente

chamada, consiste apenas no acúmulo excessivo do TAG no hepatócito, sendo a mais simples e também reversível (Lonardo *et al.*, 2017).

Na EHNA (esteatohepatite não alcoólica, em inglês, NASH - nonalcoholic steatohepatitis) além do acúmulo excessivo do lipídio, há danos iniciais causados pela lipotoxicidade, como inflamação e injúria hepatocelular (balonamento) (Dietrich e Hellerbrand, 2014). A EHNA é reversível, porém pode avançar para a fase de fibrose. A cirrose é uma fase avançada da EHNA com fibrose, onde a presença maciça da fibrose, causa a perda de função do tecido hepático, sendo não reversível e também levando ao carcinoma hepatocelular (CHC) (Vernon *et al.*, 2011).

Figura 1 – Progressão da doença hepática gordurosa não-alcoólica



Legenda: O aumento da ingestão de alimentos ricos em gordura e de alta densidade, induzem o fígado normal à primeira fase do espectro da doença, a esteatose caracterizada pela presença de gotículas lipídicas, as injúrias causadas ao fígado, cronicamente, levam a progressão para a esteatohepatite, caracterizada pela presença de infiltrados inflamatórios, células em balonamento e uma ativação inicial das células estreladas. Essas duas fases apresentam características iniciais e reversíveis (representadas pela seta azul), a partir da deposição de fibras colágenas na fase da fibrose, o fígado começa a perder a função e progride para a cirrose e/ou para o carcinoma hepatocelular (CHC).

Fonte: A autora, 2019.

Após a descrição da EHNA por Ludwig (Ludwig *et al.*, 1980), todos os paradigmas foram desafiados e então, a DHGNA é considerada uma condição sistêmica complexa multifacetada (Hardy *et al.*, 2016) que exhibe um dimorfismo sexual, e em humanos, os homens tem mais propensão ao desenvolvimento da

DHGNA, e mulheres em pré-menopausa são igualmente protegidas ao desenvolvimento da DHGNA e de doenças cardiovasculares (Ballestri *et al.*, 2017).

Diversos estudos têm demonstrado que a progressão de esteatose para a EHNA e a fibrose não é linear e provavelmente mais dinâmica que se tinha conhecimento (Angulo *et al.*, 2015), outros estudos demonstraram também que todas as formas da DHGNA têm um risco significativamente aumentado de progredirem à cirrose e CHC (Yki-Jarvinen, 2014).

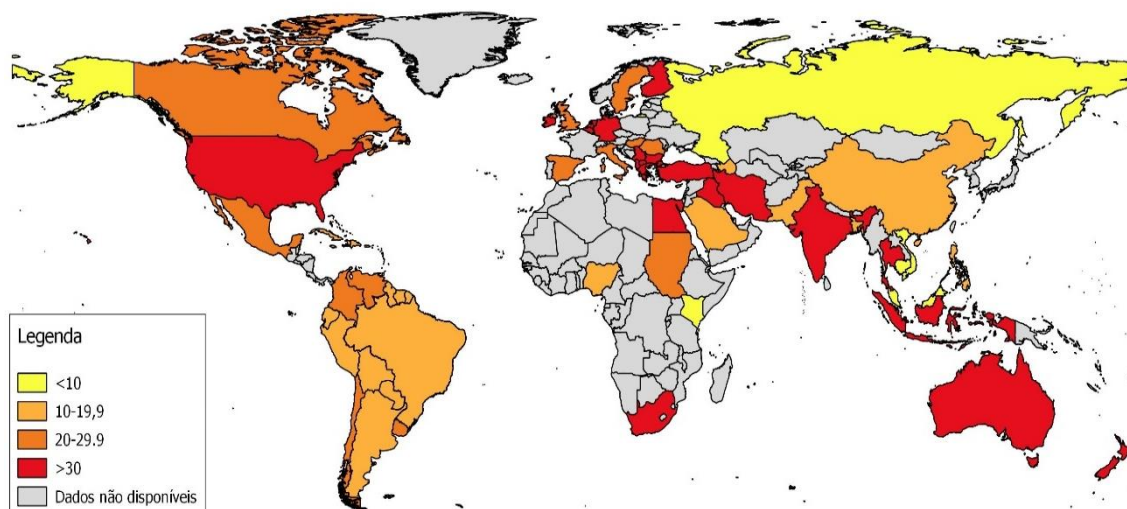
### 1.2.2 Epidemiologia

A DHGNA é altamente prevalente em algumas áreas e/ou continentes, mas tem taxas mais altas reportadas na América do Sul (31%) e Oriente Médio (32%), seguido da Ásia (27%), EUA (24%) e Europa (23%), enquanto que a DHGNA é menos comum na África (14%) (Younossi *et al.*, 2016b), dados apresentados na figura 2. A prevalência da DHGNA está em aumento constante, pois em 2005 apresentava taxa de 15% e em 2010 uma taxa de 25%, (Younossi *et al.*, 2018).

No Brasil, um estudo com 1280 indivíduos, 432 apresentaram as enzimas hepáticas ALT/AST elevadas e então realizaram uma biópsia e em torno de 42% de dos indivíduos apresentaram esteatose hepática (Cotrim *et al.*, 2011). Em outro estudo, foi encontrada através de ultrassonografia uma prevalência da DHGNA em 69,4% dos 180 pacientes com DM2 (Leite *et al.*, 2009).

É esperado que a incidência da DHGNA cresça em paralelo ao crescimento da incidência da obesidade e do DM2 (Motamed *et al.*, 2017). Pois sua prevalência aumenta conforme a massa corporal aumenta, acometendo de 15 a 20% dos indivíduos com índice de massa corporal considerado normal e 70% dos indivíduos com índice de massa corporal caracterizando obesidade (Fotbolcu e Zorlu, 2016).

Figura 2 – Prevalência mundial da DHGNA



Legenda: A prevalência da doença hepática gordurosa não alcoólica em diferentes países.

Fonte: Adaptado de (Younossi *et al.*, 2018)

Obter os dados sobre a verdadeira incidência da DHGNA é importante para determinar os pacientes a longo prazo com DHGNA. Pois além das consequências clínicas, há as consequências econômicas devido ao aumento de pacientes com DHGNA e os gastos. Em que, foi divulgado em 2016 de estimados 103 bilhões de dólares pelos EUA e de 35 bilhões de euros por países europeus (Younossi *et al.*, 2016a).

### 1.2.3 Patogênese

A patogênese e os mecanismos moleculares que controlam sua progressão são pouco compreendidos (Ferramosca e Zara, 2014). Há uma hipótese clássica para a patogênese da DHGNA que é baseada em “dois fatores” (em inglês, “two hits”) (Day e James, 1998; Dowman *et al.*, 2010), que no início da doença o “primeiro fator” é representado pelo acúmulo de TAG (Puri *et al.*, 2007), a esteatose *per se*.

Fang *et al.*, (Fang *et al.*, 2018) acrescenta a RI como “primeiro fator”. Este “primeiro fator” sensibiliza os hepatócitos a lesão mediada pelo “segundo fator” como a secreção de adipocinas pró-inflamatórias e a redução da produção da

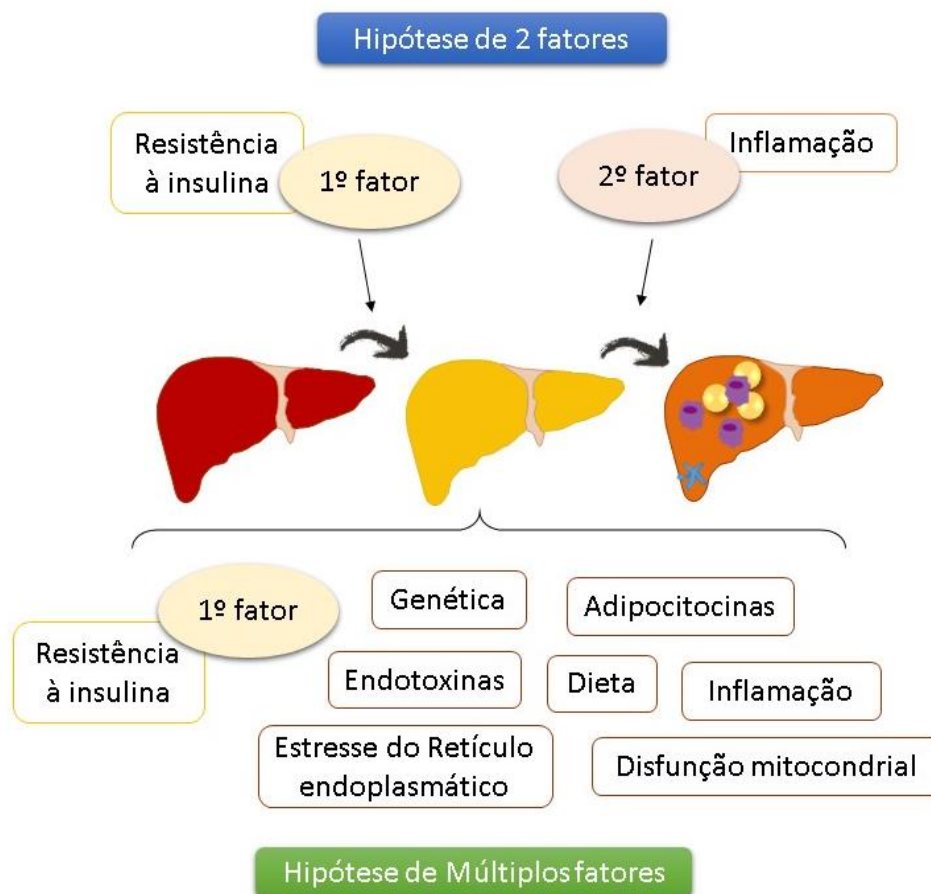
adiponectina, um potente agente anti-inflamatório e sensibilizador de insulina (Pagano *et al.*, 2005; Tilg e Moschen, 2006), disfunção mitocondrial e estresse oxidativo (Fang *et al.*, 2018), figura 3.

Com o desenvolvimento de novas tecnologias e pesquisas, esta hipótese parece mais que simplória para sintetizar a complexidade da DHGNA humana (Day e Saksena, 2002; Ballestri *et al.*, 2016) e as alterações fisiopatológicas, pois não são transições contínuas e nem resultados de “dois fatores” definidos (Dietrich e Hellerbrand, 2014).

Então, uma nova hipótese tem sido considerada mais adequada para entender a patogênese da DHGNA, a hipótese de “múltiplos fatores” (em inglês, “*multiple hits*”) (Tilg e Moschen, 2010; Su *et al.*, 2018), enfatizando as infinidades de vias que induz ao mesmo fenótipo hepático (Ballestri *et al.*, 2016), bem como a alterações no *crosstalk* entre diferentes órgãos e tecidos, incluindo tecido adiposo, pâncreas, intestino e músculo (Ratziu *et al.*, 2010; Ayonrinde *et al.*, 2015; Caligiuri *et al.*, 2016).

No entanto, o acúmulo de gordura no fígado, causado pela obesidade e RI, ainda parece representar o “primeiro fator” (Fang *et al.*, 2018). Os “múltiplos fatores” incluem a RI, adipocinas pró-inflamatórias, fatores dietéticos, ácido graxo livre, lipopolissacarídeos (LPS) derivados da microbiota intestinal e fatores epigenéticos e genéticos (Tilg e Moschen, 2010; Buzzetti *et al.*, 2016), figura 3.

Figura 3 – Hipóteses dos fatores



Legenda: A hipótese clássica é a hipótese de 2 fatores onde o primeiro fator, a resistência à insulina, é necessário para induzir a esteatose hepática e para a indução da esteatohepatite era necessário um segundo fator, a inflamação. A hipótese mais recente é de múltiplos fatores, na qual diferentes fatores, incluindo o primeiro fator, convergem na indução das alterações e progressões hepáticas.

Fonte: A autora, 2019.

#### 1.2.4 Mecanismos Moleculares

O influxo de ácidos graxos contribui para o equilíbrio de TAGs no fígado, tanto quanto para o desequilíbrio na DHGNA (Kawano e Cohen, 2013). A taxa de captura de ácidos graxos do plasma depende da concentração do mesmo e da capacidade do hepatócito, que depende do número e da atividade de proteínas transportadoras na membrana plasmática (Bradbury, 2006).

Após a entrada na célula realizada por uma proteína transportadora, os ácidos graxos são rapidamente convertidos em acil-CoA (Kawano e Cohen, 2013).



Os ácidos graxos não esterificados podem ser derivados da síntese a partir da glicose, na LDN (Wang *et al.*, 2011).

A glicose é então, convertida a acil-coA, via glicólise e oxidação do piruvato, após em malonil-coA pela enzima carboxilase de acetil-coA (ACC- acetyl-coA carboxylase). O ácido palmítico é formado a partir do malonil-coA através da sintase de ácido graxo

(FAS – fatty acid synthase). O malonil-coA será utilizado na formação de TAG, a partir de alongamentos e saturações (Kawano e Cohen, 2013). E a FAS é a enzima limitante da biossíntese de ácidos graxos e catalisa o último passo dessa via (Abu-Elheiga *et al.*, 2005).

A lipogênese é controlada principalmente por fatores de transcrição e no estado pós-prandial, o aumento de glicose e insulina plasmáticos são necessários para ativação da lipogênese (Vernon *et al.*, 2011). Na RI e hiperinsulinemia há um aumento da expressão de SREBP1c (Sterol regulatory element-binding protein 1c) hepáticos, e também da expressão do receptores ativados por proliferadores de peroxissoma  $\gamma$ , PPAR $\gamma$  (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma) (Schadinger *et al.*, 2005).

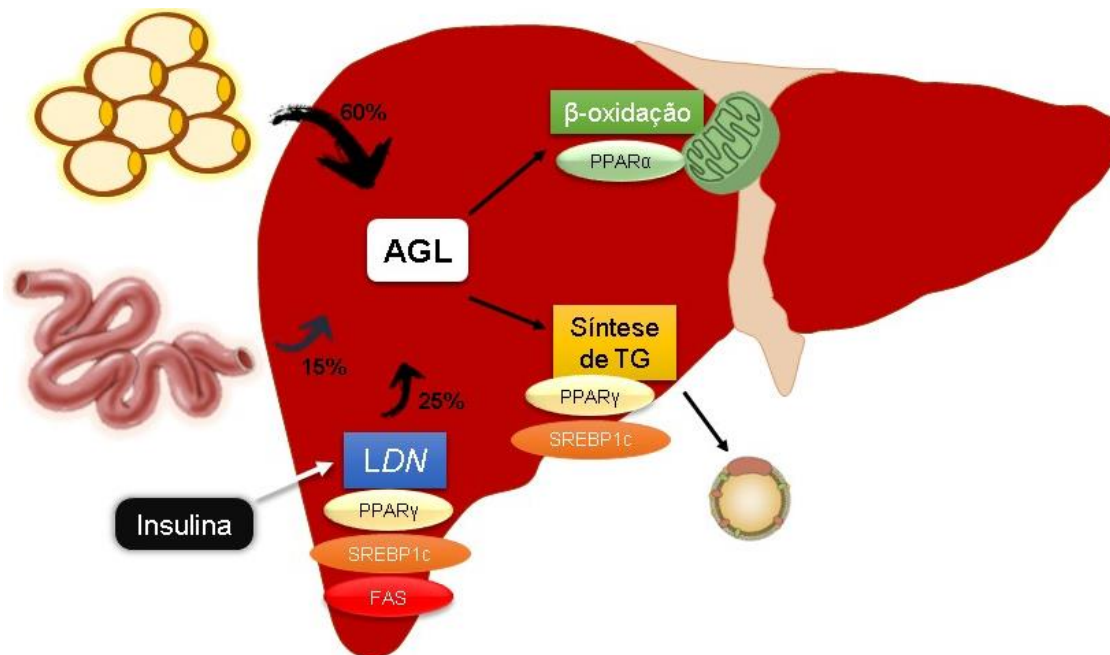
O controle de genes envolvidos com a via lipogênica nos adipócitos é realizado pelo PPAR $\gamma$ , promovendo a captura de ácidos graxos e diferenciação de adipócitos, com consequente aumento no conteúdo de TAG no adipócito e redução da entrega de ácidos graxos ao fígado (Kallwitz *et al.*, 2008). Contudo, na DHGNA, foi demonstrado que a expressão gênica do PPAR $\gamma$  hepático está elevada (Pettinelli e Videla, 2011).

O SREBP1c é um fator chave no controle de vários genes envolvidos na regulação homeostática do colesterol e do metabolismo de lipídios, aumentando os genes de transcrição envolvidos na síntese de ácidos graxos (Horton *et al.*, 2002). No estado de jejum, a lipólise é induzida pelo glucagon, assim, a insulina é suprimida. A LDN ocorre no estado pós-prandial, é estimulada pela elevação da glicemia e insulina, mediada pelo SREBP1c (Nielsen *et al.*, 2014). O SREBP1c é fator de transcrição que promove transcrição de genes lipogênicos como FAS, ACC e SDC1 (Stearoyl-CoA Desaturase 1) (Horton *et al.*, 2002; Csaki e Reue, 2010).

O estado de equilíbrio dos TAG hepáticos é também controlado pelo consumo de ácidos graxos pela  $\beta$ -oxidação mitocondrial (Eaton *et al.*, 1996). No estado pós-prandial a  $\beta$ -oxidação hepática é suprimida, ocorrendo devido ao efeito anti-lipolítico da insulina no tecido adiposo, reduzindo o fluxo de ácidos graxos não-esterificados para o fígado, e também devido ao controle direto da glicose e insulina sobre a taxa de entrada de ácidos graxos na mitocôndria (Sidossis *et al.*, 1996).

E no estado de jejum, o glucagon promove a oxidação dos ácidos graxos, através da expressão do receptor ativado por proliferador de peroxissomo  $\alpha$  (PPAR $\alpha$  – peroxisome proliferator-activated receptor alpha) (Longuet *et al.*, 2008). PPAR $\alpha$  é um receptor hormonal ativado por ácidos graxos que desenvolve um papel central na regulação transcricional do metabolismo de lipídios e glicídios (Mandard *et al.*, 2004).

Figura 4 – Mecanismos moleculares da esteatose hepática.



Legenda: A esteatose hepática resulta do aumento do influxo ou da diminuição do efluxo de lipídios. A principal fonte de ácidos graxos livres (AGL) é proveniente da lipólise aumentada do tecido adiposo, porém há outras fontes como a síntese de novos AGL a partir da glicose, pela lipogênese de novo (LDN) ou proveniente da dieta. O fígado descarta o AGL pela oxidação ou pela exportação através da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), ou estes podem ser armazenados nos hepatócitos na forma de triacilglicerol em gotículas lipídicas. AGL - ácidos graxos livres; LDN - lipogênese de novo; TAG - triacilglicerol; PPAR $\gamma$  - Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ; SREBP1c - Sterol regulatory element-binding protein 1c; FAS - fatty acid synthase; PPAR $\alpha$  - Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ .

Fonte: O autor

### 1.2.5 Estresse do retículo endoplasmático

O retículo endoplasmático (RE) é uma rede membranosa responsável pela síntese, maturação e tráfego de uma grande variedade de proteínas, pela homeostase do cálcio e desenvolve um papel importante no metabolismo de lipídios (Li *et al.*, 2018). Possui um papel regulador central de proteínas dobradas e controle de qualidade (Hotamisligil, 2010). E o RE pode ser visto como um “detector de nutrientes”(Hotamisligil, 2010).

As células do tecido adiposo e do fígado, metabolicamente ativas, são desafios a homeostase do RE, pois no fígado por exemplo, além de secretar

grandes quantidade de proteínas, também secretam lipoproteínas complexas (Hotamisligil, 2010).

Todas as proteínas que entram na via do RE são dobradas com o auxílio de chaperonas moleculares e então transportadas para o Complexo de Golgi. As proteínas desdobradas ou malformadas são retidas no RE, translocadas ao citoplasma e degradadas pelos proteassomas (Yoshida, 2007).

Desta forma, é de extrema importância que a homeostase do lúmen do RE seja mantida (Yoshida, 2007; Rasheva e Domingos, 2009). Sob condições que desafiam as funções do RE, como o aumento de novas sínteses de proteínas mal dobradas, o RE fica estressado e provoca uma resposta adaptativa conhecida como resposta a proteína mal-dobrada (UPR – unfolded protein response) (Ron e Walter, 2007; Hollien, 2013).

O monitoramento do lúmen do RE e a sinalização através da UPR são mediados por 3 proteínas associadas a membrana, a PERK (Fator 2 de iniciação eucariótica semelhante à PKR/ PKR-like eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$  kinase), IRE1 (inositol requerendo a enzima 1/ inositol requiring enzyme 1) e ATF6 (ativando o fator de transcrição 6/activating transcription factor – 6) (Hotamisligil, 2010; Li *et al.*, 2015).

Em um RE com o funcionamento normal e livre de estresse, estas 3 proteínas transmembranas são ligadas a uma chaperona BiP/GRP78 (proteína de ligação de imunoglobulina, também chamada proteína regulada por glicose 78/binding immunoglobulin protein, also called glucose-regulated protein 78), em seus domínios intraluminais, permanecendo inativos (Shen *et al.*, 2002). O acúmulo de proteínas mal-dobradas e aumento de carga proteica no RE resulta no recrutamento da BiP dissociando das 3 proteínas da UPR levando a ativação destas (Li *et al.*, 2015).

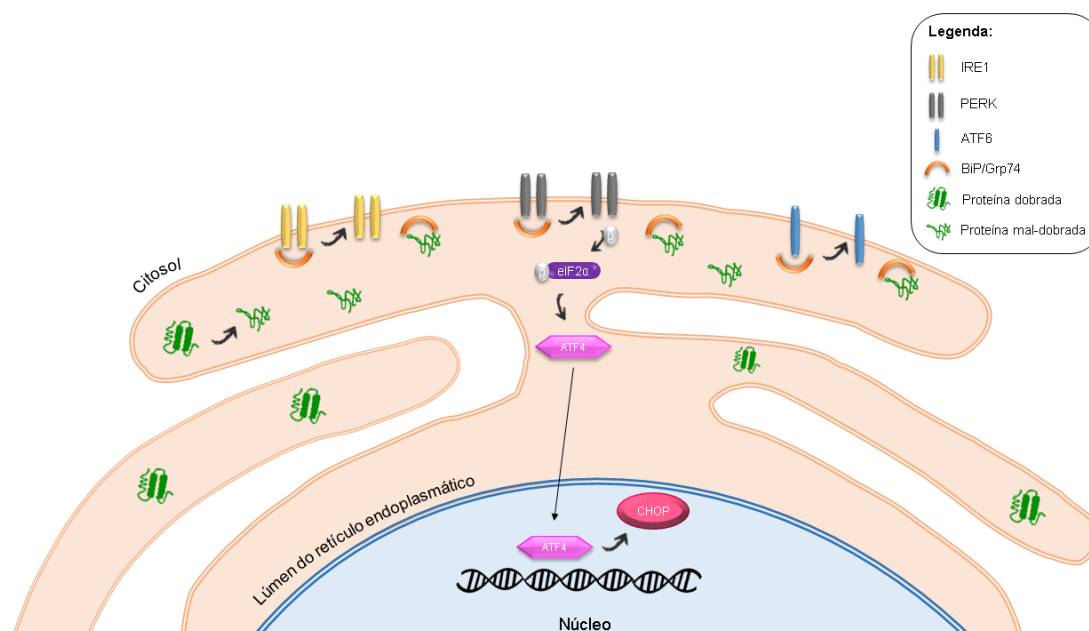
A via do PERK regula a lipogênese e a esteatose hepática (Li *et al.*, 2015). E a ativação da via da PERK resulta em fosforilação do eIF2 $\alpha$  (Fator de inibição translacional eucariótico 2  $\alpha$ /eukaryotic translational initiation factor 2 $\alpha$ ), na qual reduz a síntese proteica e subsequente redução da carga de trabalho do RE (Harding *et al.*, 1999).

O eIF2 $\alpha$  fosforilado ativa outro fator de transcrição, o ATF4 (fator de transcrição ativando o 4/activating transcription factor 4), que por sua vez induz a expressão de genes envolvidos na apoptose, como o CHOP (C/EBP Homologous Protein) (Ma *et al.*, 2002), pois retém o ciclo celular, o que resultará na morte celular

com o objetivo de proteger as células dos efeitos tóxicos desencadeados pela ação das proteínas desdobradas (Galligan *et al.*, 2012).

A ativação de CHOP pode resultar da ativação das 3 vias da UPR, entretanto, a ativação pelo ATF4 é considerado o principal indutor (Shore *et al.*, 2011). Em conjunto as 3 vias atenuam o estresse do RE pela redução da síntese de proteínas, facilitando a degradação de proteínas, e aumentando a produção de chaperonas que ajudam as proteínas no lúmen do RE a dobrarem. O resultado é que resolva o estresse do RE, e se não resolver, a célula estará comprometida funcionalmente e pode levar a apoptose (Hotamisligil, 2010).

Figura 5 – Estresse do retículo endoplasmático



Legenda: O retículo endoplasmático (RE) em resposta a presença de proteínas mal-dobradas recruta as proteínas BiP que estão ligadas as proteínas transmembranas da UPR (resposta a proteína mal-dobrada), quando livres a UPR ativa seus segundos mensageiros. IRE1 (inositol requerendo a enzima 1/ inositol requiring enzyme 1); PERK (Fator 2 de iniciação eucariótica semelhante à PKR); ATF6 (ativando o fator de transcrição 6); BiP (proteína de ligação de imunoglobulina); eIF2 $\alpha$  (Fator de inibição translacional eucariótico 2  $\alpha$ ); ATF4:

Fonte: O autor

### 1.3 Inibidores do SGLT2

As Gliflozinas são uma classe de fármacos usadas no controle do DM2 (Faillie, 2017), que agem inibindo a reabsorção da glicose nos rins e assim, diminuem a hiperglicemia. Esta nova classe é conhecida, como inibidores do SGLT2 (co-transportador de sódio e glicose 2), pois tem como alvo a inibição seletiva e competitiva (Grempler *et al.*, 2012) da proteína co-transportadora de sódio e glicose do tipo 2 (Chao, 2014). O mecanismo de ação dos inibidores do SGLT2 é independente da secreção ou ação da insulina (Vallon e Thomson, 2017).

Nesta nova classe três fármacos foram aprovadas pelo FDA (Food and drug administration) dos EUA, a dapagliflozina, canagliflozina e empagliflozina (Madaan *et al.*, 2016), mais recentemente a ertugliflozina. E também aprovados pela ANVISA desde 2013 dapagliflozina, canagliflozina e empagliflozina.

As fármacos foram desenvolvidas baseadas na estrutura da Florizina que é um inibidor de SGLT1 e SGLT2 natural (White, 2015), encontrado na raiz da casca, folhas, brotos e frutos da macieira, com alta afinidade pelo SGLT2 (Hummel *et al.*, 2011), e tem sido usado por mais de 100-150 anos para induzir glicosúria (Chasis *et al.*, 1933).

Como a glicose é um composto polar ela não pode ultrapassar as paredes dos néfrons, na qual são compostas de lipídios. Consequentemente, a glicose é reabsorvida pelos néfrons com ajuda de transportadores de glicose, utiliza ATP e cria um gradiente que ajuda no transporte de glicose (Madaan *et al.*, 2016). Isto ocorre, então, através do transporte ativo de glicose, realizado pelo SGLT através da bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase que está presente na membrana basolateral do túbulo contorcido proximal. A bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase extrai três íons  $\text{Na}^+$  do lúmen para o sangue e em troca traz dois íons  $\text{K}^+$ , Isto leva à formação de um gradiente de íons  $\text{Na}^+$  em negativo (Madaan *et al.*, 2016).

As proteínas SGLT empregam a energia gerada por este gradiente negativo, para transportar uma molécula de glicose (contra o gradiente de glicose ascendente) e um íon  $\text{Na}^+$  através da membrana apical do túbulo contorcido próximo (Madaan *et al.*, 2016). A glicose é então transferida para o sangue com a ajuda de transporte facilitado pelo transportador de glicose tipo 2 (GLUT2) e transportador de glicose tipo

1 (GLUT1) que estão presentes na membrana basolateral do túbulo contorcido proximal (Poudel, 2013).

Estudos do início dos anos de 1980, apresentaram 2 tipos diferentes de transportadores de glicose ao longo da superfície apical do túbulo proximal (Barfuss e Schafer, 1981; Turner e Moran, 1982), o SGLT1 e o SGLT2 (Wright *et al.*, 2011). Ainda que a sequência de aminoácidos do SGLT1 e SGLT2 seja similar, eles têm notáveis diferenças. O SGLT2 tem alta capacidade e baixa afinidade, enquanto o SGLT1 tem baixa capacidade e alta afinidade. O SGLT2 é responsável por reabsorção de 90% de glicose e o SGLT1 é responsável pelos 10% remanescentes. O primeiro é encontrado na parte inicial do túbulo contorcido proximal (segmento S1), enquanto o outro é encontrado na parte tardia do túbulo contorcido proximal (segmento S3) (Lee *et al.*, 2007).

Os glomérulos renais de indivíduos saudáveis normoglicêmicos filtram 140-160g de glicose por dia. De fato, mais de 99% da glicose filtrada é reabsorvida no túbulo contorcido proximal e retornado ao corpo ou usado pelo epitélio renal. Por causa da reabsorção de grandes quantidades de glicose filtrada, o rim contribui para homeostase glicêmica (Vallon e Thomson, 2017).

### 1.3.1 Empagliflozina

Empagliflozina (nome comercial: Jardiance, Boehringer Ingelheim) foi aprovado pela FDA dos EUA, em agosto de 2014, pela *European Medicines Agency* foi aprovada em maio de 2014 e pela ANVISA em julho de 2014. A dose recomendada da empagliflozina é de 10mg uma vez ao dia, e pode ter um aumento de 25mg uma vez ao dia (Madaan *et al.*, 2016). É um inibidor altamente seletivo e potente do SGLT2 (Grempler *et al.*, 2012), e o mais seletivo SGLT2 da classe. A meia vida é de aproximadamente 60 min, o que pode explicar uma prolongada inibição (Kakinuma *et al.*, 2010), foi o primeiro agente redutor de glicose a demonstrar uma redução nos eventos cardiovasculares em indivíduos com DM 2 e doença cardiovascular estabelecida, impulsionada por uma redução de 38% na morte cardiovascular quando comparado ao placebo, relatado em um grande ensaio clínico randomizado envolvendo 7020 indivíduos (Zinman *et al.*, 2015).

A empagliflozina é também tolerável em pacientes que sofrem em doenças crônicas renais (estágio 2 e 3) em presença do DM2. A frequência de eventos de hipoglicemia aumenta com pacientes com estágio 4, logo é contraindicado para esses pacientes com dano renal severo (Barnett *et al.*, 2014). O principal efeito colateral do inibidor SGLT2 foi o aumento do risco de infecções genitourinárias (Geerlings *et al.*, 2014). Assim, estas fármacos parecem ser cardioprotetoras em pacientes com DM2 e alto risco cardiovascular, enquanto tem somente um risco efeito colateral pequeno (Vallon e Thomson, 2017).

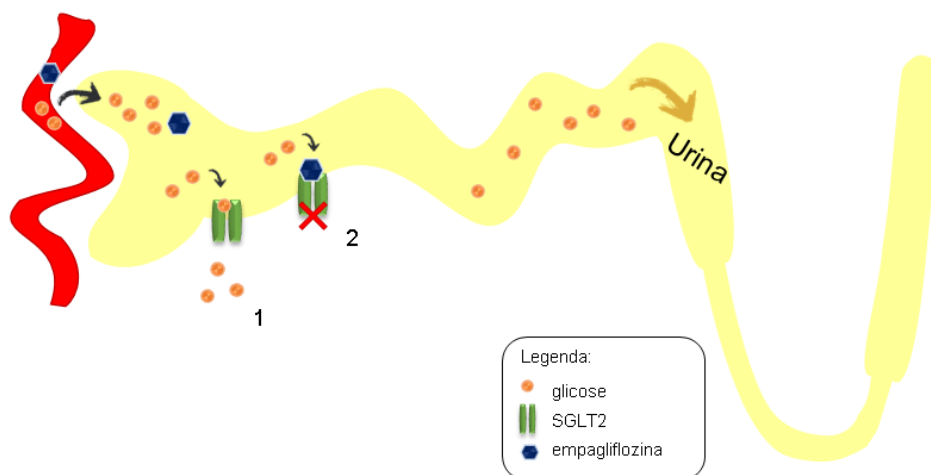
Uma explicação para os efeitos protetores cardiorrenais possível é um efeito pleiotrópico associado ao efeito de inibição do SGLT2, *i.e.* a indução de processos múltiplos que tem influência benéfica sinérgica nos sistemas cardiovasculares e renais (Vallon e Thomson, 2017). Por exemplo, no ensaio EMPA-REG OUTCOME, a empagliflozina foi associada com pequenas melhoras no controle da glicemia, na massa corporal, assim como na circunferência abdominal, concentrações de ácido úrico e pressão arterial sistólica e diastólica (Zinman *et al.*, 2015).

Um estudo piloto conduzido no Japão, está investigando outros efeitos pleiotrópicos da empagliflozina, agora, no conteúdo lipídico hepatocelular, metabolismo energético hepático e composição corporal em pacientes com DM2 ([ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov) número de registro NCT02637973). Em adição, aos dados sugerindo a melhora na redução de gordura visceral, além de melhora nas enzimas hepáticas séricas, diminuição de insulina e glicose (Neeland *et al.*, 2016; Sattar *et al.*, 2018).

Jojima e colaboradores demonstraram em seu estudo com um modelo experimental de DM2, que a empagliflozina preveniu a esteatohepatite, melhorou a esteatose hepática pela redução dos marcadores da lipogênese *de novo* e citocinas pró-inflamatórias (Jojima *et al.*, 2016). O tratamento com a empagliflozina em camundongos também foi capaz de melhorar, num tratamento preventivo, a adiposidade por perda calórica através da glicosúria e pelo aumento do gasto energético por estimulação da termogênese, atenuou a inflamação, a RI e a esteatose hepática (Xu *et al.*, 2017). Em um outro estudo com humanos a empagliflozina melhorou as enzimas hepáticas independente da redução da massa corporal e potencialmente reduziu a esteatose hepática (Sattar *et al.*, 2018).



Figura 6 – Mecanismo de ação da empagliflozina



Legenda: A glicose filtrada no glomérulo renal, no lúmen do túbulo contorcido proximal do néfron, é reabsorvida pelos SGLT2 (co-transportador de sódio e glicose). A empagliflozina inibe esse transportador levando a excreção da glicose, presente no

Fonte: O autor

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos pleiotrópicos hepáticos do tratamento com empagliflozina em camundongos C57Bl/6 alimentados com dieta hiperlipídica.

### 2.2 Objetivos específicos

- a) Induzir esteatose hepática e alterações metabólicas em camundongos C57Bl/6 através de dieta hiperlipídica e posteriormente tratar com a empagliflozina;
- b) Avaliar a Ingestão alimentar, massa corporal;
- c) Estudar o metabolismo de carboidratos, via TOTG, glicemia, insulina plasmática;
- d) Realizar análises bioquímicas plasmáticas;
- e) Analisar a morfologia hepática e e realizar quantificação estereológica;
- f) Imunofluorescência para marcadores de gotícula lipídica, o Plin2 e do estresse do retículo endoplasmático, o eIF2 $\alpha$ ;
- g) Avaliar as vias de lipogênese,  $\beta$ -oxidação, estresse do retículo endoplasmático no fígado através da expressão gênica.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Animais e dietas

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Animais da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (CEUA 031/2017), e os procedimentos ocorreram de acordo com as diretrizes de experimentação animal (NIH Publication No, 85-23, revisada em 1996). Camundongos C57Bl/6 machos foram mantidos em micro-isoladores em prateleiras ventiladas (sistemaNexgen, Allentown Inc., PA, EUA) e sob condições controladas diariamente, a  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , umidade 60%, ciclo 12h/12h claro/escuro, com acesso livre a comida e água.

Inicialmente, 40 camundongos C57Bl/6 machos com 3 meses de idade foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos (n=20, cada grupo) e receberam dietas diferentes ao longo de 10 semanas: dieta controle (C; 10% de energia a partir de lipídios) ou dieta rica em gordura (HF; 50% de energia de lipídios). As dietas foram preparadas pela PragSolucoes (Jau, Brasil). O conteúdo mineral e vitamínico das dietas foi idêntico e consistente com a recomendação do American Institute of Nutrition (AIN 93M). Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos (n=10 cada) para começar o tratamento com empagliflozina (Jardiance, Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, 10mg/kg/dia), ao longo de 5 semanas e a dose de empagliflozina foi acrescentada as dietas, como segue:

- a. Grupo controle – **C**; não tratado, alimentado com dieta controle;
- b. Controle+empagliflozina – **C-EMPA**; tratado com empagliflozina;
- c. Grupo hiperlipídico – **HL**; não tratado, alimentado com dieta HL;
- d. Grupo hiperlipídico+empagliflozina–**HL-EMPA**;tratado com empagliflozina,

As dietas, com exceção a composição de lipídio e carboidrato da dieta hiperlipídica, seguiram a recomendação do Instituto Americano de Nutrição (AIN-93) (Reeves *et al.*, 1993) e foram elaboradas pela Pragsoluções (Jaú, SP, Brasil), as composições dietéticas estão na tabela 1.

Tabela 1 - Composição das dietas

Nutrientes	Dietas	
	C	HL
<b>Caseína (<math>\geq</math> proteína 85%)</b>	140,0	175,0
<b>Amido de milho</b>	620,7	347,7
<b>Sacarose</b>	100,0	100,0
<b>Banha de porco</b>	---	238,0
<b>Óleo de soja</b>	40,0	40,0
<b>Fibras</b>	50,0	50,0
<b>Mix de vitaminas</b>	10,0	10,0
<b>Mix de minerais</b>	35,0	35,0
<b>Cisteína</b>	1,8	1,8
<b>Colina</b>	2,5	2,5
<b>Antioxidante</b>	0,008	0,060
<b>Total (g)</b>	1000	1000
<b>Energia (Kcal)</b>	3802,8	5000
<b>Carboidrato (% energia)</b>	76	36
<b>Proteínas (% energia)</b>	14	14
<b>Lipídios (% energia)</b>	10	50

### 3.2 Ingestão alimentar e massa corporal

A ingestão alimentar foi medida diariamente, calculada pela diferença entre a quantidade de alimento oferecido pela quantidade restante após 24 horas, apresentadas em grama (g) por animal. A massa corporal (MC) foi medida uma vez por semana em uma balança de precisão (modelo B320H, Shimadzu, Brasil).

### 3.3 Glicose urinária

Os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas por 24h para coletar a urina e realizar a medição. A glicose urinária foi detectada com tiras reagentes de glicose (Alamar, SP, Brasil),

### 3.4 Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG)

O TOTG foi analisado antes e após o tratamento em animais em jejum por 6 h. Os camundongos receberam 1 g de glicose/kg, e essa sobrecarga de glicose foi administrados via gavagem orogástrica (25% em solução salina estéril, 0,9% NaCl) e, em seguida, o sangue foi coletado da veia da cauda aos 0, 15, 30, 60 e 120 minutos e com um glicosímetro foi medida a concentração da glicose no sangue (Accu-check, Roche Diagnostics). A comparação entre grupos baseou-se na área sob a curva (versão Prism 7,0 para Windows; Software GraphPad, La Jolla CA, EUA). O tempo 0 minutos foi considerado a glicemia de jejum.

### 3.5 Análise da Insulina Plasmática e QUICKI

A concentração plasmática de insulina foi medida por ELISA (Ensaio de imunoabsorção enzimática) utilizando um kit comercial (Cat, #EZRMI-13K, Milipore, Missouri, EUA) com o equipamento TPReader Termoplate (Tek Instruments Inc. Highland Park, EUA). Para o cálculo do QUICKI (índice quantitativo de sensibilidade à insulina), foi utilizada a fórmula,  $QUICKI = 1/[\log(I_0) + \log(G_0)]$ , onde  $I_0$  é a insulina em jejum ( $\mu\text{U/mL}$ ), e  $G_0$  é a glicemia em jejum ( $\text{mg/dL}$ ) (Katz *et al.*, 2000).

### 3.6 Temperatura corporal

A temperatura corporal, termografia, foi medida no animal consciente à temperatura ambiente com uma câmera infravermelha FLIR C2 (FLIR Systems, Wilsonville, Oregon, EUA).

### 3.7 Calorimetria Indireta

O metabolismo respiratório foi avaliado o pela calorimetria indireta, que mede a troca respiratória utilizando o sistema *Oxylet Apparatus* (Panlab/Harvard, Barcelona, Espanha) projetada para o monitoramento contínuo de camundongos com acesso livre aos alimentos e à água. Os dados foram coletados por 48h, contudo as primeiras 24h foram utilizadas com um período de aclimação. Então, foi medido o

substrato metabólico pelo consumo de oxigênio ( $VO_2$ ) e a produção de dióxido de carbono ( $VCO_2$ ), que é apresentado pela razão do  $VCO_2$  pelo  $VO_2$ , para geração dos dados do gasto energético.

### **3.8 Morte dos animais**

Após cinco semanas de tratamento, os animais jejuaram durante a noite e foram profundamente anestesiados com Ketamina (240 mg/kg) e Xilazina (30 mg/kg) por via intraperitoneal. O sangue foi coletado por punção cardíaca e centrifugado em temperatura ambiente para obter plasma (120 x g durante 15 min), que foi armazenado individualmente a  $-80^\circ\text{C}$ , para posteriores análises.

### **3.9 Bioquímica plasmática**

O colesterol total e TAG plasmáticos foram quantificados pelo método colorimétrico enzimático, utilizando um espectrofotômetro automático e kits comerciais (Bioclin System II, Quibasa Ltda. Belo Horizonte, MG, Brasil).

### **3.10 Índice de Adiposidade**

Após a eutanásia dos animais, as gorduras inguinal, epididimária e retroperitoneal foram cuidadosamente dissecadas e pesadas. Foi considerado o compartimento adiposo inguinal, localizado entre a parte inferior da caixa torácica e o meio da coxa, a gordura retroperitoneal conectada à parede abdominal posterior próxima aos rins e a porção abdominal dos ureteres e a gordura epididimária localizada na parte inferior do abdômen e conectada ao epidídimo. O cálculo do índice de adiposidade foi determinado como a razão entre a soma das massas dos tecidos adiposos e dividida pela massa corporal total, apresentada em porcentagem.

### **3.11 Fígado**

O fígado foi dissecado, pesado e fragmentos de todos os lobos foram coletados e fixados por 48 horas (formaldeído a 4% w/v, 0,1M de tampão fosfato, pH

7,2). Alternativamente, outras amostras foram congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para análises moleculares. Os fragmentos foram incorporados no Paraplast Plus (Sigma-Aldrich, St, Louis, MO, EUA), e seccionados em uma espessura de  $3\mu\text{m}$  e corados com hematoxilina-eosina. Algumas secções de tecido foram utilizadas para realizar a imunofluorescência, detalhada abaixo. Imagens digitais foram tiradas com um microscópio BX51 (Olympus, Tóquio; Japão) e uma câmera Infinity 1-5c (Lumenera, Ottawa, Canadá).

A densidade de volume de esteatose no fígado (Vv [esteatose hepática]) foi avaliada pela contagem de pontos em pelo menos 10 campos aleatórios por animal, como descrito anteriormente (Aguila *et al.*, 2003). Resumidamente, um quadro com 36 pontos de teste foi sobreposta a imagens microscópicas digitais do fígado. O Vv [esteatose hepática] foi obtida como a razão entre os pontos que atingem as gotas de gordura (Pp [esteatose, fígado]) e os pontos totais do sistema (PT):  $\text{Vv [esteatose, fígado]} = \text{Pp [esteatose hepática]} / \text{PT}$  (Mandarim-de-Lacerda, 2003). O método provou ser mais consistente na avaliação da esteatose hepática do que uso de pontuações (Catta-Preta *et al.*, 2011).

Para quantificação do triglicérides hepáticos, foi utilizado o fígado armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  e o método enzimático colorimétrico usando um espectrofotômetro automático e kits comerciais (Bioclin System II, Quibasa Ltda, Belo Horizonte, MG, Brasil).

### 3.12 Imunofluorescência

Secções desparafinizadas hidratadas do fígado sofreram recuperação antigênica usando tampão citrato a pH 6,0, em seguida, bloqueadas com glicina a 2% e PBS/BSA a 5%. Secções de controle foram obtidas por omissão do anticorpo primário. As secções foram incubadas com eIF2 $\alpha$  (AHO1182, diluição 1:100, Termofischer) e Plin 2 (CSB-PA920084; diluição 1: 100, Cusabio) diluído em PBS/BSA 1% por 2 horas. Posteriormente, as amostras foram incubadas com anticorpo secundário anti-*rabbit* conjugado ao fluoróforo Alexa 546 para eIF2 $\alpha$  e de anti-coelho conjugado ao fluoróforo Alexa 488 para Plin2, seguida de coloração dos núcleos com DAPI. As lamínulas foram montadas com SlowFade (Invitrogen, CA, EUA) para manter a fluorescência. Todos os procedimentos foram realizados de

acordo com as instruções do fabricante. O microscópio confocal de laser C2 (Nikon Inc., Tóquio) foi utilizado para avaliar os resultados.

### 3.13 RT-qPCR (Transcriptase reversa-PCR quantitativo)

O RT-qPCR foi realizado para detectar a expressão do mRNA de genes relacionados ao metabolismo lipídico hepático de camundongos. O RNA total do fígado foi extraído usando Trizol (Invitrogen, CA, EUA). A concentração de mRNA foi determinada por espectroscopia usando o equipamento NanoVue (GE Life Sciences), 1µg de RNA foi aliquoteado e a DNAase (Invitrogen) foi adicionado. O cDNA foi sintetizado utilizando iniciadores Oligo (dT) e transcriptase reversa Superscript III (Invitrogen, CA, EUA). O PCR foi realizado usando o termociclador Biorad CFX96 e SYBR Green (Invitrogen, CA, EUA). O gene da  $\beta$ -actina foi usado como um controle endógeno para corrigir a expressão dos genes alvo. A eficiência da corrida dos genes alvo e do gene endógeno foi aproximadamente igual, sendo calculada por diluições seriadas do cDNA. As reações de PCR foram realizadas seguindo um programa de desnaturação e ativação da polimerase (4 min a 95°C), com 44 ciclos, cada um consistindo de 95°C por 10s e 60°C por 15s, seguido por uma curva de fusão (60-95°C, com uma taxa de aquecimento de 0,1°C/s). Os controlos negativos consistiram em que o cDNA foi substituído por água desionizada. A relação de expressão relativa de mRNA foi calculada pela equação  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , onde CT expressa a diferença entre o número de ciclos dos genes alvo e o controle endógeno. Os iniciadores foram projetados usando o software on-line Primer3 web versão 4,0,0. Sequências de iniciadores sentido e antisentido utilizadas para amplificação são descritas na tabela 2.

### 3.14 Análise de dados

A distribuição normal e a homocedasticidade foram testadas quanto a diferenças nos dados quantitativos. Para analisar os dois grupos durante o pré-tratamento, foi usado o teste T-Student. Para análise dos quatro grupos durante o tratamento, adotou-se o teste ANOVA de um fator com pós-teste de Holm-Sidak (Graph Pad Prism, versão 7, CA, EUA). Os resultados foram apresentados como



média  $\pm$  desvio padrão e valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

Tabela 2 - Sequência dos iniciadores senso e antisenso do RT-qPCR

<b>Genes</b>	<b>5' à 3'</b>	<b>3' à 5'</b>
B-actina	TGTTACCAACTGGGACGACA	GGGGTGTGGAAGGTCTCAA
SREBP1c	AGCAGCCCCTAGAACAAACA	TCTGCCTTGATGAAGTGTGG
FAS	TCGAGGAAGGCACTACACCT	CACCCACTGGAAGCTGGTAT
PPAR $\gamma$	CACAATGCCATCAGGTTTGG	GCTGGTCGATATCACTGGAGATC
PPAR $\alpha$	CAAGGCCTCAGGGTACCACTAC	GCCGAATAGTTCGCCGAAA
PLIN2	AATATGCACAGTGCCAACCA	CGATGCTTCTCTTCCACTCC
FSP27/CIDEC	AGCTAGCCCTTTCCAGAAG	TAGAGGGTTGCCTTCACGTT
ATF4	CCGAGATGAGCTTCCTGAAC	ACCCATGAGGTTTCAAGTGC
CHOP	CTGCCTTTCACCTTGGAGAC	CGTTTCCTGGGGATGAGATA
GADD45	GCGAGAACGACATCAACATC	GTTCGTCACCAGCACACAGT

Legendas: Sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP-1c), Fatty acid synthase (FAS), Peroxisome Proliferator Activated Receptors (PPAR), Pirilipin 2 (PLIN2), fatty specific protein 27 (Fsp27)/cell death-inducing DFFA-like effector c (CIDEC), activating transcription factor 4 (ATF4), CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein (CHOP), growth arrestand DNA damage-inducible gene 45 (*GADD45*).

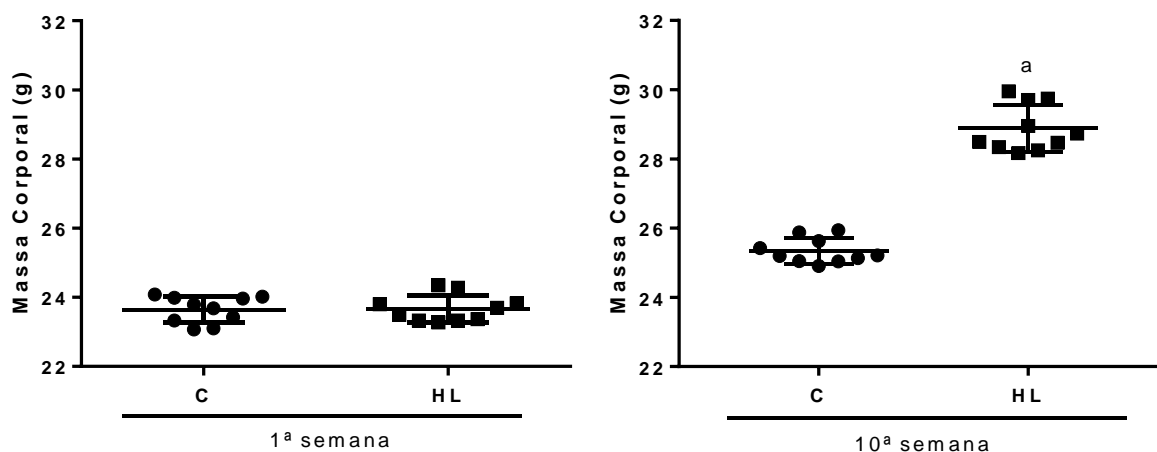
## 4 RESULTADOS

### Pré-tratamento

#### 4.1 Massa corporal (MC)

Os grupos HL e C iniciaram o estudo sem diferença significativa na MC entre si ( $p=0,4828$ ), os dados estão apresentados na figura 7. Ao final da décima semana de experimento a MC do grupo HL apresentou aumento significativo em comparação ao grupo C (+ 11%,  $p<0,0001$ ).

Figura 7 – Massa corporal período de pré-tratamento



Legenda: C – Grupo controle; HL – Grupo hiperlipídico. Análise estatística pelo Teste t-Student considerando significativo  $p<0,05$ . Diferenças apresentadas como:  $a \neq C$ .

#### 4.2 Ingestão alimentar

A ingestão alimentar, iniciou sem diferença estatística entre o grupo HL em relação ao grupo C, no entanto, a partir da segunda semana o grupo HL apresentou uma diminuição da ingestão que persistiu até a 10ª semana, apresentando uma diminuição de -14% em relação ao grupo C ( $p<0,0001$ ), tabela 3.

Tabela 3 - Ingestão alimentar

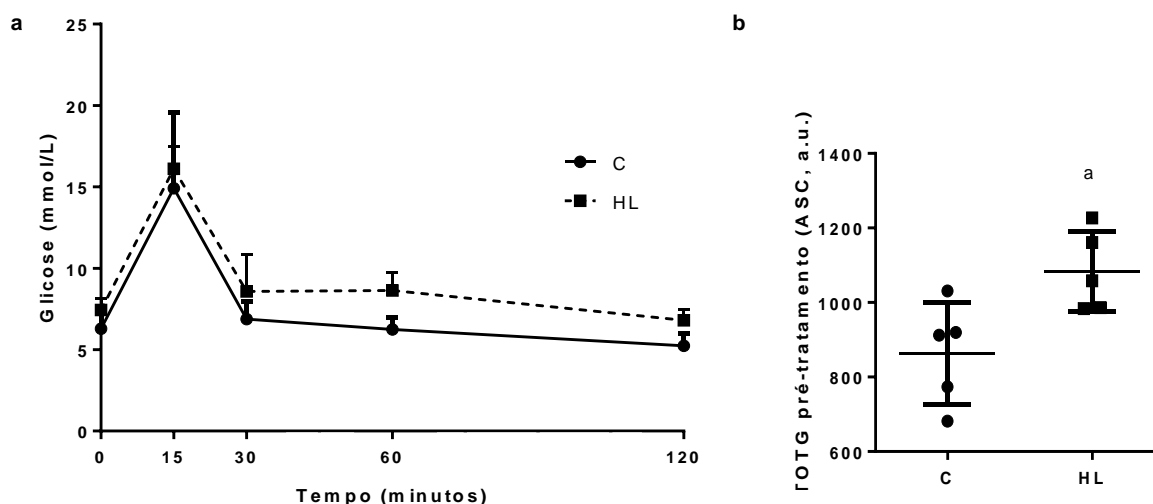
Pré-tratamento	C	C-EMPA	HL	HL-EMPA
Ingestão alimentar (g/dia/animal)				
1ª semana	2,68±0,42	-----	2,52±0,43	-----
10ª semana	2,46±0,18	-----	2,12±0,35 a	-----
<b>Pós-tratamento</b>				
15ª semana	2,50±0,08	2,53±0,02	2,18±0,13 a	2,43±0,07 c

Legenda: C – Grupo controle; C-EMPA - controle+empagliflozina; HL – hiperlipídico; HL-EMPA – hiperlipídico+empagliflozina. Análise estatística no período de pré-tratamento realizado teste t-Student e no período de tratamento usado teste ANOVA de um fator e pós-teste de Holm-Sidak e considerando significativo  $p < 0,05$ . Diferenças apresentadas como:

#### 4.3 Teste de tolerância oral à glicose (TOTG)

O TOTG realizado no final do pré-tratamento mostrou que a ingestão da dieta HL causou intolerância à glicose nos animais do grupo HL, quando comparado ao grupo C, demonstrado com maior área sob a curva (ASC) (+25%,  $p = 0,0225$ ), mostrando um atraso no restabelecimento da glicose após sobrecarga (figura 8).

Figura 8 – Teste de tolerância à glicose no período de pré-tratamento



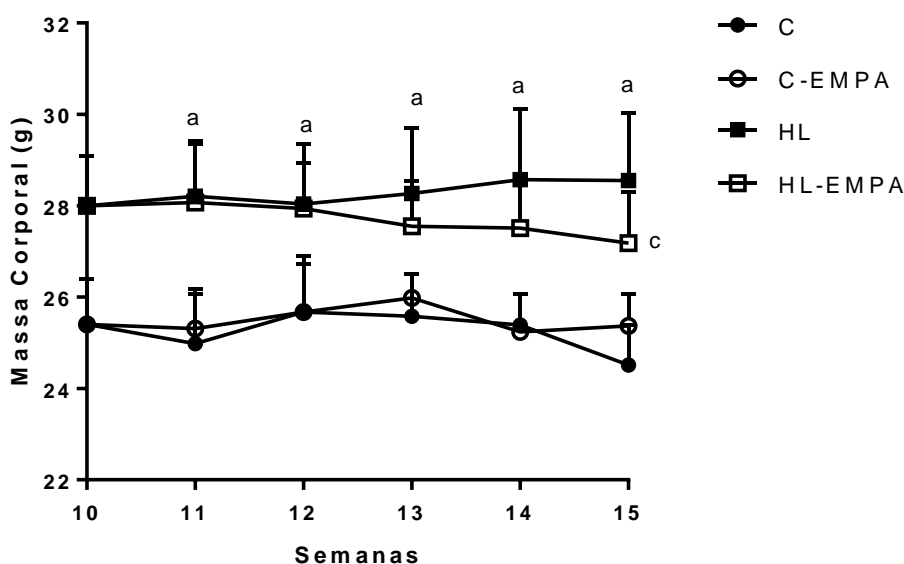
Legenda: a - Gráfico de evolução da glicose plasmática de acordo com os tempos 0, 15, 30, 60, 120; b - Gráfico da área sob a curva. Legenda: C – Grupo controle; HL – Grupo hiperlipídico. Análise estatística pelo Teste t-Student considerando significativo  $p < 0,05$ .

## Pós – tratamento

### 4.4 Massa corporal (MC)

O grupo HL permaneceu com o aumento de MC em comparação com o grupo C no final do estudo (+17%,  $p < 0,0001$ ). Entretanto, o grupo HL-EMPA mostrou redução significativa em torno de -5% da MC quando comparado ao grupo HL ( $p=0,016$ ) (figura 9). O grupo C-EMPA não apresentou diferença quando comparado ao grupo C ( $p=0,0852$ ).

Figura 9 – Massa corporal no período de tratamento



Legenda: C – Grupo controle; C-EMPA - controle+empagliflozina; HL – hiperlipídico; HL-EMPA – hiperlipídico+empagliflozina. Análise estatística por ANOVA de um fator e pós-teste de Holm-Sidak e considerando significativo  $p < 0,05$ . Diferenças apresentadas como:  $a \neq C$ ;

### 4.5 Ingestão alimentar

O grupo HL comparado ao grupo C mostrou uma diminuição de -16%, ( $p < 0,0001$ ), enquanto o grupo HL-EMPA apresentou aumento em relação ao grupo HL (+12%,  $p < 0,0001$ ), apresentado na tabela 3. A ingestão alimentar (g) entre os grupos C-EMPA e C não mostrou diferença significativa ( $p=0,8421$ ).

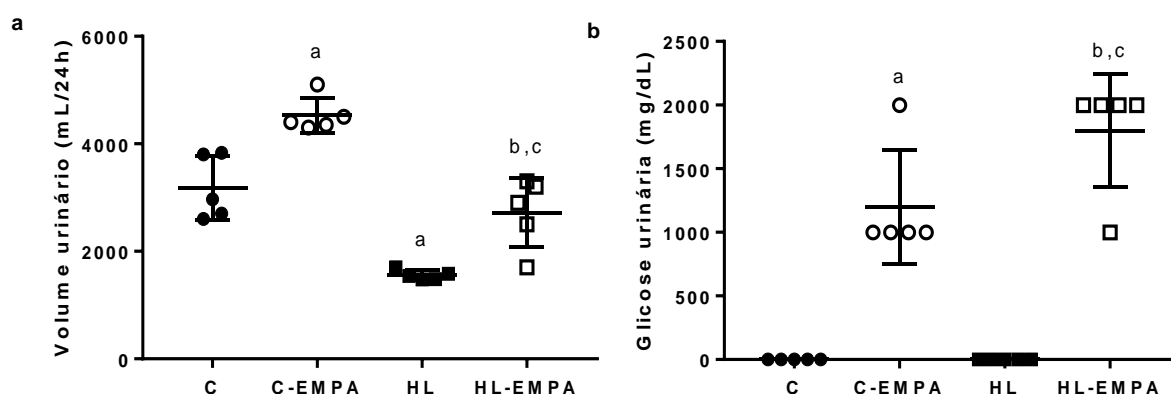
#### 4.6 Volume urinário

A empaglifozina induziu um aumento do volume urinário nos grupos tratados, HL-EMPA (+43%,  $p = 0,0010$ ) e C-EMPA (+75%,  $p = 0,0026$ ) em comparação aos seus grupos homólogos, HL e C, respectivamente (figura 10a).

#### 4.7 Glicose urinária

Nos grupos HL e C não foi observada presença de glicose urinária, porém nos grupos tratados foi observado a presença de glicose, uma vez que é o principal mecanismo de ação da empaglifozina, e apresentou-se estatisticamente significativo com  $p < 0,0001$ , em ambos os grupos HL-EMPA e C-EMPA (figura 10b).

Figura 10 – Parâmetros urinários



Legenda: C – Grupo controle; CE- controle+empaglifozina; HL – hiperlipídico; HL-EMPA – hiperlipídico+empaglifozina. Análise estatística por ANOVA de um fator e pós-teste de Holm-Sidak e considerando significativo  $p < 0,05$ . Diferenças apresentadas como:  $a \neq C$ ;

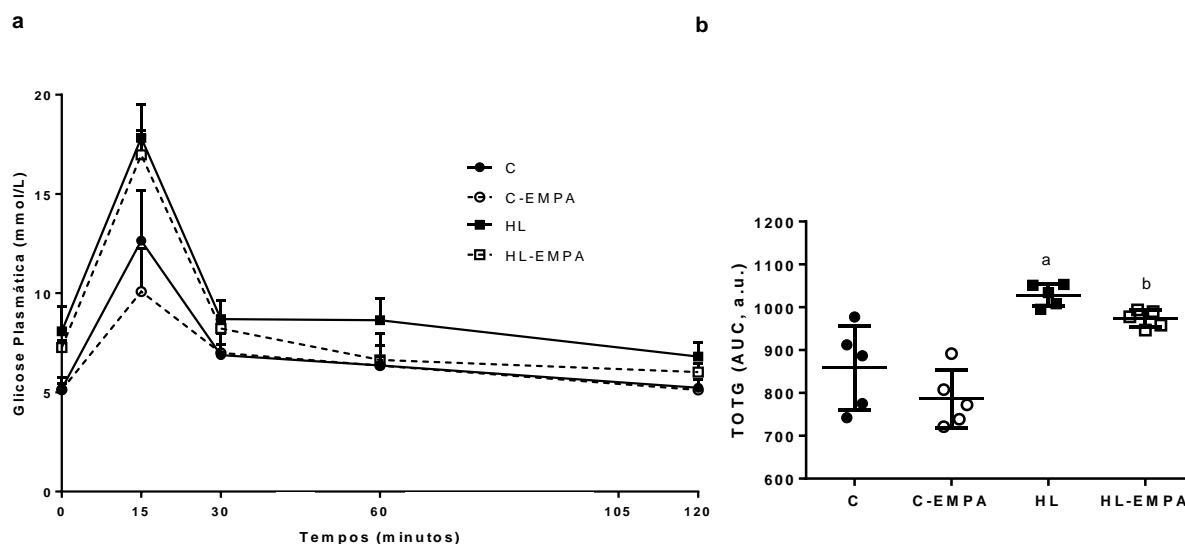
#### 4.8 Metabolismo dos Carboidratos

##### 4.8.1 Teste de tolerância oral à glicose (TOTG)

O grupo HL apresentou maior intolerância à glicose quando comparado ao grupo C (+20%,  $p = 0,0020$ ). Contudo, no grupo HL-EMPA foi observada melhora na

tolerância à glicose em comparação com o grupo HL (-5%,  $p = 0,0056$ ). Os grupos C-EMPA e C não apresentaram diferença significativa entre si ( $p=0,157$ ), como visto nas figuras abaixo.

Figura 11 – Teste oral de tolerância à glicose no período de tratamento

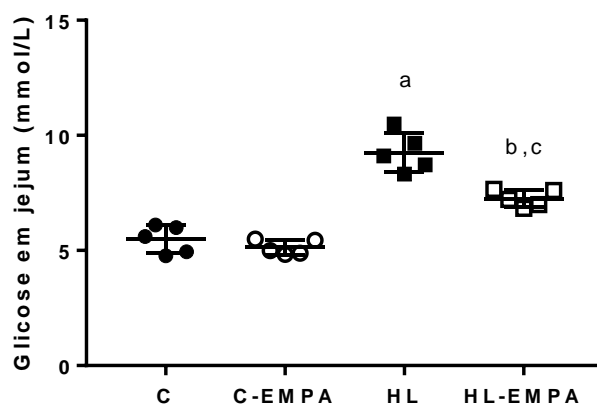


Legenda: a - Gráfico de evolução da glicose plasmática de acordo com os tempos 0, 15, 30, 60, 120; b - Gráfico da área sob a curva. C – Grupo controle; C-EMPA - controle+empagliflozina; HL – hiperlipídico; HL-EMPA – hiperlipídico+empagliflozina. Análise estatística por ANOVA de um fator e pós-teste de Holm-Sidak e considerando significativo  $p < 0,05$ . Diferenças apresentadas como: a $\neq$ C; b $\neq$ C-EMPA; c $\neq$ HL.

#### 4.8.2 Glicemia de jejum

O grupo HL apresentou aumento da glicose plasmática em jejum em torno de +69% quando comparado ao grupo C ( $p < 0,0001$ ), na figura 12. Houve melhora no grupo HL-EMPA quando comparado ao grupo HL (-22%,  $p = 0,0047$ ), nos grupos C-EMPA e C não houve diferença estatística entre eles ( $p = 0,3422$ ).

Figura 12 – Glicose em jejum

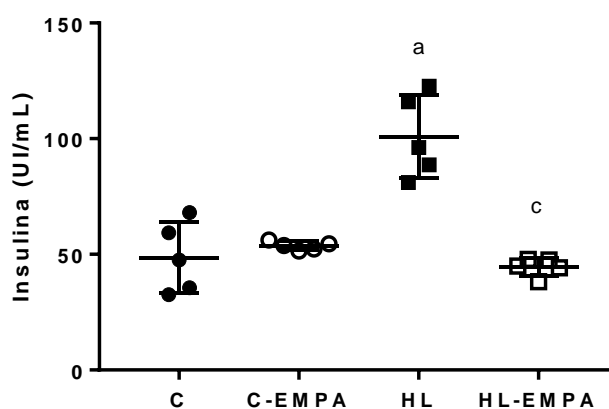


Legenda: C – Grupo controle; C-EMPA - controle+empagliflozina; HL – hiperlipídico; HL-EMPA – hiperlipídico+empagliflozina. Análise estatística por ANOVA de um fator e pós-teste de Holm-Sidak e considerando significativo  $p < 0,05$ . Diferenças apresentadas como:  $a \neq C$ ;

#### 4.8.3 Insulina plasmática

A concentração plasmática de insulina, apresentada na figura 13, no grupo HL foi +107% maior em comparação ao grupo C ( $p < 0,0001$ ). O grupo HL-EMPA mostrou redução de -56% comparado ao grupo HL ( $p < 0,0001$ ). Os grupos C-EMPA e C não apresentaram diferença significativa entre si ( $p = 0,7620$ ).

Figura 13 – Insulina plasmática



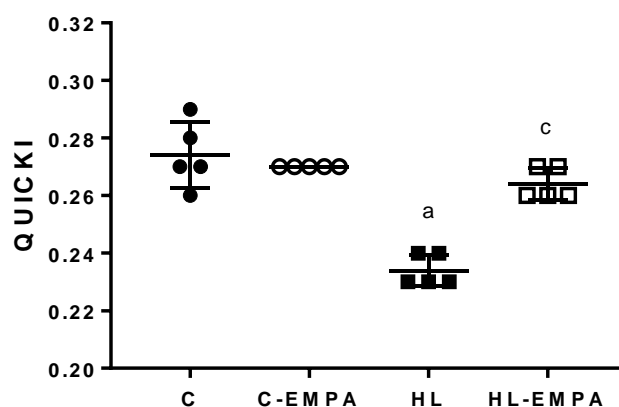
Legenda: C – Grupo controle; C-EMPA- controle+empagliflozina; HL – hiperlipídico; HL-EMPA – hiperlipídico+empagliflozina. Análise estatística por ANOVA de um fator e pós-teste de Holm-Sidak e considerando significativo  $p < 0,05$ . Diferenças apresentadas como:  $a \neq C$ ;



#### 4.8.4 QUICKI

O QUICKI foi realizado nos grupos experimentais para detectar a sensibilidade à insulina (Figura 14). O grupo HL apresentou uma redução na sensibilidade à insulina em comparação com C (-5%,  $p<0,0001$ ). O grupo HL-EMPA mostrou uma melhora na sensibilidade à insulina quando comparado com o grupo de HL (+13%,  $p<0,0001$ ). Não houve diferença significativa entre os grupos C-EMPA e C ( $p=0,3724$ ).

Figura 14 – Índice quantitativo de sensibilidade à insulina

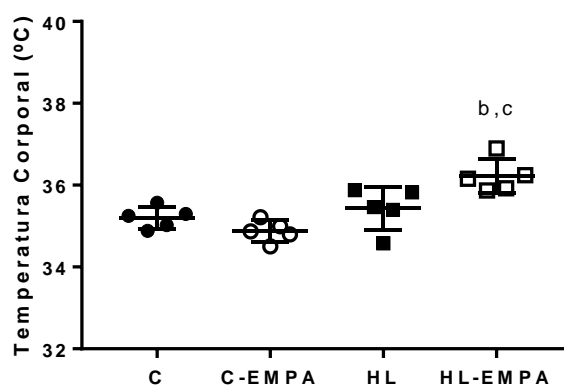
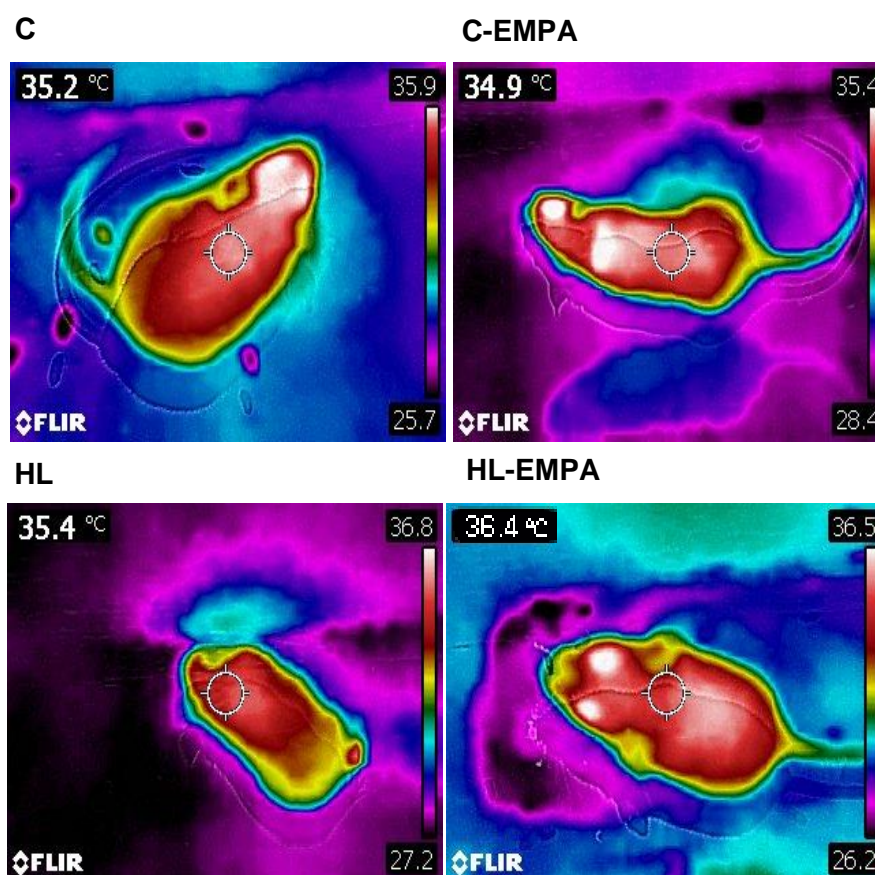


Legenda: C – Grupo controle; C-EMPA - controle+empagliflozina; HL – hiperlipídico; HL-EMPA – hiperlipídico+empagliflozina. Análise estatística por ANOVA de um fator e pós-teste de Holm-Sidak e considerando significativo  $p<0,05$ . Diferenças apresentadas como:  $a\neq C$ ;

#### 4.9 Temperatura corporal

Um aumento na temperatura corporal foi observado no grupo HL-EMPA em comparação com o grupo HL de +2% ( $p=0,0188$ ). Não houve diferença significativa na temperatura corporal entre os grupos C-EMPA e C ( $p=0,3494$ ), figura 15.

Figura 15 – Temperatura corporal



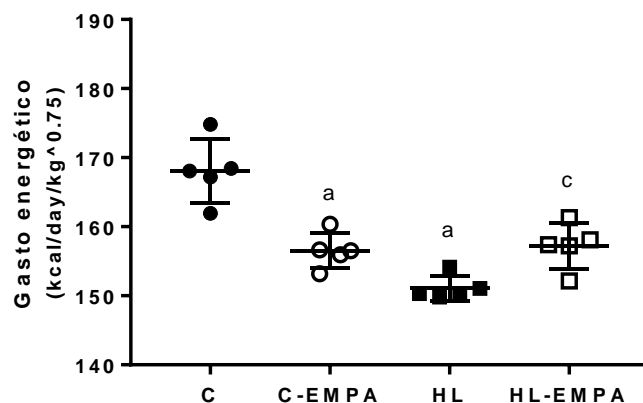
Legenda: C – Grupo controle; C-EMPA - controle+empagliflozina; HL – hiperlipídico; HL-EMPA – hiperlipídico+empagliflozina. Análise estatística por ANOVA de um fator e pós-teste de Holm-Sidak e considerando significativo  $p < 0,05$ . Diferenças apresentadas como:  $a \neq C$ ;

#### 4.10 Gasto energético

Na figura 16b, foi observado uma redução no gasto energético do grupo HL quando comparado ao grupo C (-10%,  $p < 0,0001$ ), porém o grupo HL-EMPA apresentou um aumento significativo de +4% em relação ao grupo HL ( $p = 0,0240$ ).

Em adição, o grupo C-EMPA apresentou uma diminuição em relação ao grupo C (-7%,  $p=0,0002$ ).

Figura 16 – Calorimetria indireta



Legenda: a – Quociente respiratório e em b- Gasto energético. C – Grupo controle; C-EMPA - controle+empagliflozina; HL – hiperlipídico; HL-EMPA – hiperlipídico+empagliflozina. Análise estatística por ANOVA de um fator e pós-teste de Holm-Sidak e considerando

## 4.11 Bioquímica plasmática

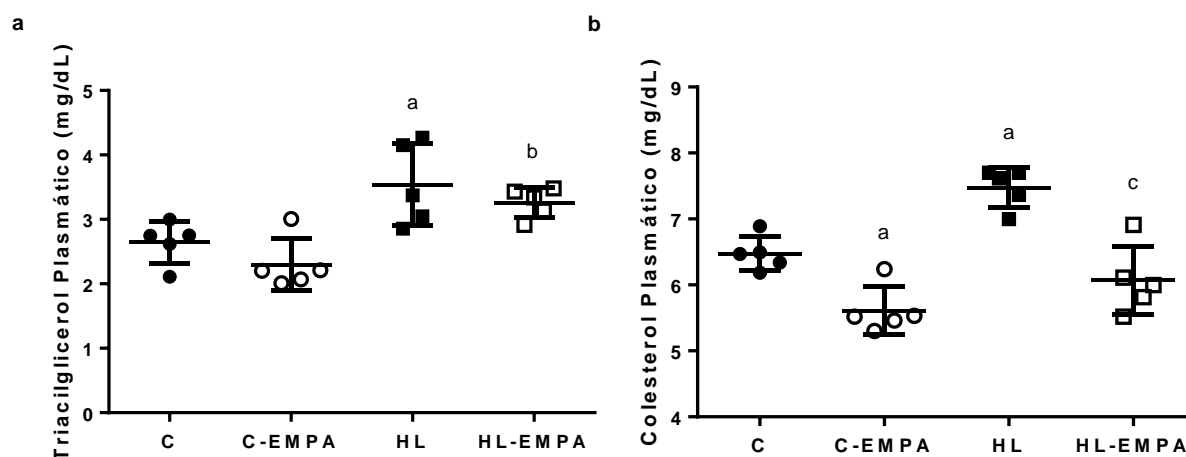
### 4.11.1 Triacilglicerol plasmático

O grupo HL apresentou um aumento significativo de +34% dos TAG ( $p=0,0181$ ) em relação ao grupo C, apresentado na figura 17a. Por outro lado, o grupo HL-EMPA não apresentou diferença em relação ao grupo HL ( $p=0.3945$ ), assim como os grupos C-EMPA e C ( $p=0.3945$ ).

### 4.11.2 Colesterol total plasmático

As concentrações de colesterol total plasmático são apresentadas na figura 17b, o grupo HL apresentou aumento de +15% no CT em comparação ao grupo C ( $p=0,0026$ ), contudo as concentrações estavam diminuídas nos grupos tratados, tanto no grupo C-EMPA (-13%,  $p=0,0064$ ) quanto no HL-EMPA (-19%,  $p<0,0001$ ) em comparação com suas contrapartes.

Figura 17 – Bioquímica plasmática



Legenda: a- Triacilglicerol plasmático e em b- Colesterol total plasmático C – Grupo controle; C-EMPA - controle+empagliflozina; HL – hiperlipídico; HL-EMPA – hiperlipídico+empagliflozina. Análise estatística por ANOVA de um fator e pós-teste de Holm-Sidak e considerando significativo  $p < 0,05$ . Diferenças apresentadas como: a $\neq$ C; b $\neq$ C-EMPA; c $\neq$ HL

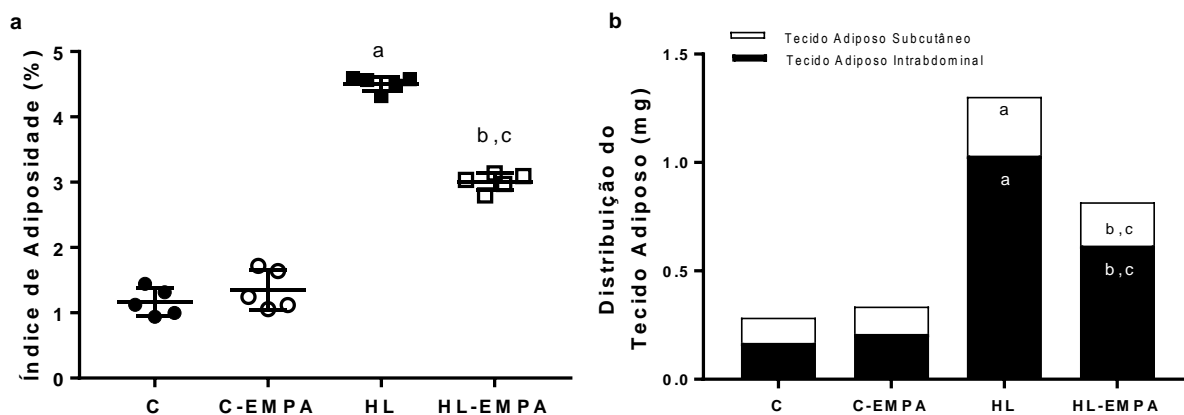
#### 4.12 Índice de adiposidade e distribuição do tecido adiposo

O grupo HL apresentou índice de adiposidade maior quando comparado ao grupo C (+289%,  $p < 0,0001$ ), na figura 18a. Em contrapartida, houve uma diminuição desse índice no grupo HL-EMPA comparado ao grupo HL (-33%,  $p < 0,0001$ ).

No gráfico de distribuição do tecido adiposo (Figura 18b) os compartimentos de tecido adiposo estão apresentados de acordo com a distribuição intrabdominal (reserva metabolicamente mais prejudicial) e subcutânea (menos prejudicial). A distribuição intraabdominal é composta pelos compartimentos de tecido adiposo epididimário e retroperitoneal, enquanto o compartimento subcutâneo pelo tecido adiposo inguinal. No grupo HL foi observado aumento significativo dessa deposição intrabdominal, comparado ao grupo C (+515%,  $p < 0,0001$ ) e o tratamento foi capaz em diminuir a gordura intrabdominal no grupo HL-EMPA comparado ao grupo HL (-40%,  $p < 0,0001$ ). Em relação a gordura subcutânea, o grupo HL comparado ao grupo C houve um aumento dessa massa em +134% ( $p < 0,0001$ ), em quanto que no grupo HL-EMPA houve uma diminuição de -28% comparado ao grupo HL ( $p < 0,0001$ ). A distribuição de gordura intrabdominal e subcutânea no grupo C-EMPA comparado

ao grupo C não apresentaram diferença estatística ( $p=0,271$ ;  $p=0,5953$ , respectivamente).

Figura 18 – Parâmetros do tecido adiposo



Legenda: Na figura a, índice de Adiposidade e em b, Distribuição de Tecido Adiposo. C-Control; C-EMPA - Controle-Empagliflozina; HL-Hiperlipídico; HL-EMPA -Hiperlipídico-Empagliflozina.  $a \neq C$ ;  $b \neq C$ -EMPA;  $c \neq HL$ . Análisiso por ANOVA de um fator e pós teste de Holm-Sidak. Diferença estatística  $p < 0,05$ .

#### 4.13 Parâmetros hepáticos

##### 4.13.1 Massa do fígado

A massa hepática, apresentada na figura 19b, foi maior no grupo HL quando comparado ao grupo C (+14%,  $p < 0,0001$ ), porém no grupo HL-EMPA houve redução significativa de -6% em relação ao grupo HL ( $p = 0,0294$ ), e não houve diferença entre os grupo C-EMPA e C ( $p = 0,1833$ ).

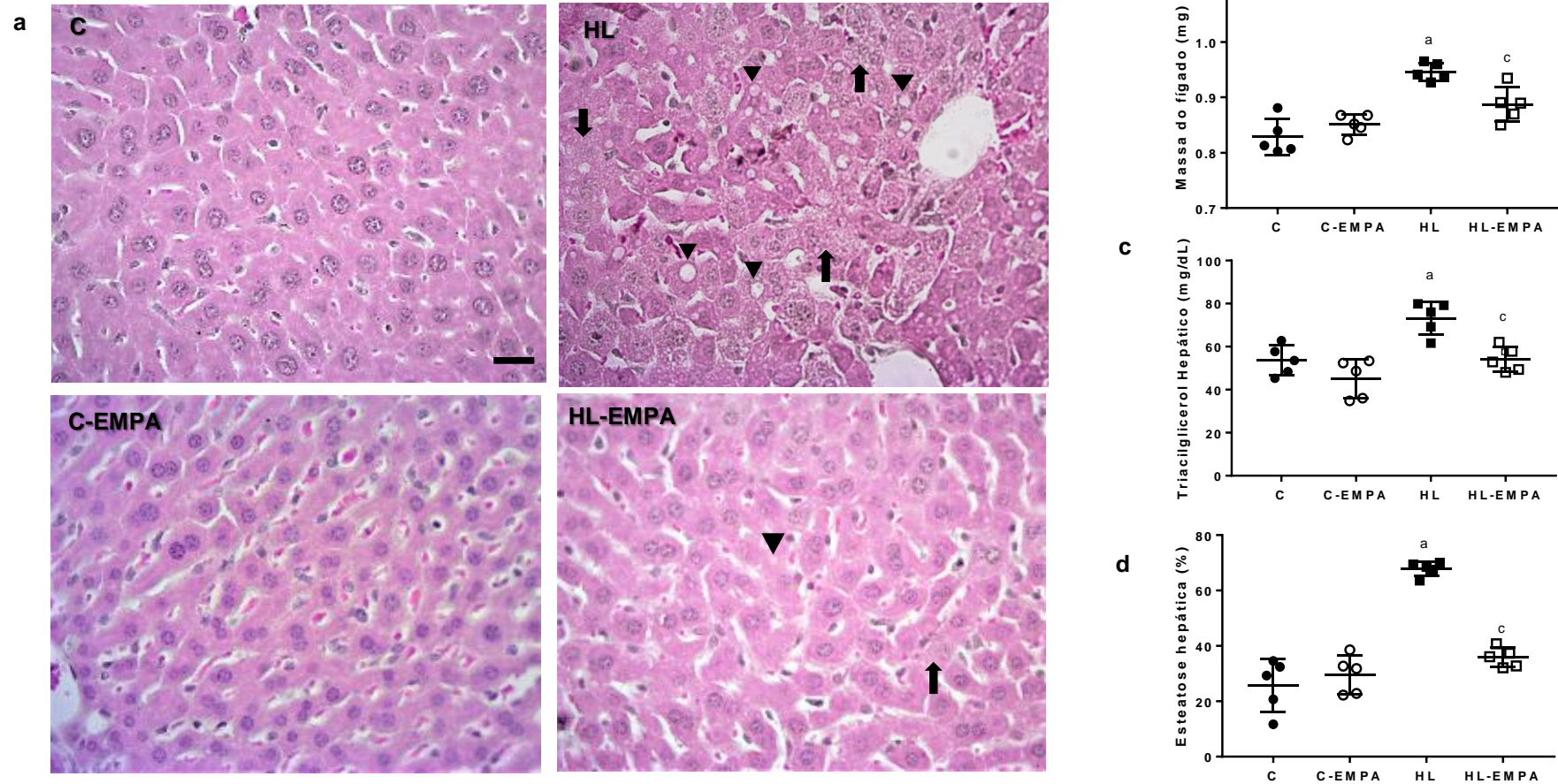
##### 4.13.2 Triacilglicerol hepático

O grupo HL apresentou um aumento do acúmulo de TAG no hepatócito de +37% ( $p = 0,0038$ ) comparado ao grupo C. Contudo, o grupo HLE apresentou uma diminuição de -29% ( $p = 0,0038$ ) comparado ao grupo HL. E não houve diferença entre os grupos CE e C ( $p = 0,2113$ ), dados na figura 19c.

#### 4.13.3 Esteatose hepática

O grupo HL apresentou maior porcentagem de esteatose (figura 19d) quando comparado ao grupo C (+164%,  $p < 0,0001$ ). Além disso, a densidade de esteatose hepática no grupo HL-EMPA apresentou uma redução significativa, cerca de -47%, quando comparado com o grupo de HL ( $p < 0,0001$ ), na figura 19a é apresentado a fotomicrografia do fígado.

Figura 19 – Parâmetros hepáticos



Legenda: a - A fotomicrografia do tecido hepático corado em H&E, apresentado na figura 20a, corrobora com os dados anteriores, em que o grupo HL apresenta microgotículas (setas) e algumas macrogotículas lipídicas (cabeça de seta) nos hepatócitos em comparação com o grupo C que apresenta o parênquima hepático preservado. Por outro lado, o grupo HL-EMPA mostrou presença reduzida das gotículas lipídicas nos hepatócitos em comparação ao grupo HL, barra de calibração 50 $\mu$ m; mesma ampliação para todas as imagens (40x).

b – Massa do fígado; c – Trglicerídeos hepáticos e em d – Densidade de esteatose hepática. C – Grupo controle; C-EMPA- controle+empagliflozina; HL – hiperlipídico; HL-EMPA – hiperlipídico+empagliflozina. Análise estatística por ANOVA de um fator e pós-teste de Holm-Sidak e considerando significativo  $p < 0,05$ . Diferenças apresentadas como: a $\neq$ C; b $\neq$ C-EMPA; c $\neq$ HL.

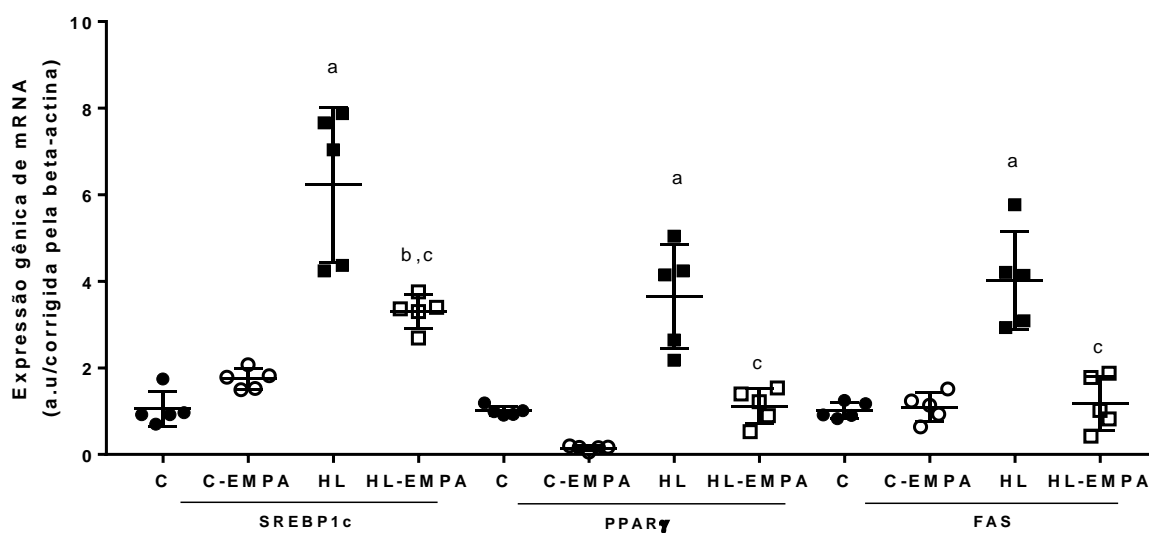
#### 4.12.4 Via lipogênica

A expressão do gene SREBP1c no grupo HL apresentou um aumento de 493% ( $p < 0,0001$ ) quando comparado ao grupo C. Houve menor expressão gênica de SREBP1c no grupo HL-EMPA do que no grupo HL (-47%,  $p = 0,0006$ ). No entanto, no grupo C-EMPA não houve diferença comparado ao grupo C ( $p = 0,2641$ ), figura 20.

O PPAR $\gamma$ , figura 20, também apresentou aumento na expressão no grupo HL em relação ao grupo C (+263%,  $p < 0,0001$ ). Além disso, houve diminuição no grupo HL-EMPA em relação ao grupo HL (-69%,  $p < 0,0001$ ). Entre os grupos C-EMPA e C não houve diferença significativa ( $p = 0,0950$ ).

A expressão gênica da FAS apresentou-se elevada no grupo HL quando comparado ao grupo C (+297%;  $p < 0,0001$ ). O grupo HL-EMPA apresentou menor expressão gênica dessa enzima -71% ( $p < 0,0001$ ) em relação a sua contraparte, também não houve diferença significativa entre os grupos C-EMPA e C ( $p = 0,9725$ ), figura 20.

Figura 20 – Expressão gênica da via lipogênica



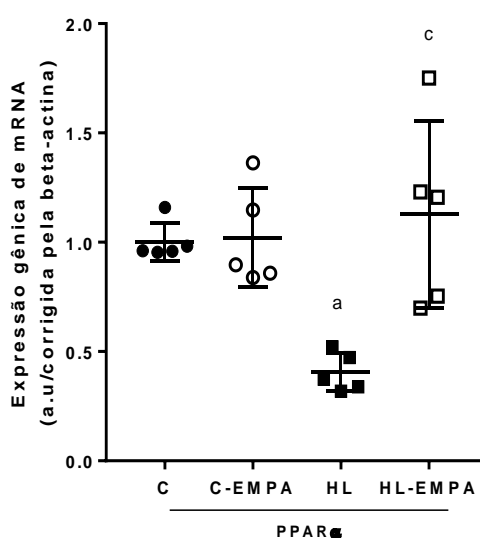
Legenda: C – Grupo controle; C-EMPA- controle+empagliflozina; HL – hiperlipídico; HL-EMPA – hiperlipídico+empagliflozina. Análise estatística por ANOVA de um fator e pós-teste de Holm-Sidak e considerando significativo  $p < 0,05$ . Diferenças apresentadas como: a $\neq$ C;



#### 4.13.5 Via da $\beta$ -oxidação

O PPAR $\alpha$  apresentou uma expressão cerca de -60% menor no grupo HL em comparação com o grupo C ( $p=0,0065$ ). De modo positivo, o grupo HL-EMPA apresentou aumento de 78% na expressão gênica em comparação com o grupo HL ( $p=0,0019$ ). No que se refere aos grupos C-EMPA e C não foi observada diferença significativa ( $p=0,9108$ ), figura 21.

Figura 21 – Expressão gênica da via da  $\beta$ -oxidação



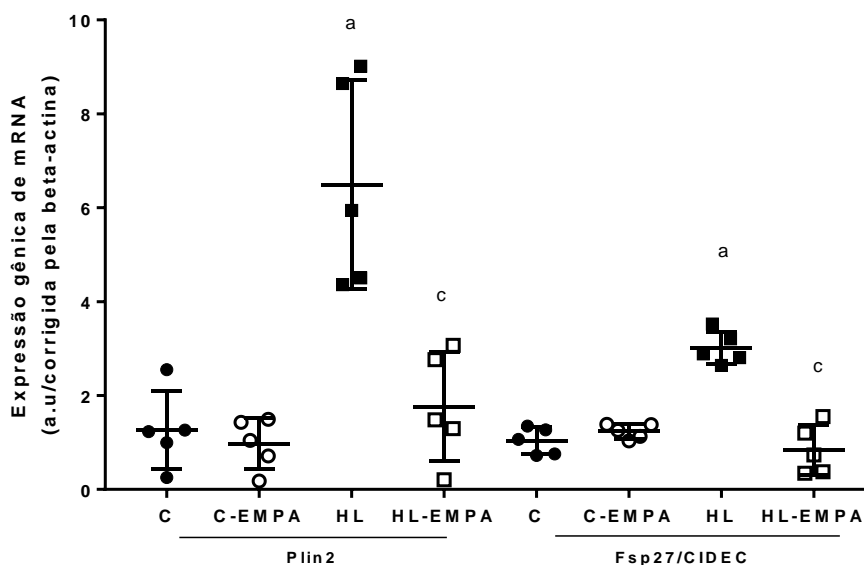
Legenda: C – Grupo controle; C-EMPA - controle+empagliflozina; HL – hiperlipídico; HL-EMPA – hiperlipídico+empagliflozina. Análise estatística por ANOVA de um fator e pós-teste de Holm-Sidak e considerando significativo  $p<0,05$ . Diferenças apresentadas como:  $a\neq C$ ;

#### 4.13.6 Gotícula lipídica

A expressão gênica de Plin2 no grupo HL foi maior do que o grupo C (+416%,  $p<0,0001$ ), por outro lado, o grupo HL-EMPA mostrou menor expressão em comparação a sua contraparte (-73%,  $p=0,0002$ ). Não houve diferença significativa entre os grupos C-EMPA e C ( $p=0,8081$ ), figura 22. Além disso, visualizando a imunofluorescência, a proteína Plin2 apresentou marcação mais evidente no grupo HL do que no grupo C, e houve uma marcação reduzida no grupo HL-EMPA comparado ao grupo HL, corroborando com os dados da expressão gênica, fotomicrografias apresentadas na figura 24.

O gene Fsp27/CIDEc no grupo HL apresentou expressão aumentada em comparação com o grupo C +192% ( $p < 0,0001$ ). Porém, o grupo HL-EMPA teve um decréscimo de cerca de -72% em comparação ao grupo HL ( $p < 0,0001$ ). Não houve diferença significativa entre os grupos C-EMPA e C ( $p = 0,6096$ ), figura 22.

Figura 22 – Expressão gênica relacionada a gotículas lipídicas



Legenda: C – Grupo controle; C-EMPA - controle+empagliflozina; HL – hiperlipídico; HL-EMPA – hiperlipídico+empagliflozina. Análise estatística por ANOVA de um fator e pós-teste de Holm-Sidak e considerando significativo  $p < 0,05$ . Diferenças apresentadas como: a≠C; b≠C-EMPA; c≠HL.

#### 4.13.7 Estresse do retículo endoplasmático

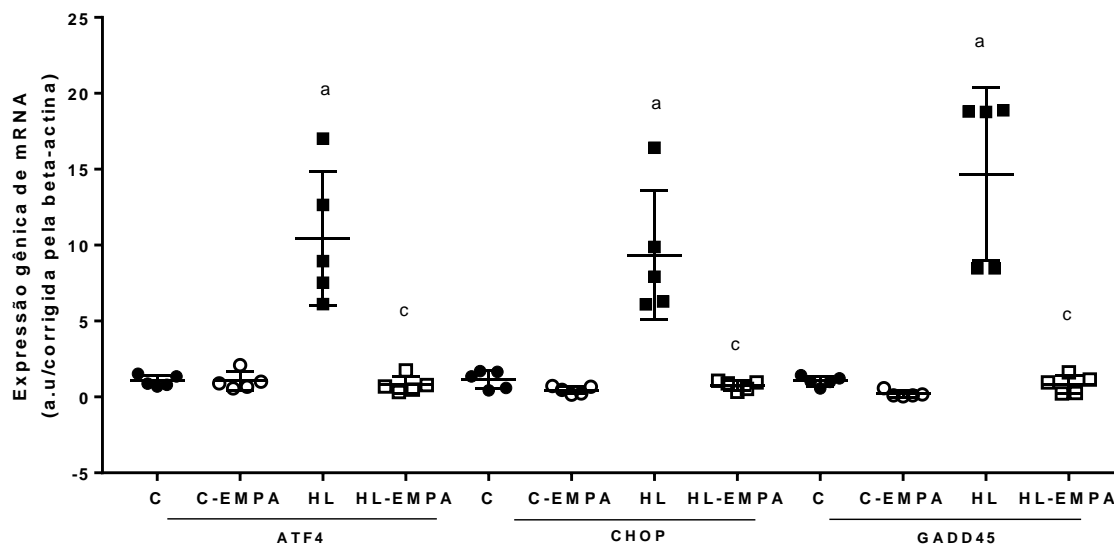
A expressão gênica do ATF4 no grupo HL foi significativamente maior em relação ao grupo C (+896%,  $p < 0,0001$ ). Após o tratamento o grupo HL-EMPA apresentou expressão reduzida em relação ao grupo de HL (-92%,  $p < 0,0001$ ), não foi observado diferença significativa no grupo C-EMPA em relação ao grupo C ( $p = 0,9977$ ), figura 23.

A expressão gênica de CHOP (figura 23) foi maior no grupo HL quando comparado ao grupo C (+711%,  $p < 0,0001$ ), e houve uma diminuição no grupo HL-EMPA em relação ao grupo HL (-92%,  $p < 0,0001$ ). Não houve diferença estatística na expressão gênica entre os grupos C-EMPA e C ( $p = 0,9426$ ).

GADD45 apresentou uma expressão maior no grupo HL em comparação ao grupo C +1302% ( $p < 0,0001$ ). Além disso, o grupo HL-EMPA teve um decréscimo de

-94% em comparação com o grupo HL ( $p < 0,0001$ ). Não houve diferença entre os grupos C-EMPA e C ( $p = 0,9552$ ), dados apresentados na figura 23.

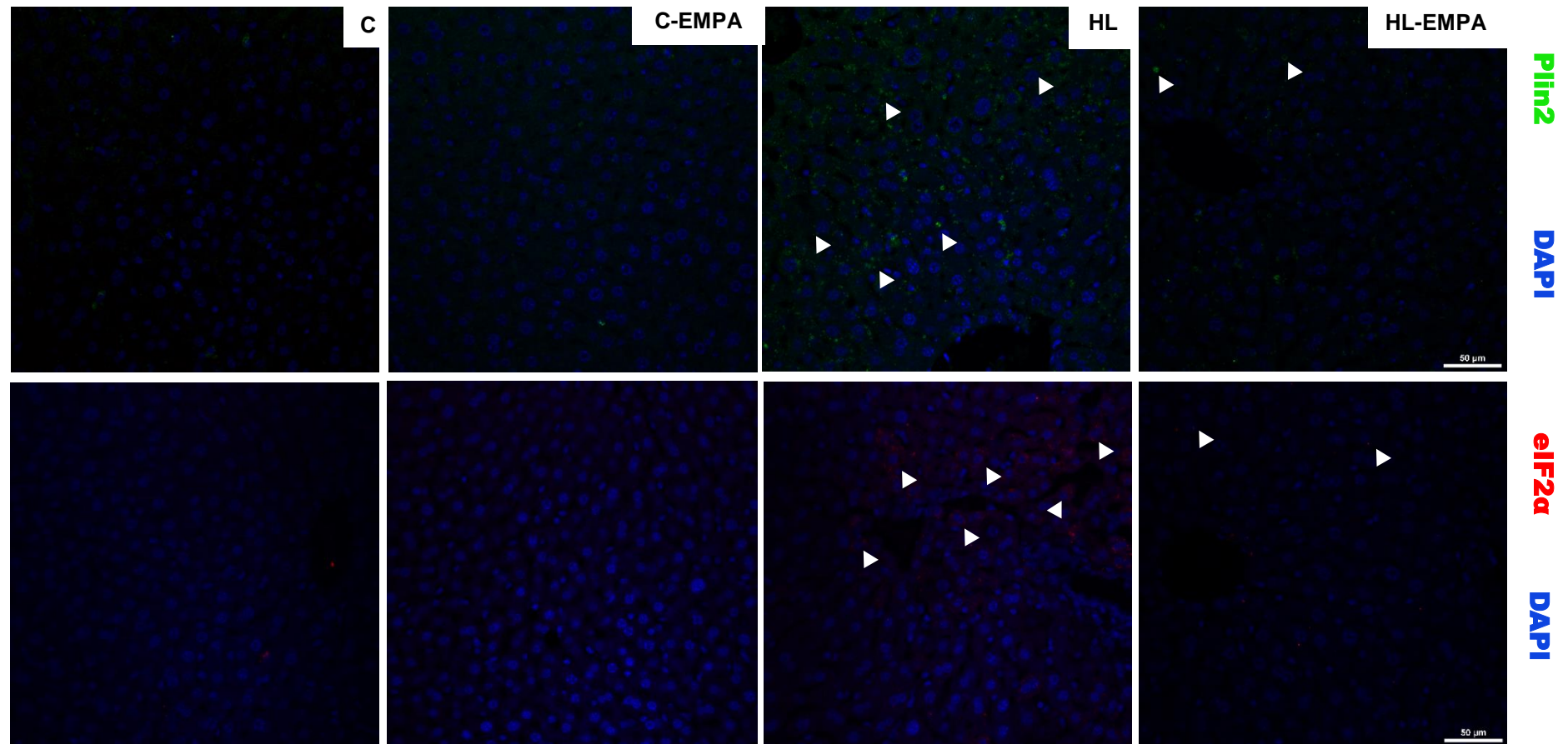
Figura 23 – Expressão gênica da via do estresse do retículo endoplasmático



Legenda: C – Grupo controle; C-EMPA- controle+empagliflozina; HL – hiperlipídico; HL-EMPA – hiperlipídico+empagliflozina. Análise estatística por ANOVA de um fator e pós-teste de Holm-Sidak e considerando significativo  $p < 0,05$ . Diferenças apresentadas como:  $a \neq c$ ;

A imunomarcção da proteína eIF2 $\alpha$  demonstrou marcação mais intensa no grupo HL em relação ao grupo C. O grupo HL-EMPA apresentou menor marcação em comparação ao grupo HL. Não foi observada diferença entre as marcações nos grupos C-EMPA e C, fotomicrografia apresentadas na figura 24.

Figura 24 – Fotomicrografias da imunofluorescência para as proteínas Plin2 e eIF2 $\alpha$



Legenda: Na primeira linha está apresentada a proteína Plin2, marcador de gotícula lipídica no fígado, na qual houve uma maior marcação no grupo HL comparado ao grupo C, além de no grupo HL-EMPA apresentar menor marcação comparado ao HL, e entre os grupos C-EMPA e C não houve diferença e na segunda segunda linha, há a expressão da proteína eIF2 $\alpha$ , primeira proteína ativada da via do estresse do retículo endoplasmático, e no grupo HL houve maior marcação comparado com o C, DAPI marcador de núcleo. C – Grupo controle; C-EMPA - controle+empagliflozina; HL – hiperlipídico; HL-EMPA – hiperlipídico+empagliflozina. Mesma ampliação para todas as imagens 50x, barra de calibração de 50 $\mu$ m.

## 5 DISCUSSÃO

No presente estudo, o tratamento com a empagliflozina aumentou o gasto energético, com conseqüente redução da massa corporal, somando a melhor tolerância à glicose e sensibilidade à insulina. Além disso, o tratamento reduziu a expressão dos genes lipogênicos, em contraste melhorou a expressão gênica do PPAR $\alpha$  e de genes do ERE, com conseqüente redução nos triglicerídeos hepáticos e porcentual de esteatose hepática em modelo experimental. Com base nessas melhorias metabólicas, este estudo demonstra o potencial terapêutico da empagliflozina na DHGNA.

As alterações metabólicas apresentadas pelos camundongos alimentados com dieta HL, no presente estudo foi consistente com o relatado em estudos prévios do nosso grupo (Fraulob *et al.*, 2010; Barbosa-da-Silva *et al.*, 2014), mostrando que o consumo crônico de dieta HL leva ao aumento da MC, intolerância à glicose, hiperinsulinemia e esteatose hepática.

Em relação à MC, nossos resultados demonstram após cinco semanas de tratamento com empagliflozina, que os camundongos mostraram perda significativa de MC; este resultado está de acordo com estudo anterior que mostrou que o tratamento com empagliflozina foi associado a efeitos adicionais incluindo redução da MC, principalmente na dose de 10 mg/kg de animais sob dieta HL (Kurosaki e Ogasawara, 2013; Liakos *et al.*, 2014). A hipótese para a perda de MC é porque o SGLT2 reduz a reabsorção de glicose, o que significa perda de glicose na urina, resultando em uma diminuição da MC (Scheen e Van Gaal, 2014). Além disso, observou-se pela absormetria de raio-X uma diminuição do tecido adiposo, corroborando com os dados, em que evidenciaram com tratamento crônico da empagliflozina reduz a MC não apenas pela perda de fluidos, mas pela redução de tecido adiposo (Bolinder *et al.*, 2014).

Curiosamente, nossos resultados demonstraram que a perda de MC ocorreu mesmo com a ingestão alimentar aumentada no grupo HL-EMPA. No entanto, não está claro o porquê do aumento da ingestão alimentar, trabalhos anteriores demonstraram que corpos cetônicos agem como um sinal de fome para induzir a hiperfagia (Iwata *et al.*, 2011). Como os inibidores do SGLT2 promovem a geração

de corpos cetônicos, por sua vez, os corpos cetônicos podem causar hiperfagia (Ferrannini *et al.*, 2016; Iuchi *et al.*, 2017).

Por outro lado, o tratamento com empagliflozina em nosso estudo foi capaz de aumentar o gasto energético no grupo HL-EMPA, como já foi descrito, a inibição do SGLT2 aumenta o gasto energético, levando ao aumento de AMP/ATP (Gowans *et al.*, 2013). Consistente com este aumento no gasto energético, a empagliflozina também aumentou a temperatura corporal no grupo HL-EMPA, indicando que estas vias também participam na perda de peso observada durante o tratamento com empagliflozina.

Em relação ao metabolismo de carboidratos, nossos dados mostraram melhora na tolerância à glicose e sensibilidade à insulina. A empagliflozina mostrou capacidade de diminuir a glicemia de jejum e efeito significativo no TOTG realizado em animais em jejum, assim apoiando dados que indicam que a inibição da SGLT2 atenua a diminuição da sensibilidade à insulina induzido pela hiperglicemia (Musso *et al.*, 2012b).

Nosso estudo demonstrou que o tratamento com a empagliflozina reduziu o colesterol total plasmático, sem alteração nos níveis de TAG plasmáticos em camundongos alimentados com dieta HL. No entanto, com base no mecanismo de ação da empagliflozina, não são esperados efeitos na diminuição do metabolismo lipídico plasmático, embora existam mecanismos indiretos de ação (Michel *et al.*, 2015), pela glicosúria ou pelo aumento do uso de lipídios na  $\beta$ -oxidação.

Com relação à melhora da esteatose hepática observada no presente estudo, esses achados são consistentes com nossas e outras observações microscópicas anteriores confirmando que a empagliflozina diminuiu as alterações morfológicas associadas à esteatose hepática (Tahara *et al.*, 2013).

Alguns estudos examinaram os impactos dos inibidores do SGLT2 no desenvolvimento de DHGNA e/ou EHNA em modelo de roedores. Estudos que utilizaram ipragliflozina e luseogliflozina, demonstraram que os inibidores do SGLT2 atenuaram o desenvolvimento de DHGNA ou EHNA (Tahara *et al.*, 2013; Honda *et al.*, 2016). Além disso, uma metanálise demonstrou que  $\geq 5\%$  de perda de MC melhora a esteatose hepática e  $\geq 7\%$  de perda MC também melhora o EHNA (Musso *et al.*, 2012a). Importante notar, o presente estudo encontrou redução significativa na esteatose hepática após o tratamento com empagliflozina nos mesmos animais que mostraram redução da MC no grupo HL-EMPA.

De acordo com estes resultados positivos na esteatose hepática, o teor de TAG hepático foi menor no grupo HL- tratado do que no grupo HL não tratado. Entretanto, para elucidar melhor os mecanismos moleculares subjacentes aos efeitos benéficos associados ao tratamento com empagliflozina, focamos nossa investigação na expressão hepática dos genes da lipogênese,  $\beta$  oxidação e ERE .

No que diz respeito aos resultados da via da lipogênese, nós investigamos a expressão de SREBP-1c e FAS e demonstramos que as expressões dos genes chaves relacionados com a lipogênese atenuaram significativamente em HL-EMPA do que quando comparada ao seu homólogo, indicando uma maneira de reduzir a esteatose hepática.

O SREBP-1c é considerado o regulador principal da lipogênese, aumenta a síntese de ácidos graxos e acelera o acúmulo de TAG (Eberle *et al.*, 2004), seu nível é elevado nos fígados gordurosos de camundongos obesos resistentes à insulina (Shimomura *et al.*, 1999). Resultado semelhante foi demonstrado após tratamento com EMPA em um estudo com ratos OLETF (Kim *et al.*, 2018). O acúmulo de lipídios no fígado pode ocorrer devido ao excesso de ingestão, aumento da distribuição de ácido graxo ao fígado, oxidação inadequada de ácidos graxos e aumento da lipogênese de novo (Fujii *et al.*, 2013). No presente estudo também foi observado redução da expressão do FAS, assim, a redução do FAS hepático pela empagliflozina pode ter contribuído para a melhora da esteatose hepática no presente estudo, corroborando com achados prévios (Jojima *et al.*, 2016).

Outro importante fator de transcrição envolvido na lipogênese é o PPAR  $\gamma$ , o processo de acúmulo de lipídio nos hepatócitos tem sido descrito como uma forma dependente do PPAR  $\gamma$ , controlando a transcrição tanto do PLIN2 (Targett-Adams *et al.*, 2005) como do Fsp27/CIDEC (Aibara *et al.*, 2013).

No presente estudo, foi demonstrado que o tratamento com empagliflozina foi capaz de reduzir a expressão do gene PPAR $\gamma$  no fígado, bem como, observou-se menor expressão gênica do Fsp27/CIDEC que teve papel importante nas gotículas lipídicas; CIDEC foi associado à fusão das gotículas lipídicas e promoveu a formação de gotículas lipídicas uniloculares (Nishino *et al.*, 2008) e armazenamento de TAG (Keller *et al.*, 2008). A indução de morte por células de proteínas associadas a gotículas lipídicas, por exemplo o FSP27/CIDEC, é dramaticamente regulada positivamente no fígado gorduroso (Matsusue, 2010). Os mecanismos que regulam a expressão de FSP27/CIDEC nos hepatócitos permanecem desconhecidos. Não

está claro se o FSP27/CIDEA desempenha um papel no acúmulo de lipídios hepáticos (Chen *et al.*, 2018).

Do mesmo modo, foi mostrado no PLIN2, tanto na expressão gênica e na imunomarcação houve redução com o tratamento com EMPA. PLIN2 é de grande importância para a formação de gotículas lipídicas intracelulares. Interferências no PLIN2 resulta em uma diminuição do número e diâmetro das gotículas lipídicas intracelulares e manutenção da estabilidade das gotículas lipídicas (Bell *et al.*, 2008). Além disso, o PLIN2 desempenha um papel importante na esteatose nos hepatócitos. Camundongos *knockout* para PLIN2 não respondem à obesidade induzida por dieta, inflamação gordurosa e esteatose hepática (Carr *et al.*, 2014).

A análise por imunohistoquímica mostrou que o PLIN2 se localizou na superfície das gotículas lipídicas tecidos com esteatose hepática, na qual indicaram que o PLIN2 estava envolvido na progressão da DHGNA (Ikura e Caldwell, 2015). Coletivamente, esses dados mostraram que o tratamento com a empagliflozina atenua a esteatose hepática em camundongos do grupo HL-EMPA, modulando a expressão dos genes envolvidos na lipogênese e armazenamento de lipídios.

No entanto, a expressão do mRNA para PPAR $\alpha$ , envolvido na oxidação de ácidos graxos, foi significativamente aumentada após o tratamento com EMPA no grupo HL-EMPA. Assim, a melhora da DHGNA pela EMPA pode estar associada à diminuição da síntese de ácidos graxos, além do aumento da oxidação de ácidos graxos pelo PPAR $\alpha$ .

Por outro lado, estudos anteriores demonstraram que a ipragliflozina reduz a expressão gênica da LDN, enquanto não altera a expressão dos genes relacionados à  $\beta$ -oxidação (Komiya *et al.*, 2016). Além disso, outro estudo usando a EMPA como um tratamento para um modelo experimental de NASH, também não encontrou diferença na  $\beta$ -oxidação. Acreditamos que estes resultados divergentes são devido aos modelos experimentais, além do tempo de tratamento (Jojima *et al.*, 2016).

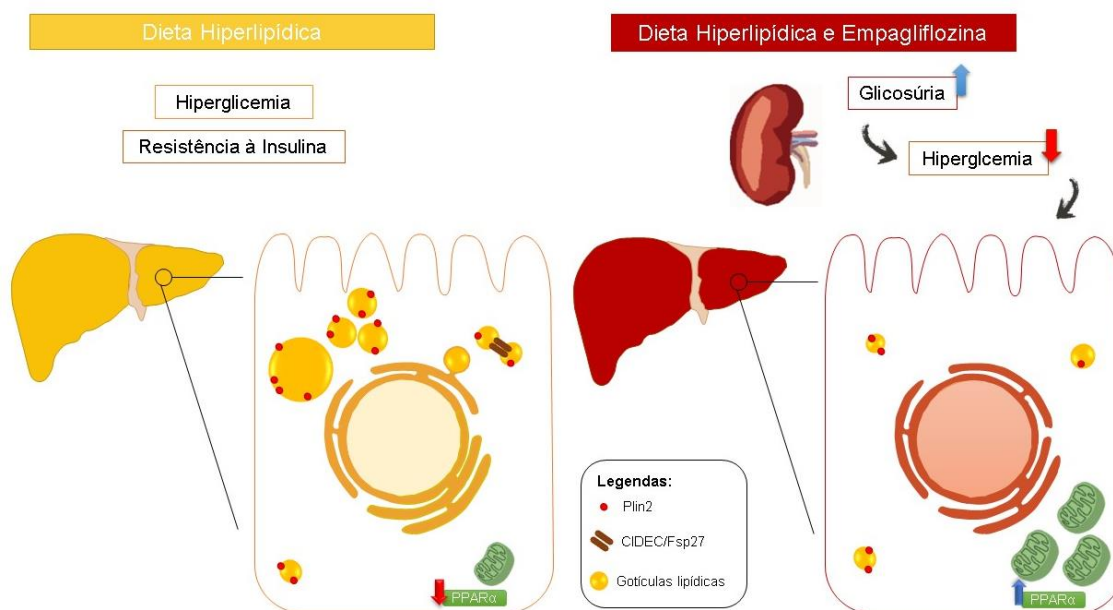
Embora os mecanismos subjacentes à progressão da DHGNA não sejam claros, ela provavelmente envolve uma resposta lipotóxica precoce devido à esteatose hepática, surgindo nesse contexto o papel do RE, importante organela intracelular responsável pela síntese, desdobramento, modificação e tráfico de células. proteínas. A ruptura da homeostase do RE, referida como ERE, tem sido associada a algumas condições patológicas, incluindo evidências recentes que implicam o ERE no desenvolvimento de esteatose hepática (Li *et al.*, 2012).



O acúmulo intra-hepático de ácidos graxos livres induz a RI hepática e ERE, culminando com diminuição da função hepática, apoptose e fibrose (Li *et al.*, 2012; Zhou e Liu, 2014). Neste contexto, examinamos os genes do mRNA, do ATF4, CHOP e GADD45 todos os genes envolvidos no ERE. Nossos resultados demonstraram que, em camundongos alimentados com dieta HL apresentaram expressões gênicas do mRNA de CHOP, ATF4, GADD45 elevadas no tecido hepático.

O ATF4 é um fator de transcrição que regula vários genes relacionados à UPR, incluindo a transcrição do CHOP (Fusakio *et al.*, 2016). Por sua vez, CHOP é um dos principais indutores de apoptose por estagnar o ciclo celular através da indução da expressão do gene GADD45 (Oyadomari e Mori, 2004), ambas as expressões dos genes foram maiores no grupo alimentado com dieta HL no presente estudo. Por outro lado, o tratamento com empagliflozina melhorou a expressão desses três genes envolvidos no ERE do tecido hepático em camundongos HL-EMPA, suportando a ligação do acúmulo de lipídios no fígado com o ERE.

Figura 25 – Resumo gráfico



Legenda: A dieta hiperlipídica leva a um estado de resistência à insulina e consequente hiperlipidemia culminando na deposição ectópica de lipídios no fígado, a esteatose hepática. Então, há uma diminuição da oxidação desses lipídios e eles são, então, armazenados em gotículas lipídicas compostas por proteínas, como Plin2 e triacilglicerol os e são formadas no retículo endoplasmático. Na presença de microgotículas, a proteína CIDEC induz a junção dessas formando macrogotículas. O aumento de síntese e a chegada de novos lipídios leva ao estresse do retículo endoplasmático (ERE). O tratamento dos camundongos com sobrepeso com a empaglifozina diminuiu a hiperlipidemia e melhorou a sensibilidade à insulina, através da glicosúria. A empaglifozina diminuiu a disponibilidade de glicose como substrato energético, e assim diminuindo a síntese de novos lipídios a partir da lipogênese *de novo*, e aumentando a oxidação dos lipídios, diminuindo o ERE. Assim, culminando numa menor presença de gotículas lipídicas, e logo das proteínas presentes em sua superfície como Plin2 e CIDEC. Plin2 – *Perilipin 2*; CIDEC/Fsp27 - *Cell Death Inducing DFFA Like Effector C/Fat specific protein 27*

## CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstraram que a empagliflozina reduziu a massa corporal, apesar de aumentar a ingestão alimentar, seus efeitos sobrepujaram-se e mostraram-se benéficos, favorecendo melhor sensibilidade a insulina e redução potencial da esteatose hepática que é consistente com a redução na expressão dos genes que atuam na lipogênese hepática, somando a redução dos genes envolvidos no estresse do retículo endoplasmático. Dessa forma, a inibição do SGLT2, utilizando empagliflozina pode ser uma ferramenta importante para evitar a progressão da esteatose hepática e pode ser uma terapia eficaz para um paciente que apresenta a esteatose hepática atrelada a outras co-morbidades da síndrome metabólica.

## REFERÊNCIAS

- Abu-Elheiga L, Matzuk MM, Kordari P, Oh W, Shaikenov T, Gu Z et al. Mutant mice lacking acetyl-CoA carboxylase 1 are embryonically lethal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 12011-12016 (doi: 10.1073/pnas.0505714102)
- Adams LA, Lymp JF, St Sauver J, Sanderson SO, Lindor KD, Feldstein A et al. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study. *Gastroenterology* 2005; 129: 113-121 (doi: 10.1053/j.gastro.2005.06.011)
- Aguila MB, Pinheiro Ada R, Parente LB, Mandarim-de-Lacerda CA. Dietary effect of different high-fat diet on rat liver stereology. *Liver Int* 2003; 23: 363-370 (doi: 10.1002/liv.1003)
- Aibara D, Matsusue K, Matsuo K, Takiguchi S, Gonzalez FJ, Yamano S. Expression of hepatic fat-specific protein 27 depends on the specific etiology of fatty liver. *Biol Pharm Bull* 2013; 36: 1766-1772 (doi: 10.1248/bpb.1301766a)
- Akazawa Y, Cazanave S, Mott JL, Elmi N, Bronk SF, Kohno S et al. Palmitoleate attenuates palmitate-induced Bim and PUMA up-regulation and hepatocyte lipopoptosis. *J Hepatol* 2010; 52: 586-593 (doi: 10.1016/j.jhep.2010.01.003)
- Alkhoury N, Dixon LJ, Feldstein AE. Lipotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease: not all lipids are created equal. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2009; 3: 445-451 (doi: 10.1586/egh.09.32)
- Angulo P, Kleiner DE, Dam-Larsen S, Adams LA, Bjornsson ES, Charatcharoenwitthaya P et al. Liver Fibrosis, but No Other Histologic Features, Is Associated With Long-term Outcomes of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 2015; 149: 389-397 e310 (doi: 10.1053/j.gastro.2015.04.043)
- Ayonrinde OT, Olynyk JK, Marsh JA, Beilin LJ, Mori TA, Oddy WH et al. Childhood adiposity trajectories and risk of nonalcoholic fatty liver disease in adolescents. *J Gastroenterol Hepatol* 2015; 30: 163-171 (doi: 10.1111/jgh.12666)
- Ballestri S, Nascimbeni F, Baldelli E, Marrazzo A, Romagnoli D, Lonardo A. NAFLD as a Sexual Dimorphic Disease: Role of Gender and Reproductive Status in the Development and Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Inherent Cardiovascular Risk. *Adv Ther* 2017; 34: 1291-1326 (doi: 10.1007/s12325-017-0556-1)
- Ballestri S, Zona S, Targher G, Romagnoli D, Baldelli E, Nascimbeni F et al. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with an almost twofold increased risk of incident type 2 diabetes and metabolic syndrome. Evidence from a systematic review and meta-analysis. *J Gastroenterol Hepatol* 2016; 31: 936-944 (doi: 10.1111/jgh.13264)

- Barbosa-da-Silva S, da Silva NC, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Liver damage is not reversed during the lean period in diet-induced weight cycling in mice. *Hepatol Res* 2014; 44: 450-459 (doi: 10.1111/hepr.12138)
- Barfuss DW, Schafer JA. Differences in active and passive glucose transport along the proximal nephron. *Am J Physiol* 1981; 241: F322-332 (doi: 10.1152/ajprenal.1981.241.3.F322)
- Barnett AH, Mithal A, Manassie J, Jones R, Rattunde H, Woerle HJ et al. Efficacy and safety of empagliflozin added to existing antidiabetes treatment in patients with type 2 diabetes and chronic kidney disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2014; 2: 369-384 (doi: 10.1016/S2213-8587(13)70208-0)
- Bell M, Wang H, Chen H, McLenithan JC, Gong DW, Yang RZ et al. Consequences of lipid droplet coat protein downregulation in liver cells: abnormal lipid droplet metabolism and induction of insulin resistance. *Diabetes* 2008; 57: 2037-2045 (doi: 10.2337/db07-1383)
- Bolinder J, Ljunggren O, Johansson L, Wilding J, Langkilde AM, Sjostrom CD et al. Dapagliflozin maintains glycaemic control while reducing weight and body fat mass over 2 years in patients with type 2 diabetes mellitus inadequately controlled on metformin. *Diabetes Obes Metab* 2014; 16: 159-169 (doi: 10.1111/dom.12189)
- Bradbury MW. Lipid metabolism and liver inflammation. I. Hepatic fatty acid uptake: possible role in steatosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290: G194-198 (doi: 10.1152/ajpgi.00413.2005)
- Brown MS, Kovanen PT, Goldstein JL. Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors. *Science* 1981; 212: 628-635 (doi: 10.1126/science.7463986)
- Burt AD, Mutton A, Day CP. Diagnosis and interpretation of steatosis and steatohepatitis. *Semin Diagn Pathol* 1998; 15: 246-258 (doi: 10.1053/sdi.1998.15.3.246)
- Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism* 2016; 65: 1038-1048 (doi: 10.1016/j.metabol.2015.12.012)
- Caligiuri A, Gentilini A, Marra F. Molecular Pathogenesis of NASH. *Int J Mol Sci* 2016; 17: (doi: 10.3390/ijms17091575)
- Carr RM, Peralta G, Yin X, Ahima RS. Absence of perilipin 2 prevents hepatic steatosis, glucose intolerance and ceramide accumulation in alcohol-fed mice. *PLoS One* 2014; 9: e97118 (doi: 10.1371/journal.pone.0097118)
- Catta-Preta M, Mendonca LS, Fraulob-Aquino J, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. A critical analysis of three quantitative methods of assessment of hepatic

- steatosis in liver biopsies. *Virchows Arch* 2011; 459: 477-485 (doi: 10.1007/s00428-011-1147-1)
- Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice guideline by the American Gastroenterological Association, American Association for the Study of Liver Diseases, and American College of Gastroenterology. *Gastroenterology* 2012; 142: 1592-1609 (doi: 10.1053/j.gastro.2012.04.001)
- Chao EC. SGLT-2 Inhibitors: A New Mechanism for Glycemic Control. *Clin Diabetes* 2014; 32: 4-11 (doi: 10.2337/diaclin.32.1.4)
- Chasis H, Jolliffe N, Smith HW. The Action of Phlorizin on the Excretion of Glucose, Xylose, Sucrose, Creatinine and Urea by Man. *J Clin Invest* 1933; 12: 1083-1090 (doi: 10.1172/JCI100559)
- Chen A, Chen X, Cheng S, Shu L, Yan M, Yao L et al. FTO promotes SREBP1c maturation and enhances CIDEA transcription during lipid accumulation in HepG2 cells. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 2018; 1863: 538-548 (doi: 10.1016/j.bbalip.2018.02.003)
- Cotrim HP, Parise ER, Oliveira CP, Leite N, Martinelli A, Galizzi J et al. Nonalcoholic fatty liver disease in Brazil. Clinical and histological profile. *Ann Hepatol* 2011; 10: 33-37 (doi: 10.1016/j.annhep.2011.01.003)
- Csaki LS, Reue K. Lipins: multifunctional lipid metabolism proteins. *Annu Rev Nutr* 2010; 30: 257-272 (doi: 10.1146/annurev.nutr.012809.104729)
- Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 1998; 114: 842-845 (doi: 10.1053/gastro.1998.114.3.842)
- Day CP, Saksena S. Non-alcoholic steatohepatitis: definitions and pathogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17 Suppl 3: S377-384 (doi: 10.1053/j.gastro.2002.03.010)
- Diehl AM. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis IV. Nonalcoholic fatty liver disease abnormalities in macrophage function and cytokines. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 282: G1-5 (doi: 10.1152/ajpgi.00384.2001)
- Dietrich P, Hellerbrand C. Non-alcoholic fatty liver disease, obesity and the metabolic syndrome. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2014; 28: 637-653 (doi: 10.1016/j.bpg.2014.07.008)
- Dowman JK, Tomlinson JW, Newsome PN. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *QJM* 2010; 103: 71-83 (doi: 10.1093/qjmed/hcp158)
- Eaton S, Bartlett K, Pourfarzam M. Mammalian mitochondrial beta-oxidation. *Biochem J* 1996; 320 ( Pt 2): 345-357 (doi: 10.1042/bj3200345)

- Eberle D, Hegarty B, Bossard P, Ferre P, Fougere F. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie* 2004; 86: 839-848 (doi: 10.1016/j.biochi.2004.09.018)
- Fabbrini E, Magkos F. Hepatic Steatosis as a Marker of Metabolic Dysfunction. *Nutrients* 2015; 7: 4995-5019 (doi: 10.3390/nu7064995)
- Faillie JL. Pharmacological aspects of the safety of gliflozins. *Pharmacol Res* 2017; 118: 71-81 (doi: 10.1016/j.phrs.2016.07.001)
- Fang YL, Chen H, Wang CL, Liang L. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease in children and adolescence: From "two hit theory" to "multiple hit model". *World J Gastroenterol* 2018; 24: 2974-2983 (doi: 10.3748/wjg.v24.i27.2974)
- Farese RV, Jr., Zechner R, Newgard CB, Walther TC. The problem of establishing relationships between hepatic steatosis and hepatic insulin resistance. *Cell Metab* 2012; 15: 570-573 (doi: 10.1016/j.cmet.2012.03.004)
- Fargion S, Porzio M, Fracanzani AL. Nonalcoholic fatty liver disease and vascular disease: state-of-the-art. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 13306-13324 (doi: 10.3748/wjg.v20.i37.13306)
- Ferramosca A, Zara V. Modulation of hepatic steatosis by dietary fatty acids. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 1746-1755 (doi: 10.3748/wjg.v20.i7.1746)
- Ferrannini E, Baldi S, Frascerra S, Astiarraga B, Heise T, Bizzotto R et al. Shift to Fatty Substrate Utilization in Response to Sodium-Glucose Cotransporter 2 Inhibition in Subjects Without Diabetes and Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes* 2016; 65: 1190-1195 (doi: 10.2337/db15-1356)
- Flanagan AM, Brown JL, Santiago CA, Aad PY, Spicer LJ, Spicer MT. High-fat diets promote insulin resistance through cytokine gene expression in growing female rats. *J Nutr Biochem* 2008; 19: 505-513 (doi: 10.1016/j.jnutbio.2007.06.005)
- Fotbolcu H, Zorlu E. Nonalcoholic fatty liver disease as a multi-systemic disease. *World J Gastroenterol* 2016; 22: 4079-4090 (doi: 10.3748/wjg.v22.i16.4079)
- Fraulob JC, Ogg-Diamantino R, Fernandes-Santos C, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. A Mouse Model of Metabolic Syndrome: Insulin Resistance, Fatty Liver and Non-Alcoholic Fatty Pancreas Disease (NAFPD) in C57BL/6 Mice Fed a High Fat Diet. *J Clin Biochem Nutr* 2010; 46: 212-223 (doi: 10.3164/jcbn.09-83)
- Friedman SL, Neuschwander-Tetri BA, Rinella M, Sanyal AJ. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat Med* 2018; 24: 908-922 (doi: 10.1038/s41591-018-0104-9)

- Fujii M, Shibasaki Y, Wakamatsu K, Honda Y, Kawauchi Y, Suzuki K et al. A murine model for non-alcoholic steatohepatitis showing evidence of association between diabetes and hepatocellular carcinoma. *Med Mol Morphol* 2013; 46: 141-152 (doi: 10.1007/s00795-013-0016-1)
- Fusakio ME, Willy JA, Wang Y, Mirek ET, Al Baghdadi RJ, Adams CM et al. Transcription factor ATF4 directs basal and stress-induced gene expression in the unfolded protein response and cholesterol metabolism in the liver. *Mol Biol Cell* 2016; 27: 1536-1551 (doi: 10.1091/mbc.E16-01-0039)
- Galligan JJ, Smathers RL, Shearn CT, Fritz KS, Backos DS, Jiang H et al. Oxidative Stress and the ER Stress Response in a Murine Model for Early-Stage Alcoholic Liver Disease. *J Toxicol* 2012; 2012: 207594 (doi: 10.1155/2012/207594)
- Gan L, Xiang W, Xie B, Yu L. Molecular mechanisms of fatty liver in obesity. *Front Med* 2015; 9: 275-287 (doi: 10.1007/s11684-015-0410-2)
- Geerlings S, Fonseca V, Castro-Diaz D, List J, Parikh S. Genital and urinary tract infections in diabetes: impact of pharmacologically-induced glucosuria. *Diabetes Res Clin Pract* 2014; 103: 373-381 (doi: 10.1016/j.diabres.2013.12.052)
- Gowans GJ, Hawley SA, Ross FA, Hardie DG. AMP is a true physiological regulator of AMP-activated protein kinase by both allosteric activation and enhancing net phosphorylation. *Cell Metab* 2013; 18: 556-566 (doi: 10.1016/j.cmet.2013.08.019)
- Grempler R, Thomas L, Eckhardt M, Himmelsbach F, Sauer A, Sharp DE et al. Empagliflozin, a novel selective sodium glucose cotransporter-2 (SGLT-2) inhibitor: characterisation and comparison with other SGLT-2 inhibitors. *Diabetes Obes Metab* 2012; 14: 83-90 (doi: 10.1111/j.1463-1326.2011.01517.x)
- Gruzdeva O, Borodkina D, Uchasova E, Dyleva Y, Barbarash O. Localization of fat depots and cardiovascular risk. *Lipids Health Dis* 2018; 17: 218 (doi: 10.1186/s12944-018-0856-8)
- Hall AM, Kou K, Chen Z, Pietka TA, Kumar M, Korenblat KM et al. Evidence for regulated monoacylglycerol acyltransferase expression and activity in human liver. *J Lipid Res* 2012; 53: 990-999 (doi: 10.1194/jlr.P025536)
- Harding HP, Zhang Y, Ron D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 1999; 397: 271-274 (doi: 10.1038/16729)
- Hardy T, Oakley F, Anstee QM, Day CP. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Pathogenesis and Disease Spectrum. *Annu Rev Pathol* 2016; 11: 451-496 (doi: 10.1146/annurev-pathol-012615-044224)



- Hollien J. Evolution of the unfolded protein response. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1833: 2458-2463 (doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.01.016)
- Honda Y, Imajo K, Kato T, Kessoku T, Ogawa Y, Tomeno W et al. The Selective SGLT2 Inhibitor Ipragliflozin Has a Therapeutic Effect on Nonalcoholic Steatohepatitis in Mice. *PLoS One* 2016; 11: e0146337 (doi: 10.1371/journal.pone.0146337)
- Hooper AJ, Adams LA, Burnett JR. Genetic determinants of hepatic steatosis in man. *J Lipid Res* 2011; 52: 593-617 (doi: 10.1194/jlr.R008896)
- Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest* 2002; 109: 1125-1131 (doi: 10.1172/JCI15593)
- Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell* 2010; 140: 900-917 (doi: 10.1016/j.cell.2010.02.034)
- Hummel CS, Lu C, Loo DD, Hirayama BA, Voss AA, Wright EM. Glucose transport by human renal Na<sup>+</sup>/D-glucose cotransporters SGLT1 and SGLT2. *Am J Physiol Cell Physiol* 2011; 300: C14-21 (doi: 10.1152/ajpcell.00388.2010)
- Ibrahim SH, Hirsova P, Gores GJ. Non-alcoholic steatohepatitis pathogenesis: sublethal hepatocyte injury as a driver of liver inflammation. *Gut* 2018; 67: 963-972 (doi: 10.1136/gutjnl-2017-315691)
- Ikura Y, Caldwell SH. Lipid droplet-associated proteins in alcoholic liver disease: a potential linkage with hepatocellular damage. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8: 8699-8708 (doi: 10.1155/2015/8699-8708)
- Iuchi H, Sakamoto M, Matsutani D, Suzuki H, Kayama Y, Takeda N et al. Time-dependent effects of ipragliflozin on behaviour and energy homeostasis in normal and type 2 diabetic rats: continuous glucose telemetry analysis. *Sci Rep* 2017; 7: 11906 (doi: 10.1038/s41598-017-12106-y)
- Iwata K, Kinoshita M, Yamada S, Imamura T, Uenoyama Y, Tsukamura H et al. Involvement of brain ketone bodies and the noradrenergic pathway in diabetic hyperphagia in rats. *J Physiol Sci* 2011; 61: 103-113 (doi: 10.1007/s12576-010-0127-6)
- Jojima T, Tomotsune T, Iijima T, Akimoto K, Suzuki K, Aso Y. Empagliflozin (an SGLT2 inhibitor), alone or in combination with linagliptin (a DPP-4 inhibitor), prevents steatohepatitis in a novel mouse model of non-alcoholic steatohepatitis and diabetes. *Diabetol Metab Syndr* 2016; 8: 45 (doi: 10.1186/s13098-016-0169-x)
- Kakinuma H, Oi T, Hashimoto-Tsuchiya Y, Arai M, Kawakita Y, Fukasawa Y et al. (1S)-1,5-anhydro-1-[5-(4-ethoxybenzyl)-2-methoxy-4-methylphenyl]-1-thio-D-glucito I (TS-071) is a potent, selective sodium-dependent glucose

- cotransporter 2 (SGLT2) inhibitor for type 2 diabetes treatment. *J Med Chem* 2010; 53: 3247-3261 (doi: 10.1021/jm901893x)
- Kalish BT, Fell GL, Nandivada P, Puder M. Clinically Relevant Mechanisms of Lipid Synthesis, Transport, and Storage. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2015; 39: 8S-17S (doi: 10.1177/0148607115595974)
- Kallwitz ER, McLachlan A, Cotler SJ. Role of peroxisome proliferators-activated receptors in the pathogenesis and treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 22-28 (doi: 10.3748/wjg.v14.i1.22)
- Katz A, Nambi SS, Mather K, Baron AD, Follmann DA, Sullivan G et al. Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 2402-2410 (doi: 10.1210/jcem.85.7.6661)
- Kawano Y, Cohen DE. Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol* 2013; 48: 434-441 (doi: 10.1007/s00535-013-0758-5)
- Keller P, Petrie JT, De Rose P, Gerin I, Wright WS, Chiang SH et al. Fat-specific protein 27 regulates storage of triacylglycerol. *J Biol Chem* 2008; 283: 14355-14365 (doi: 10.1074/jbc.M708323200)
- Kim JW, Lee YJ, You YH, Moon MK, Yoon KH, Ahn YB et al. Effect of sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor, empagliflozin, and alpha-glucosidase inhibitor, voglibose, on hepatic steatosis in an animal model of type 2 diabetes. *J Cell Biochem* 2018; (*em impressão*, doi: 10.1002/jcb.28141): (doi: 10.1002/jcb.28141)
- Kim KH, Lee MS. Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis and Hormone-Based Therapeutic Approaches. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2018; 9: 485 (doi: 10.3389/fendo.2018.00485)
- Komiya C, Tsuchiya K, Shiba K, Miyachi Y, Furuke S, Shimazu N et al. Ipragliflozin Improves Hepatic Steatosis in Obese Mice and Liver Dysfunction in Type 2 Diabetic Patients Irrespective of Body Weight Reduction. *PLoS One* 2016; 11: e0151511 (doi: 10.1371/journal.pone.0151511)
- Koo SH. Nonalcoholic fatty liver disease: molecular mechanisms for the hepatic steatosis. *Clin Mol Hepatol* 2013; 19: 210-215 (doi: 10.3350/cmh.2013.19.3.210)
- Kurosaki E, Ogasawara H. Ipragliflozin and other sodium-glucose cotransporter-2 (SGLT2) inhibitors in the treatment of type 2 diabetes: preclinical and clinical data. *Pharmacol Ther* 2013; 139: 51-59 (doi: 10.1016/j.pharmthera.2013.04.003)

- Lee YJ, Lee YJ, Han HJ. Regulatory mechanisms of Na(+)/glucose cotransporters in renal proximal tubule cells. *Kidney Int Suppl* 2007; (em impressão, doi: 10.1038/sj.ki.5002383): S27-35 (doi: 10.1038/sj.ki.5002383)
- Leite NC, Salles GF, Araujo AL, Villela-Nogueira CA, Cardoso CR. Prevalence and associated factors of non-alcoholic fatty liver disease in patients with type-2 diabetes mellitus. *Liver Int* 2009; 29: 113-119 (doi: 10.1111/j.1478-3231.2008.01718.x)
- Li J, Huang J, Li JS, Chen H, Huang K, Zheng L. Accumulation of endoplasmic reticulum stress and lipogenesis in the liver through generational effects of high fat diets. *J Hepatol* 2012; 56: 900-907 (doi: 10.1016/j.jhep.2011.10.018)
- Li T, Jiang S, Lu C, Hu W, Ji T, Han M et al. Snapshots: Endoplasmic Reticulum Stress in Lipid Metabolism and Cardiovascular Disease. *Curr Issues Mol Biol* 2018; 28: 14-28 (doi: 10.21775/cimb.028.014)
- Li X, Wang Y, Wang H, Huang C, Huang Y, Li J. Endoplasmic reticulum stress is the crossroads of autophagy, inflammation, and apoptosis signaling pathways and participates in liver fibrosis. *Inflamm Res* 2015; 64: 1-7 (doi: 10.1007/s00011-014-0772-y)
- Li Z, Berk M, McIntyre TM, Gores GJ, Feldstein AE. The lysosomal-mitochondrial axis in free fatty acid-induced hepatic lipotoxicity. *Hepatology* 2008; 47: 1495-1503 (doi: 10.1002/hep.22183)
- Liakos A, Karagiannis T, Athanasiadou E, Sarigianni M, Mainou M, Papatheodorou K et al. Efficacy and safety of empagliflozin for type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Obes Metab* 2014; 16: 984-993 (doi: 10.1111/dom.12307)
- Lonardo A, Nascimbeni F, Maurantonio M, Marrazzo A, Rinaldi L, Adinolfi LE. Nonalcoholic fatty liver disease: Evolving paradigms. *World J Gastroenterol* 2017; 23: 6571-6592 (doi: 10.3748/wjg.v23.i36.6571)
- Longuet C, Sinclair EM, Maida A, Baggio LL, Maziarz M, Charron MJ et al. The glucagon receptor is required for the adaptive metabolic response to fasting. *Cell Metab* 2008; 8: 359-371 (doi: 10.1016/j.cmet.2008.09.008)
- Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* 1980; 55: 434-438 (doi: 10.1016/j.mcp.2008.09.008)
- Ma Y, Brewer JW, Diehl JA, Hendershot LM. Two distinct stress signaling pathways converge upon the CHOP promoter during the mammalian unfolded protein response. *J Mol Biol* 2002; 318: 1351-1365 (doi: 10.1006/jmb.2002.2500)
- Machado MV, Diehl AM. Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology* 2016; 150: 1769-1777 (doi: 10.1053/j.gastro.2016.02.066)

- Madaan T, Akhtar M, Najmi AK. Sodium glucose CoTransporter 2 (SGLT2) inhibitors: Current status and future perspective. *Eur J Pharm Sci* 2016; 93: 244-252 (doi: 10.1016/j.ejps.2016.08.025)
- Mandard S, Muller M, Kersten S. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61: 393-416 (doi: 10.1007/s00018-003-3216-3)
- Mandarim-de-Lacerda CA. Stereological tools in biomedical research. *An Acad Bras Cienc* 2003; 75: 469-486 (doi:
- Marinho TS, Kawasaki A, Bryntesson M, Souza-Mello V, Barbosa-da-Silva S, Aguila MB et al. Rosuvastatin limits the activation of hepatic stellate cells in diet-induced obese mice. *Hepato Res* 2017; 47: 928-940 (doi: 10.1111/hepr.12821)
- Marra F, Svegliati-Baroni G. Lipotoxicity and the gut-liver axis in NASH pathogenesis. *J Hepato* 2018; 68: 280-295 (doi: 10.1016/j.jhep.2017.11.014)
- Matsusue K. A physiological role for fat specific protein 27/cell death-inducing DFF45-like effector C in adipose and liver. *Biol Pharm Bull* 2010; 33: 346-350 (doi:
- Michel MC, Mayoux E, Vallon V. A comprehensive review of the pharmacodynamics of the SGLT2 inhibitor empagliflozin in animals and humans. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2015; 388: 801-816 (doi: 10.1007/s00210-015-1134-1)
- Moryani R, Shah HK, Doctor N, Gheewala G, Barfiwala V. Metabolic syndrome & insulin resistance in general population. *J Assoc Physicians India* 2016; 64: 74 (doi:
- Motamed N, Rabiee B, Poustchi H, Dehestani B, Hemasi GR, Khonsari MR et al. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and 10-year risk of cardiovascular diseases. *Clin Res Hepato Gastroenterol* 2017; 41: 31-38 (doi: 10.1016/j.clinre.2016.07.005)
- Musso G, Cassader M, Rosina F, Gambino R. Impact of current treatments on liver disease, glucose metabolism and cardiovascular risk in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a systematic review and meta-analysis of randomised trials. *Diabetologia* 2012a; 55: 885-904 (doi: 10.1007/s00125-011-2446-4)
- Musso G, Gambino R, Cassader M, Pagano G. A novel approach to control hyperglycemia in type 2 diabetes: sodium glucose co-transport (SGLT) inhibitors: systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Ann Med* 2012b; 44: 375-393 (doi: 10.3109/07853890.2011.560181)
- Neeland IJ, McGuire DK, Chilton R, Crowe S, Lund SS, Woerle HJ et al. Empagliflozin reduces body weight and indices of adipose distribution in

- patients with type 2 diabetes mellitus. *Diab Vasc Dis Res* 2016; 13: 119-126 (doi: 10.1177/1479164115616901)
- Nielsen TS, Jessen N, Jorgensen JO, Moller N, Lund S. Dissecting adipose tissue lipolysis: molecular regulation and implications for metabolic disease. *J Mol Endocrinol* 2014; 52: R199-222 (doi: 10.1530/JME-13-0277)
- Nishino N, Tamori Y, Tateya S, Kawaguchi T, Shibakusa T, Mizunoya W et al. FSP27 contributes to efficient energy storage in murine white adipocytes by promoting the formation of unilocular lipid droplets. *J Clin Invest* 2008; 118: 2808-2821 (doi: 10.1172/JCI34090)
- Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ* 2004; 11: 381-389 (doi: 10.1038/sj.cdd.4401373)
- Pagano C, Soardo G, Esposito W, Fallo F, Basan L, Donnini D et al. Plasma adiponectin is decreased in nonalcoholic fatty liver disease. *Eur J Endocrinol* 2005; 152: 113-118 (doi: 10.1038/eurj.2005.152.113-118)
- Perona JS. Membrane lipid alterations in the metabolic syndrome and the role of dietary oils. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 2017; 1859: 1690-1703 (doi: 10.1016/j.bbamem.2017.04.015)
- Pettinelli P, Videla LA. Up-regulation of PPAR-gamma mRNA expression in the liver of obese patients: an additional reinforcing lipogenic mechanism to SREBP-1c induction. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96: 1424-1430 (doi: 10.1210/jc.2010-2129)
- Poudel RR. Renal glucose handling in diabetes and sodium glucose cotransporter 2 inhibition. *Indian J Endocrinol Metab* 2013; 17: 588-593 (doi: 10.4103/2230-8210.113725)
- Puri P, Baillie RA, Wiest MM, Mirshahi F, Choudhury J, Cheung O et al. A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2007; 46: 1081-1090 (doi: 10.1002/hep.21763)
- Rasheva VI, Domingos PM. Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Apoptosis* 2009; 14: 996-1007 (doi: 10.1007/s10495-009-0341-y)
- Ratziu V, Bellentani S, Cortez-Pinto H, Day C, Marchesini G. A position statement on NAFLD/NASH based on the EASL 2009 special conference. *J Hepatol* 2010; 53: 372-384 (doi: 10.1016/j.jhep.2010.04.008)
- Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 1993; 123: 1939-1951 (doi: 10.1093/jn/123.11.1939)
- Ress C, Kaser S. Mechanisms of intrahepatic triglyceride accumulation. *World J Gastroenterol* 2016; 22: 1664-1673 (doi: 10.3748/wjg.v22.i4.1664)

- Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 519-529 (doi: 10.1038/nrm2199)
- Rosqvist F, Iggman D, Kullberg J, Cedernaes J, Johansson HE, Larsson A et al. Overfeeding polyunsaturated and saturated fat causes distinct effects on liver and visceral fat accumulation in humans. *Diabetes* 2014; 63: 2356-2368 (doi: 10.2337/db13-1622)
- Sattar N, Fitchett D, Hantel S, George JT, Zinman B. Empagliflozin is associated with improvements in liver enzymes potentially consistent with reductions in liver fat: results from randomised trials including the EMPA-REG OUTCOME(R) trial. *Diabetologia* 2018; 61: 2155-2163 (doi: 10.1007/s00125-018-4702-3)
- Schadinger SE, Bucher NL, Schreiber BM, Farmer SR. PPARgamma2 regulates lipogenesis and lipid accumulation in steatotic hepatocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 288: E1195-1205 (doi: 10.1152/ajpendo.00513.2004)
- Scheen AJ. Effects of reducing blood pressure on cardiovascular outcomes and mortality in patients with type 2 diabetes: Focus on SGLT2 inhibitors and EMPA-REG OUTCOME. *Diabetes Res Clin Pract* 2016; 121: 204-214 (doi: 10.1016/j.diabres.2016.09.016)
- Scheen AJ, Van Gaal LF. Combating the dual burden: therapeutic targeting of common pathways in obesity and type 2 diabetes. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2014; 2: 911-922 (doi: 10.1016/S2213-8587(14)70004-X)
- Sharp KPH, Schultz M, Coppell KJ. Is non-alcoholic fatty liver disease a reflection of what we eat or simply how much we eat? *JGH Open* 2018; 2: 59-74 (doi: 10.1002/jgh3.12040)
- Shen J, Chen X, Hendershot L, Prywes R. ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev Cell* 2002; 3: 99-111 (doi: 10.1016/S1534-5807(02)00011-1)
- Shimomura I, Bashmakov Y, Horton JD. Increased levels of nuclear SREBP-1c associated with fatty livers in two mouse models of diabetes mellitus. *J Biol Chem* 1999; 274: 30028-30032 (doi: 10.1074/jbc.274.50.30028)
- Shore GC, Papa FR, Oakes SA. Signaling cell death from the endoplasmic reticulum stress response. *Curr Opin Cell Biol* 2011; 23: 143-149 (doi: 10.1016/j.ceb.2010.11.003)
- Sidossis LS, Stuart CA, Shulman GI, Lopaschuk GD, Wolfe RR. Glucose plus insulin regulate fat oxidation by controlling the rate of fatty acid entry into the mitochondria. *J Clin Invest* 1996; 98: 2244-2250 (doi: 10.1172/JCI119034)
- Sporea I, Popescu A, Dumitrascu D, Brisc C, Nedelcu L, Trifan A et al. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Status Quo. *J Gastrointest Liver Dis* 2018; 27: 439-448 (doi: 10.15403/jgld.2014.1121.274.quo)

- Stojsavljevic S, Gomercic Palcic M, Virovic Jukic L, Smircic Duvnjak L, Duvnjak M. Adipokines and proinflammatory cytokines, the key mediators in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 18070-18091 (doi: 10.3748/wjg.v20.i48.18070)
- Storlien LH, Jenkins AB, Chisholm DJ, Pascoe WS, Khouri S, Kraegen EW. Influence of dietary fat composition on development of insulin resistance in rats. Relationship to muscle triglyceride and omega-3 fatty acids in muscle phospholipid. *Diabetes* 1991; 40: 280-289 (doi: 10.1016/j.addr.2018.01.009)
- Su Q, Kumar V, Sud N, Mahato RI. MicroRNAs in the pathogenesis and treatment of progressive liver injury in NAFLD and liver fibrosis. *Adv Drug Deliv Rev* 2018; 129: 54-63 (doi: 10.1016/j.addr.2018.01.009)
- Tahara A, Kurosaki E, Yokono M, Yamajuku D, Kihara R, Hayashizaki Y et al. Effects of SGLT2 selective inhibitor ipragliflozin on hyperglycemia, hyperlipidemia, hepatic steatosis, oxidative stress, inflammation, and obesity in type 2 diabetic mice. *Eur J Pharmacol* 2013; 715: 246-255 (doi: 10.1016/j.ejphar.2013.05.014)
- Targett-Adams P, McElwee MJ, Ehrenborg E, Gustafsson MC, Palmer CN, McLauchlan J. A PPAR response element regulates transcription of the gene for human adipose differentiation-related protein. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1728: 95-104 (doi: 10.1016/j.bbaexp.2005.01.017)
- Tikkanen I, Narko K, Zeller C, Green A, Salsali A, Broedl UC et al. Empagliflozin reduces blood pressure in patients with type 2 diabetes and hypertension. *Diabetes Care* 2015; 38: 420-428 (doi: 10.2337/dc14-1096)
- Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 772-783 (doi: 10.1038/nri1937)
- Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology* 2010; 52: 1836-1846 (doi: 10.1002/hep.24001)
- Turner RJ, Moran A. Heterogeneity of sodium-dependent D-glucose transport sites along the proximal tubule: evidence from vesicle studies. *Am J Physiol* 1982; 242: F406-414 (doi: 10.1152/ajprenal.1982.242.4.F406)
- Vallon V, Thomson SC. Targeting renal glucose reabsorption to treat hyperglycaemia: the pleiotropic effects of SGLT2 inhibition. *Diabetologia* 2017; 60: 215-225 (doi: 10.1007/s00125-016-4157-3)
- Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther* 2011; 34: 274-285 (doi: 10.1111/j.1365-2036.2011.04724.x)

- Wang X, Cao Y, Fu Y, Guo G, Zhang X. Liver fatty acid composition in mice with or without nonalcoholic fatty liver disease. *Lipids Health Dis* 2011; 10: 234 (doi: 10.1186/1476-511X-10-234)
- Wei Y, Wang D, Gentile CL, Pagliassotti MJ. Reduced endoplasmic reticulum luminal calcium links saturated fatty acid-mediated endoplasmic reticulum stress and cell death in liver cells. *Mol Cell Biochem* 2009; 331: 31-40 (doi: 10.1007/s11010-009-0142-1)
- Westerbacka J, Lammi K, Hakkinen AM, Rissanen A, Salminen I, Aro A et al. Dietary fat content modifies liver fat in overweight nondiabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 2804-2809 (doi: 10.1210/jc.2004-1983)
- White JR, Jr. Empagliflozin, an SGLT2 inhibitor for the treatment of type 2 diabetes mellitus: a review of the evidence. *Ann Pharmacother* 2015; 49: 582-598 (doi: 10.1177/1060028015573564)
- Wright EM, Loo DD, Hirayama BA. Biology of human sodium glucose transporters. *Physiol Rev* 2011; 91: 733-794 (doi: 10.1152/physrev.00055.2009)
- Xu L, Nagata N, Nagashimada M, Zhuge F, Ni Y, Chen G et al. SGLT2 Inhibition by Empagliflozin Promotes Fat Utilization and Browning and Attenuates Inflammation and Insulin Resistance by Polarizing M2 Macrophages in Diet-induced Obese Mice. *EBioMedicine* 2017; 20: 137-149 (doi: 10.1016/j.ebiom.2017.05.028)
- Yki-Jarvinen H. Non-alcoholic fatty liver disease as a cause and a consequence of metabolic syndrome. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2014; 2: 901-910 (doi: 10.1016/S2213-8587(14)70032-4)
- Yoshida H. ER stress and diseases. *FEBS Journal* 2007; 274: 630-658 (doi: 10.1016/j.febslet.2007.05.028)
- Younossi Z, Anstee QM, Marietti M, Hardy T, Henry L, Eslam M et al. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2018; 15: 11-20 (doi: 10.1038/nrgastro.2017.109)
- Younossi ZM, Blissett D, Blissett R, Henry L, Stepanova M, Younossi Y et al. The economic and clinical burden of nonalcoholic fatty liver disease in the United States and Europe. *Hepatology* 2016a; 64: 1577-1586 (doi: 10.1002/hep.28785)
- Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* 2016b; 64: 73-84 (doi: 10.1002/hep.28431)
- Zelber-Sagi S, Lotan R, Shibolet O, Webb M, Buch A, Nitzan-Kaluski D et al. Non-alcoholic fatty liver disease independently predicts prediabetes during a 7-year prospective follow-up. *Liver Int* 2013; 33: 1406-1412 (doi: 10.1111/liv.12200)



Zhou H, Liu R. ER stress and hepatic lipid metabolism. *Front Genet* 2014; 5: 112 (doi: 10.3389/fgene.2014.00112)

Zinman B, Wanner C, Lachin JM, Fitchett D, Bluhmki E, Hantel S et al. Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med* 2015; 373: 2117-2128 (doi: 10.1056/NEJMoa1504720)

## ANEXO A – Comitê de Ética



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO  
DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA)

**ibrag** Instituto  
de Biologia  
Roberto  
Alcantara  
Gomes

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos do inibidor seletivo do SGLT2, empagliflozina, em modelo experimental de esteatose hepática", registrada com o nº 031/2017, sob a responsabilidade de Sandra Barbosa da Silva - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA) do Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes da UERJ, em reunião de 25/07/2017.

Finalidade	( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	25/07/2021
Espécie/linhagem/raça	Camundongo C57BL/6
Nº de animais	50
Peso/idade	20 g / 3 meses
Sexo	Macho
Origem	Biotério setorial

Rio de Janeiro, 25 de Julho de 2017.

Prof. Dr. Alex C. Manhães  
Coordenador  
CEUA/IBRAG/UERJ

Profa. Dra. Patricia C. Lisboa  
Vice-Coordenadora  
CEUA/IBRAG/UERJ

**ANEXO B - Submissão do artigo**

O artigo solicitado pela pós-graduação como requisito parcial para defesa está em fase final de elaboração e será submetido antes da data de defesa, conforme regra do programa.