

Lucas de Moura Carvalho

Perfil de metilação do DNA de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico com e sem
excesso de peso: estudo exploratório

São Paulo

2024

Lucas de Moura Carvalho

Perfil de metilação do DNA de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico com e sem
excesso de peso: estudo exploratório

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Programa de Ciências do Sistema
Musculoesquelético.

Orientadora: Profa. Dra. Carolina Nicoletti Ferreira
Fino

(Versão corrigida. Resolução CoPGr nº 6018, de 13 de outubro de 2011. A versão original
está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo

2024

FICHA CATALOGRÁFICA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Carvalho, Lucas de Moura

Perfil de metilação do DNA de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico com e sem excesso de peso : estudo exploratório / Lucas de Moura Carvalho; Carolina Nicoletti Ferreira Fino, orientadora. -- São Paulo, 2024.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Ciências do Sistema Musculoesquelético. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2024.

1. Lúpus eritematoso sistêmico 2. Inflamação 3. Obesidade 4. Tecido adiposo 5. Metilação do DNA 5. Epigenética I. Fino, Carolina Nicoletti Ferreira, orient. II. Título

USP/FM/DBD-184/24

Responsável: Daniela Amaral Barbosa, CRB-8 7533

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Lucas de Moura Carvalho

Perfil de metilação do DNA de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico com e sem excesso de peso: estudo exploratório

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

Programa de Ciências do Sistema Musculoesquelético.

Aprovado em: 12 de Julho de 2024

Banca Examinadora

Profª. Dra. **Fabiana Braga Benatti**
Instituição: Faculdade de Medicina – Universidade de São Paulo
Julgamento: Aprovado

Profª. Dra. **Carla Barbosa Nonino**
Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo
Julgamento: Aprovado

Profª. Dra. **Maria Aderuza Horst**
Instituição: Faculdade de Nutrição – Universidade Federal de Goiás
Julgamento: Aprovado

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Carolina Nicoletti, que nos anos de convivência, muito me ensinou e impulsionou para o meu crescimento profissional e pessoal.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelas concessão de bolsas de mestrado e estágio de pesquisa no exterior.

À equipe responsável pelo Laboratório de Avaliação e Condicionamento em Reumatologia (LACRE), pelo suporte e ensinamentos.

À equipe responsável pelo Ambulatório de Lúpus Adulto do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, em especial ao Professor Dr. Eduardo Ferreira Borba Neto, pelo acolhimento e instruções.

À minha equipe, Amanda, Beatriz, Jhulia e Letícia, pela amizade e a oportunidade de tornar toda esta jornada leve e prazerosa.

Ao meu companheiro Ed, pelo suporte, amor e cuidado em todos os momentos.

À minha família, pelo apoio e amor.

RESUMO

Carvalho LM. Perfil de metilação do DNA de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico com e sem excesso de peso: estudo exploratório [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2024.

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença inflamatória autoimune cuja fisiopatologia envolve a interação de fatores ambientais, hormonais, genéticos e epigenéticos. Estudos têm revelado um perfil de hipometilação do DNA em pacientes com LES, especialmente em células e vias do sistema imune. A literatura aponta que o excesso de peso nesses pacientes pode acarretar uma maior atividade da doença, com piora da qualidade de vida e aumento do risco de doenças cardiovasculares. Apesar de já ser descrito que o excesso de peso e obesidade também modulam o perfil de metilação do DNA, estudos sobre modificações epigenéticas no binômio LES e excesso de peso ainda são escassos. Assim, o presente estudo transversal e exploratório teve como objetivo avaliar se existe um perfil epigenético específico em pacientes com LES com excesso de peso e com peso adequado. Selecionou-se 51 pacientes do sexo feminino, no período pré-menopausa, com idade entre 18 e 45 anos, atividade da doença controlada, sob tratamento com prednisona em dosagem <10 mg/dia e sob tratamento com cloroquina em dose estável. As pacientes foram divididas em dois grupos de acordo com o estado nutricional segundo o índice de massa corporal (IMC): grupo EUT composto por 23 pacientes com peso adequado (IMC entre 18,5 e 24,9 kg/m²) e grupo EP composto por 28 pacientes com excesso de peso (IMC >25 kg/m²). Avaliou-se parâmetros sociodemográficos, clínicos, bioquímicos, hematológicos, imunológicos e inflamatórios. Para análise de metilação do DNA e expressão gênica coletou-se amostra de tecido adiposo subcutâneo abdominal por procedimento de biópsia. A análise de metilação do DNA foi conduzida com o ensaio *Infinium Human Methylation EPIC Beadchip* (Illumina), considerando mudanças no nível de metilação de cada CpGs com valor mínimo de 5%, $p < 0,001$ e taxa de falsa descoberta <0,05. A análise da expressão dos genes alvos foi realizada por reação em cadeia de polimerase, utilizando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. O grupo EP apresentou valores IMC, percentual de gordura, frações de colesterol total e porcentagem de linfócitos superiores ao grupo EUT. Em contrapartida, concentrações séricas de ácido fólico foram menores no grupo EP. Observou-se 28.577 sítios CpGs diferencialmente metilados entre os grupos (36,6% na região promotora). Destes, 3.730 CpGs estavam hipometilados em pacientes com excesso de peso e foram relacionados a via metabólica da autoimunidade e interação das citocinas com seus receptores. Por outro lado, 3.342 CpGs estavam hipermetilados em pacientes do grupo EP, sendo relacionados ao metabolismo e degradação de ácidos graxos. Observou-se maiores níveis de expressão de *DNMT1*, *TNF- α* , *IL-6*, *LEP*, *ADIPOQ* nos pacientes do grupo EP. Pacientes com LES e excesso de peso apresentam uma assinatura epigenética distinta daqueles com peso adequado, a qual pode estar relacionada as manifestações da doença.

Palavras-chave: Lúpus eritematoso sistêmico. Inflamação. Obesidade. Tecido adiposo. Metilação do DNA. Epigenética.

ABSTRACT

Carvalho LM: DNA Methylation profile of patients with systemic lupus erythematosus and normal weight or excess body weight: an exploratory study [dissertation]. São Paulo: Faculty of Medicine, University of São Paulo; 2024.

Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune inflammatory disease whose pathophysiology involves the interaction of environmental, hormonal, genetic, and epigenetic factors. Studies have revealed a profile of DNA hypomethylation in SLE patients, especially in cells and pathways related to immune system. The literature suggests that excess body weight in these patients may lead to increased disease activity, worsening quality of life, and elevated risk of cardiovascular diseases. Despite the known modulation of DNA methylation profiles by overweight and obesity, studies on epigenetic modifications in the context of SLE and excess body weight remain scarce. Therefore, this cross-sectional and exploratory study aimed to assess whether there is a specific epigenetic profile in SLE patients with excess weight or normal weight. Fifty-one premenopausal female patients, aged 18 to 45 years, with controlled disease activity, under treatment with prednisone with dose <10 mg/day, and stable chloroquine dose, were enrolled. Patients were divided into two groups based on body mass index (BMI): the normal weight group consisting of 23 patients with BMI between 18.5 and 24.9 kg/m², and the excess weight group consisting of 28 patients with BMI >25 kg/m². Sociodemographic, clinical, biochemical, hematological, immunological, and inflammatory parameters were evaluated. For DNA methylation and gene expression analysis, samples of abdominal subcutaneous adipose tissue were collected by biopsy. DNA methylation analysis was performed using the Infinium Human Methylation EPIC Beadchip assay (Illumina), considering changes in methylation levels of each CpG with a minimum value of 5%, $p < 0.001$, and false discovery rate <0.05. Gene expression analysis of target genes was performed by polymerase chain reaction, using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. The excess weight group showed higher BMI, percentage of body fat, total cholesterol fractions, and lymphocyte percentage compared to the normal weight group. Conversely, serum concentrations of folic acid were lower in the excess weight group. A total of 28,577 CpG sites were differentially methylated between the groups (36.6% in the promoter region). Of these, 3,730 CpG sites were hypomethylated in patients with excess weight and were associated with the autoimmunity and cytokine-receptor interaction pathway. On the other hand, 3,342 CpG sites were hypermethylated in patients of the excess weight group and were related to the metabolism and degradation of fatty acids. Also, higher levels of *DNMT1*, *TNF- α* , *IL-6*, *LEP*, and *ADIPOQ* expression were observed in patients of the excess weight group. Patients with SLE and excess body weight show a unique epigenetic signature than patients with normal weight, which may be related to disease's clinical manifestation.

Key words: Systemic lupus erythematosus. Inflammation. Obesity. Adipose tissue. DNA methylation. Epigenetics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Principais fatores etiológicos e manifestações clínicas do lúpus eritematoso sistêmico.....	23
Figura 2 - Remodelamento do tecido adiposo no ganho excessivo de peso.	30
Figura 3 - Processo de metilação do DNA, mediado por DNA metiltransferase.	32
Figura 4 - Esquema representativo do desenho experimental.....	42
Figura 5 - Aferição de medidas antropométricas.....	43
Figura 6 - Preparação das amostras de DNA em lâmina para a hibridização.....	47
Figura 7 - Fluxograma de etapas de inclusão e exclusão de pacientes para a participação do estudo.....	52
Figura 8 - Distribuição de pacientes que apresentaram concentrações séricas dos marcadores do perfil lipídico fora dos parâmetros de normalidade.....	54
Figura 9 - Valores relativos de níveis séricos de IL-17, IL-2, IL-6, TNF- α , leptina e adiponectina em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e peso adequado ou com excesso de peso.	56
Figura 10 - Heatmap das CpGs diferentemente metiladas entre pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e peso adequado ou excesso de peso.	57
Figura 11 - Caracterização dos sítios CpG diferentemente metiladas entre pacientes com LES e peso adequado ou excesso de peso.	57
Figura 12 - Expressão relativa dos genes DNMT1, TNF- α , IL-6, LEP, ADIPOQ e STAT3 em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e peso adequado ou excesso de peso.	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Variáveis antropométricas e da composição corporal de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e peso adequado ou com excesso de peso incluídas no presente estudo (n = 51).	53
Tabela 2 - Dados sociodemográfico de pacientes com LES e peso adequado ou com excesso de peso incluídas no presente estudo (n = 51).	54
Tabela 3 - Dados bioquímicos, hematológicos e imunológicos de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e peso adequado ou com excesso de peso incluídas no presente estudo (n = 51).	55
Tabela 4 - Os 20 principais sítios CpGs diferentemente metilados entre pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e peso adequado ou com excesso de peso.....	59
Tabela 5 - Vias metabólicas associadas aos sítios CpGs hipometilados em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e excesso de peso quando comparado ao peso adequado.	60
Tabela 6 - Vias metabólicas associadas aos sítios CpGs hipermetilados em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e excesso de peso quando comparado ao peso adequado.	60

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Questionário para confirmação da inclusão da paciente no estudo.	41
Quadro 2 - Parâmetros bioquímicos, hematológicos e imunológicos analisados e respectivos métodos de quantificação e valores de referência.	45
Quadro 3 - Genes alvos e respectivas sondas utilizadas nos experimentos.	49

LISTA DE SIGLAS

ACAA1	Acetil-CoA aciltransferase 1
<i>ACTB</i>	Gene Beta-actina
AdipoR1	Receptor de adiponectina do tipo 1
AdipoR2	Receptor de adiponectina do tipo 2
ANA	Anticorpos antinucleares
anti-dsDNA	Anticorpos anti-DNA de cadeia dupla
Anti-P	Anticorpos antiproteína P ribossomal
anti-Ro	Anticorpo anti Ro
Anti-SM	Anticorpo anti-Smith
AP-1	Proteína ativadora 1
ATP	Adenosina trifosfato
B2GPI	Beta2-glicoproteína I
CAAE	Certificado de Apresentação de Apreciação Ética
CCL21	Ligante de quimiocina 21
CCR7	Receptor de quimiocina do tipo 7
<i>FAT/CD36</i>	Gene Translocase de ácidos graxos
cDNA	DNA complementar
CH ₃	Grupo metil
CHCM	Concentração da hemoglobina corpuscular média
CO ₂	Dióxido de carbono
CPT-1	Carnitina aciltransferase-1
DC	Dobras cutâneas
DHL/LDH	Desidrogenase láctica/lactato desidrogenase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNMT	DNA metiltransferase
DNMT1	DNA metiltransferase 1
DNMT3A	DNA metiltransferase 3A
DNMT3B	DNA metiltransferase 3B
DP	Desvio padrão
dsDNA	Fita dupla de DNA
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético

EF	Ensino fundamental
PPRE	Gene Elemento de resposta do proliferador de peroxissoma
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
EM	Ensino médio
EP	Excesso de peso
EP	Grupo LES com excesso de peso
ES	Ensino superior
EUT	Grupo LES com peso adequado
FABP5	Proteína de ligação a ácidos graxos 5
FDR	Taxa de descoberta falsa
FM-USP	Faculdade de medicina da Universidade de São Paulo
<i>GAPDH</i>	Gene Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HDL	Proteína de alta densidade
<i>IFI44L</i>	Gene Proteína 44 induzida por interferon
IFN's	Interferons
IgG	Imunoglobulina do tipo G
IgM	Imunoglobulina do tipo M
IL	Interleucina
IL-IR	Receptor de interleucina 1
IL-1 β	Interleucina 1-beta
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-13	Interleucina 13
IL-17	Interleucina 17
IL-22	Interleucina 22
IL-23	Interleucina 23
IMC	Índice de massa corporal
LACRE	Laboratório de avaliação e condicionamento em reumatologia
LDL	Lipoproteína de baixa densidade

<i>LEP</i>	Gene Leptina
LES	Lúpus eritematoso sistêmico
<i>LPL</i>	Gene Lipoproteína lipase
<i>LY6G5C</i>	Gene Membro da família do antígeno linfocitário 6 G5C
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
mRNA	RNA mensageiro
<i>MX1</i>	Gene MX Dinamina similares à GTPase 1
não-HDL	n-Lipoproteína de baixa densidade
NK	<i>Natural Killer</i>
NF-κB	Fator nuclear kappa B
<i>PARP9</i>	Gene Membro da família poli (ADP-Ribose) polimerase 9
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCR	Proteína C reativa
PLIN1	Pirilipina 1
PPAR	Proliferadores de peroxissoma
PPARγ	Proliferador de peroxissomo gama
RDW*CV	Largura de distribuição de glóbulos vermelhos – coeficiente de variação
RDW*SD	Largura de distribuição de glóbulos vermelhos – desvio padrão
RNA	Ácido ribonucleico
<i>RNF39</i>	Gene Proteína <i>ring finger</i> 39
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa
SLEDAI	Índice de atividade da doença lúpus eritematoso sistêmico
SLICC	Clínicas colaboradoras internacionais de lúpus sistêmico
<i>STAT3</i>	Gene transdutor de sinal e ativador de transcrição 3
TA	Tecido adiposo
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
Th1	Células T <i>Helper</i> do tipo 1
Th17	Células T <i>Helper</i> do tipo 17
Th2	Células T <i>Helper</i> do tipo 2
TNFR1	Receptor de fator de necrose tumoral do tipo 1
TNFR2	Receptor de fator de necrose tumoral do tipo 2
TNF-α	Fator de necrose tumoral - α

<i>TNXB</i>	Gene tenascina XB
VCM	Volume corpuscular médio
VHS	Velocidade de hemossedimentação
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
VPM	Volume plaquetário médio

LISTA DE SÍMBOLOS

mg	Miligramas
kg/m ²	Quilogramas por metro quadrado
cm	Centímetros
Kg	Quilogramas
g	Gramas
m	Metros
mm	Milímetros
rpm	Rotações por minutos
°C	Graus Celsius
mg/dL	Miligramas por decilitro
pg/mL	Picograma por mililitro
ng/mL	Nanograma por mililitro
mm	Milímetro
U/L	Unidades por litro
milhões/mm ³	Milhões por milímetro cúbico
g/dL	Gramas por decilitro
fL	Fentolitro
mil/mm ³	Mil por milímetro cúbico
UI/mL	Unidade internacional por mililitro
UR/mL	Unidade de referência por mililitro
mL	Mililitro
nm	Nanômetro
ng	Nanograma
µL	Microlitro
Ct	<i>Cycle threshold</i>
mg/d	Miligramas por dia
kb	Mil bases

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1 Lúpus eritematoso sistêmico.....	22
2.2 Tecido adiposo: papel imuno regulador na saúde e na doença	26
2.2.1 Interleucinas	26
2.2.2 Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)	27
2.2.3 Leptina.....	28
2.2.4 Adiponectina.....	28
2.2.5 Remodelamento do tecido adiposo no ganho de peso.....	29
2.3 Mecanismos Epigenéticos: metilação do DNA	31
2.4 Metilação do DNA no LES	31
2.5 Metilação do DNA na obesidade	33
2.6 Binômio LES e obesidade.....	34
3. OBJETIVOS	37
3.1 Primário	37
3.2 Secundários	37
4. PACIENTES E MÉTODOS	39
4.1 Local do estudo e considerações éticas.....	39
4.2 Recrutamento e seleção das participantes.....	39
4.3 Desenho do estudo	41
4.4 Avaliação dos parâmetros sociodemográficos, clínicos e da doença.....	41
4.5 Avaliações antropométricas e de composição corporal	43
4.6 Análises bioquímicas, hematológicas, imunológicas e inflamatórias.....	44
4.6.1 Coleta e processamento de amostras de sangue periférico	44
4.6.2 Análises laboratoriais	44
4.7 Coleta e processamento do tecido adiposo subcutâneo	46
4.8 Análises de metilação do DNA	46
4.8.1 Extração e quantificação de DNA de tecido adiposo	46
4.8.2 Tratamento com bissulfito de sódio	46
4.8.3 Ensaio de metilação do DNA	47
4.9 Análises de expressão gênica	48
4.9.1 Extração e quantificação de RNA de tecido adiposo	48
4.9.2 Síntese de cDNA	48
4.9.3 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR).....	48
4.10 Análises de bioinformática e estatística	49

5. RESULTADOS	52
6. DISCUSSÃO.....	63
7. CONCLUSÃO	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
ANEXO A	93
APÊNDICE A.....	98
APÊNDICE B.....	99

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é reconhecido como uma doença inflamatória de caráter autoimune, que pode acometer regiões pontuais (em estágios iniciais) ou sistêmicas (representados como mau prognóstico e de estágio tardio), prejudicando o pleno funcionamento dos órgãos e seus respectivos sistemas biológicos¹. De maneira geral, a doença possui etiologia desconhecida, mas sabe-se que é desencadeada a partir da ação de autoanticorpos relacionados à antígenos celulares (nucleares e citoplasmáticos), cujo a ligação entre estes elementos promove a ativação exacerbada do sistema imunológico, resultando em uma inflamação progressiva, além do dano tecidual². O conjunto de processos que envolvem a fisiopatologia do LES é associado a interação de diversos fatores, sendo eles ambientais, hormonais e genéticos/epigenéticos^{3,4}. As manifestações clínicas do LES são heterogêneas e podem ser caracterizadas por diversos sintomas, nos quais a intensidade e local de acometimento são tipicamente descritos de acordo com o período de manifestação do quadro inflamatório, incluindo lesões na pele (em maior frequência), nas articulações, em membranas que revestem o coração (pericárdio) e pulmão (pleura), além de alterações renais (nefrites), neuropsiquiátricas e hematológicas (leucopenias, trombocitopenias e eritropenias)^{1,2}.

As alterações no sistema imune no LES são geradas, principalmente, a partir da resposta inflamatória de linfócitos T (do tipo CD4+) auto reativos, no qual uma sequência/cascata de reações desencadeadas por este grupo celular promovem a secreção exacerbada de interleucinas (IL) pró-inflamatórias, como IL-6, IL-2, IL-17, IL-22, culminando no comprometimento tecidual^{5,6}. Além disto, este desequilíbrio imunológico é potencializado pela ativação e ação de autoanticorpos reativos anti-DNA que, ao se ligarem aos antígenos e formarem complexos imunes, podem se depositar em membranas de órgãos-alvo comprometendo a funcionalidade dos mesmos⁷⁻⁹.

Alguns estudos demonstraram a interação do LES a outras doenças como, por exemplo, caquexia¹⁰, diabetes mellitus¹¹, além de excesso de peso e obesidade¹² – que aqui em particular, será o principal objeto de estudo. A obesidade tem papel potencial para a progressão do LES, uma vez que este sinergismo é atribuído ao tecido adiposo (TA), sendo este considerado um dos elementos de maiores modulações imunometabólicas¹⁰⁻¹².

As alterações morfológicas do TA desencadeadas pela obesidade são conduzidas pela sinalização de células imunológicas ativas e secreção de adipocinas importantes, como leptina, adiponectina e resistina¹³. A hipertrofia e hiperplasia da matriz adiposa decorrente do desbalanço energético leva ao crescimento do tecido com conseqüente hipóxia e aumento da

lipólise, promovendo maior circulação de ácidos graxos, além da resistência à insulina e aumento do estresse oxidativo¹⁴⁻¹⁶. Essa inflamação crônica e de baixo grau decorrente do excesso de TA pode representar um mau prognóstico ao LES, com piora da atividade da doença^{17,18}. Entretanto, os achados que descrevem essa associação entre LES e obesidade demonstram-se escassos atualmente, mas já apresentam concordância no que diz respeito a tais interações imunometabólicas¹⁹.

Os mecanismos epigenéticos são as alterações na estrutura do DNA e cromatina responsáveis por modular as atividades de expressão gênica, podendo ser ocasionadas por herança, por meio de efeitos ambientais (e.g. tabagismo, poluição do ar, prática de exercício físico e alimentação) ou decorrentes de alterações metabólicas do próprio organismo como estresse oxidativo e infecções²⁰. As alterações epigenéticas podem ser caracterizadas em: i. modificação de histonas, ocorrendo por reações de acetilação, metilação, ou fosforilação destas proteínas.; ii. metilação de DNA, caracterizado pela inserção de grupos metil (CH₃) ao carbono (5) da citosina, por meio de enzimas denominadas DNA metiltransferases (DNMTs), e iii. RNAs não codificantes que são moléculas de RNA não transcritos, que regulam cerca de 90% da expressão ou silenciamento de genes alvo, ocasionalmente em eventos pós-transcricionais, a partir da degradação do RNA mensageiro (mRNA) ou inibição do processo de tradução de proteínas^{20,21}.

Ademais, diversas evidências apontam uma hipometilação do DNA em pacientes com LES^{5,6,22}, principalmente em genes codificadores de citocinas (IL-4, IL-6, IL-10, IL-13 e IL-17A), o que lhes confere maiores níveis de transcrição de linfócitos T do tipo CD4+, além da produção exacerbada de autoanticorpos e maiores níveis de danos teciduais²².

Portanto, definir as diferenças dos perfis epigenéticos de pacientes com LES e/ou associado ao excesso de peso e obesidade é ainda de grande complexidade, mas necessários, devido a sua total importância para a melhor compreensão dos seus respectivos aspectos imunometabólicos, considerando tanto a influência entre as doenças, abordagem terapêutica de melhor atenuação, a fim de direcionar o método mais assertivo para a condução de melhora do prognóstico individual.

REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Lúpus eritematoso sistêmico

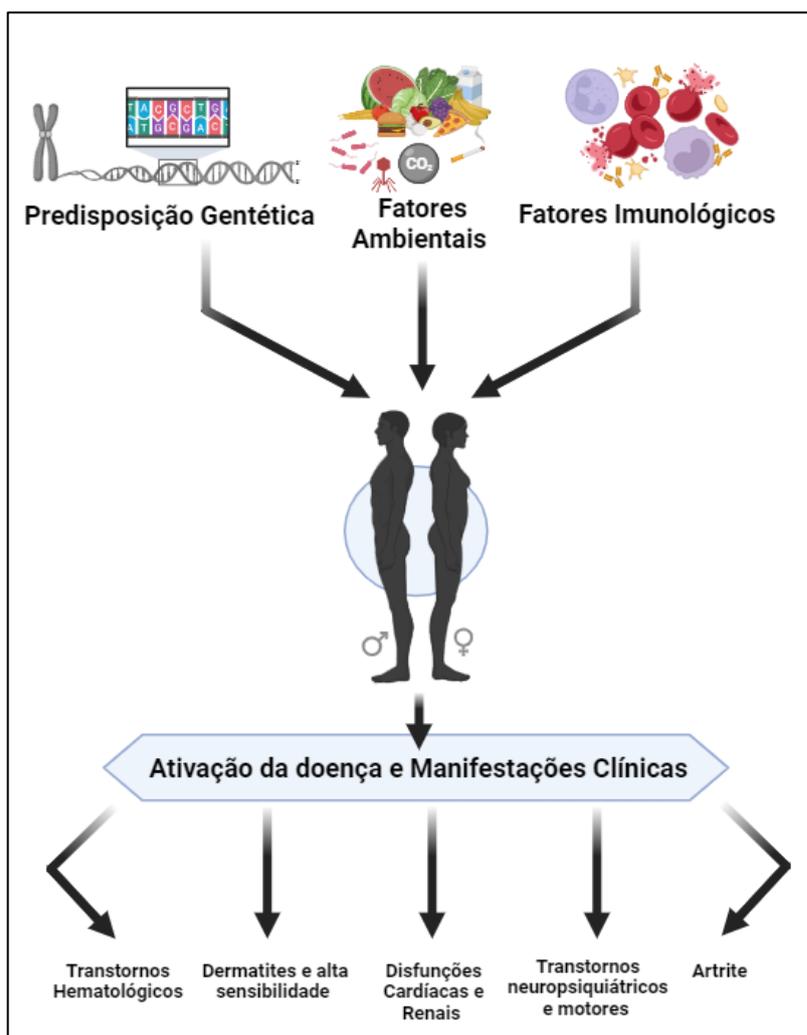
O LES é uma doença reumática inflamatória autoimune, de etiologia desconhecida, que pode afetar vários órgãos e sistemas. De maneira geral, a patologia se estabelece quando o sistema imunológico do indivíduo reconhece como antígeno os próprios tecidos/células saudáveis, desencadeando um processo inflamatório em cascata ². Este evento desencadeia a produção de autoanticorpos, que favorecem a formação de complexos imunes que podem se depositar em vários órgãos e articulações, causando inflamação e danos teciduais ²³. Dentre as manifestações clínicas do LES estão descritos quadros de fadiga, dores articulares e musculares, lesões de pele na face ²⁴ (comumente descrita como “*rash malar*”), sensibilidade à luz solar ²⁵, febres, alopecia, anemia e, em casos mais graves, nefrites ²⁶, complicações cardíacas ²⁷ e respiratórias ²⁸, além de distúrbios neurológicos ²⁹. Essas manifestações podem variar significativamente entre os pacientes de acordo com o período de manifestação do quadro, bem como com a atividade da doença.

O LES afeta desproporcionalmente mulheres jovens e certos grupos étnicos, como negros, hispânicos e asiáticos, que apresentam taxas de incidência e prevalência mais altas do que grupos étnicos brancos ³⁰. Sabe-se que os casos de LES variam consideravelmente entre diferentes regiões geográficas, com uma ampla faixa de incidência e prevalência em todo o mundo. Dados de estudos recentes mostraram que a incidência anual do LES oscilou entre 1,5 e 11 por 100.000 pessoas, enquanto a prevalência global variou entre 7 e 13.000 por 100.000 indivíduos ^{30,31}. Essas diferenças podem ser atribuídas não apenas a variações reais, mas também a diferenças no desenho do estudo, definições de caso e critérios de classificação da doença. Em todo o mundo, pacientes com LES apresentam uma taxa de mortalidade duas a três vezes maior do que a da população em geral, com causas frequentes de morte incluindo doenças infecciosas e doenças cardiovasculares ³¹.

Apesar do LES ainda possuir etiologia desconhecida, sabe-se que a sua ativação, bem como suas manifestações clínicas e progressão da doença se dão a um conjunto de fatores (Figura 1) associados a uma predisposição imune e genética (mutações, epigenética, hereditariedade) associadas ao estilo de vida, como por exemplo, exposição a luz solar (UV), poluição, uso de medicamentos (e.g. hidralazina e procainamida), dieta inadequada, sedentarismo e infecções por patógenos (bactérias, fungos, vírus) ^{3,32}. Dito isto, o processo de

ativação da cascata imune se dá a partir da produção de antígenos pelas células dendríticas, promovendo a resposta inflamatória de linfócitos T CD4+ auto reativos, os quais irão produzir de forma exacerbada citocinas inflamatórias [IL-6, IL-23, IL-22, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)]. Tais citocinas, por sua vez, ativam os linfócitos B responsáveis pela secreção de autoanticorpos antinucleares e citoplasmáticos, gerando uma situação denominada como “*caos metabólico*”, comprometendo a integridade e funcionamento de órgãos, membranas, mucosas e articulações ³³.

Figura 1 - Principais fatores etiológicos e manifestações clínicas do lúpus eritematoso sistêmico.



Fonte: Elaboração própria. CO₂: Dióxido de carbono.

Nesse cenário, estudos demonstraram que indivíduos com LES podem apresentar quadros de diabetes mellitus ³⁴, hipertensão ³⁵, infecções oportunistas ^{36,37} e obesidade ³⁸. Tais distúrbios podem ser potenciais consequências do acometimento motor, estilo de vida limitado, além do tratamento por longos períodos com classes medicamentosas de grandes efeitos

adversos como os glicocorticoides e imunossupressores^{39,40}. Ainda, destaca-se que as doenças cardiovasculares contribuem significativamente para uma maior morbidade e mortalidade associadas à doença, devido a complicações como aterosclerose precoce, doença coronariana, insuficiência cardíaca e acidente vascular cerebral⁴¹. Em paralelo, a obesidade também tem sido identificada como um fator relevante neste contexto do LES, sendo prevalente em cerca de 30 a 40% dos pacientes, associando-se aos agravos metabólicos descritos⁴¹.

O diagnóstico do LES pode ser desafiador devido à apresentação heterogênea da doença, o que pode se sobrepor a outras condições clínicas⁴². Não há um único teste para diagnosticar o LES, sendo necessária uma avaliação abrangente que inclua história clínica detalhada, exames de sangue, imagem, urina e exames físicos. Assim, algumas ferramentas são utilizadas na prática clínica, dentre elas o SLEDAI (em português, Índice de Atividade da Doença Lúpus Eritematoso Sistêmico) e o SLICC (em português, Clínicas Colaboradoras Internacionais de Lúpus Sistêmico)⁴³. O SLEDAI, é uma ferramenta clínica desenvolvida para medir a atividade da doença de indivíduos com LES que avalia uma série de descritores, incluindo, mas não se limitando a: proteinúria, erupções cutâneas, alopecia e lesões de mucosas, que são pontuados com base em sua presença e gravidade⁴⁴. O SLEDAI foi projetado para distinguir entre lesões ativas e crônicas, com o objetivo de fornecer uma medida global da atividade da doença. Além disso, esse índice foi validado como uma ferramenta sensível ao tempo, o que o torna útil para monitorar mudanças na atividade da doença ao longo do envelhecimento do paciente⁴⁵.

Já a ferramenta SLICC (ou SLICC/ACR) é composto por itens que representam danos permanentes e irreversíveis que ocorreram após o diagnóstico de LES. Os itens incluem manifestações clínicas como: infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral ou perda de visão⁴⁶. A pontuação total do SLICC reflete a extensão do dano acumulado ao longo do tempo, fornecendo uma medida objetiva e padronizada do impacto do LES na saúde do paciente, sendo também utilizado como um preditor de mortalidade futura. Portanto, a avaliação do dano por meio do SLICC não apenas fornece informações sobre a extensão do comprometimento do paciente, mas também desempenha um papel crucial na identificação de indivíduos em maior risco de desfechos adversos, permitindo intervenções precoces e direcionadas para melhorar os seus resultados clínicos⁴⁷.

Contudo, para um diagnóstico de maior precisão, monitoramento da atividade da doença e previsão de desfechos clínicos faz-se necessária uma análise complementar de biomarcadores imunológicos⁴⁸. Dentre tais marcadores destaca-se os anticorpos antinucleares (ANA), anticorpos anti-DNA de cadeia dupla (anti-dsDNA), anticorpos contra o antígeno Ro (anti-Ro), além de hemograma, proteína C reativa (PCR), enzimas hepáticas e musculares. A presença de

ANA é um dos critérios de classificação do LES, enquanto a presença de anti-dsDNA e anti-Ro está associada a uma maior atividade da doença e risco de danos teciduais ⁴⁹. Além disso, a avaliação dos marcadores pode ajudar a identificar subgrupos de pacientes com diferentes perfis clínicos e prognósticos, permitindo uma abordagem mais personalizada e direcionada ao tratamento ⁴⁸.

Embora não haja cura para o LES, a progressão da doença pode ser gerenciada com diversas ferramentas como o uso de medicamentos, práticas de exercícios físicos, alimentação, as quais devem ser baseadas nos sintomas e na gravidade da doença ³⁹. Neste sentido, o tratamento do LES visa controlar os sintomas, prevenir complicações e minimizar o dano aos órgãos afetados. Isso geralmente envolve o uso de medicamentos, como glicocorticoides, imunossupressores e medicamentos antimaláricos. Além disso, a gestão do LES muitas vezes requer uma abordagem clínica multidisciplinar envolvendo reumatologistas, dermatologistas, nefrologistas e outros especialistas de acordo com os órgãos afetados ^{50,51}.

Os fármacos antimaláricos, como a hidroxicloroquina, são frequentemente usados como terapia de primeira linha para o LES. Eles atuam no controle da inflamação e na redução da atividade da doença, prevenindo danos aos órgãos. Ainda, este medicamento também pode ajudar a reduzir a dor nas articulações e atenuar a fadiga, melhorando a qualidade de vida ^{51,52}. Os medicamentos da classe de glicocorticoides, como a prednisona, são frequentemente utilizados para controlar a inflamação aguda e suprimir o sistema imunológico. Eles são eficazes no tratamento de sintomas graves, como inflamação do coração, pulmões ou rins ⁵⁰. No entanto, o seu uso prolongado pode levar a efeitos colaterais graves, como osteoporose, diabetes mellitus e aumento do risco de infecções, sendo necessário o monitoramento regular ⁵⁰. Os imunossupressores convencionais, como a azatioprina e o metotrexato, são frequentemente usados para controlar a atividade da doença e prevenir atividade celular maléfica. Eles funcionam suprimindo o sistema imunológico e reduzindo a produção de anticorpos. No entanto, esses medicamentos também podem aumentar o risco de infecções e de outros efeitos colaterais como toxicidade hepática e renal ³⁹. Por fim, os agentes biológicos como o belimumabe e o anifrolumabe são medicamentos mais recentes que visam alvos específicos no sistema imunológico. O belimumabe é um anticorpo monoclonal que inibe a atividade dos linfócitos B, enquanto o anifrolumabe é um anticorpo monoclonal que inibe a atividade dos interferons (IFN's). Esses medicamentos são usados para tratar o LES moderado a grave e podem ser eficazes em pacientes que não respondem a outras terapias ^{53,54}.

Além das terapias medicamentosas, existem várias abordagens não medicamentosas que podem ser úteis no manejo do LES, dentre as principais, cabe aqui destacar as modificações

comportamentais e de estilo de vida, incluindo suporte psicológico, prática de atividade física e alimentação balanceada ⁵⁵. As abordagens não medicamentosas e integrativas podem complementar o tratamento medicamentoso do LES e contribuir para a melhoria da qualidade de vida dos pacientes ⁵⁶.

2.2 Tecido adiposo: papel imuno regulador na saúde e na doença

O TA desempenha um papel fundamental em uma variedade de processos fisiológicos. Primeiramente, é reconhecido como o principal reservatório de energia do corpo, armazenando o excesso de calorias na forma de triglicerídeos ⁵⁷. Além disso, o TA atua na regulação do metabolismo energético, liberando ácidos graxos e outros sinais metabólicos em resposta às demandas do organismo. Essa capacidade de armazenar e liberar energia de forma eficiente é essencial para a manutenção e funcionamento dos sistemas biológicos em condições de escassez calórica ⁵⁸.

Em adição, o TA participa da regulação e secreção de uma variedade de adipocinas e citocinas pró e anti-inflamatórias que influenciam a sensibilidade à insulina em tecidos periféricos ⁵⁹ e atuam no controle da atividade das células imunológicas ⁶⁰. A interação entre o TA e o sistema imunológico é essencial para a modulação da inflamação e para a regulação da resposta imune inata e adaptativa ⁵⁸. Na obesidade, alterações no equilíbrio das adipocinas e citocinas resultam em um sistema imunológico hiperativo, que está associado a distúrbios metabólicos ⁶⁰. Neste sentido faz-se necessário descrever de forma abrangente determinadas adipocinas e outros mediadores inflamatórios que estão vinculados a processos imunorreguladores na obesidade.

2.2.1 Interleucinas

O TA secreta diversos tipos de interleucinas, que são citocinas envolvidas na regulação e sinalização da resposta imunológica e inflamatória. Algumas destas interleucinas incluem características pleiotrópicas, podendo apresentar mecanismos anti/pró-inflamatórios ⁵⁸. Cabe aqui destacar três principais interleucinas associadas ao processo imune do TA: IL-6, IL-2, IL-17.

A IL-6 desempenha uma função multifacetada no organismo, atuando em diversos processos fisiológicos e patológicos. Além do seu papel na resposta imunológica, a IL-6 também está envolvida na regulação metabólica, desempenhando um papel na homeostase

energética, na regulação da glicose e na resposta ao estresse metabólico. Não o bastante, esta citocina está envolvida na ativação e na diferenciação de células imunes, como linfócitos T e células B, e na resposta inflamatória aguda ^{61,62}. Ressalta-se que níveis cronicamente elevados de IL-6 estão associados a condições patológicas. Na obesidade, tanto as células imunológicas residentes no TA contribuem de maneira importante para os níveis circulantes permanentemente elevados de IL-6 ⁶³.

A IL-2 é produzida por células T efectoras em resposta a estímulos antigênicos e é importante para a ativação e proliferação de outras células imunes, incluindo células B e células *natural killer* (NK), assim como na diferenciação de células T em subtipos específicos, como células T *helper* do tipo 1 (Th1) e células T *helper* do tipo 2 (Th2) ⁶⁴. No entanto, a relação da IL-2 com a inflamação associada a obesidade ainda não está totalmente compreendida. Alguns autores evidenciaram uma maior expressão do gene IL-2 no TA de indivíduos com obesidade quando comparada à de indivíduos com peso adequado. Além disso, o aumento dos níveis de IL-2 foi associado a marcadores inflamatórios e resistência à insulina em indivíduos com obesidade ⁶⁵.

Em paralelo, a IL-17 é uma citocina pró-inflamatória que desempenha um papel na resposta imunológica inata e na regulação da inflamação. Ela é produzida por células T *helper* do tipo 17 (Th17) e por outras células imunes, e está envolvida na proteção contra infecções bacterianas e fúngicas. No entanto, concentrações séricas elevadas de IL-17 foram associadas a processos inflamatórios crônicos, distúrbios autoimunes, como artrite reumatoide e psoríase ^{66,67} obesidade ^{68,69}, diabetes mellitus ⁷⁰ e osteoporose ⁷¹.

2.2.2 Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória produzida por várias células, incluindo macrófagos, células T e adipócitos. Em condições normais, o TNF- α é produzido em níveis baixos e desempenha um papel importante na defesa do organismo contra infecções e lesões teciduais. No entanto, em condições patológicas, como a obesidade, o TNF- α é produzido em excesso, contribuindo para a inflamação crônica e a resistência à insulina ⁷². Essa citocina exerce seus efeitos biológicos por meio da ativação de receptores específicos, sendo os principais os receptores do fator de necrose tumoral 1 e 2 (TNFR1 e TNFR2). A ativação desses receptores desencadeia uma cascata de sinalização intracelular que resulta na produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e IL-1 β e na inibição da sinalização da insulina ⁷³.

Nas doenças inflamatórias crônicas, como artrite reumatóide, a superprodução de TNF- α leva a um ambiente inflamatório persistente nas articulações. Esse desequilíbrio na regulação do TNF- α resulta na ativação contínua de células imunes e na liberação de mediadores pró-inflamatórios, levando à destruição progressiva da cartilagem e dos ossos, além de dores crônicas e limitação da função articular ⁷⁴. Ademais, o TNF- α também desempenha um papel complexo em quadros de câncer, influenciando diversos aspectos da fisiopatologia tumoral, no qual pode desencadear respostas pró-inflamatórias que promovem a progressão tumoral, angiogênese e metástase, contribuindo para um microambiente favorável para a evolução da matriz celular desordenada ⁷⁵.

2.2.3 Leptina

A leptina é um hormônio peptídico produzido principalmente pelo TA e desempenha um papel fundamental na regulação do peso corporal e no metabolismo energético ⁷², atuando na regulação do apetite e da saciedade. Nesse sentido, a leptina atua como um sinalizador metabólico que informa ao sistema nervoso sobre os níveis de energia armazenados no TA ⁷⁶. Em condições de abundância de energia, os níveis circulantes de leptina aumentam, suprimindo o apetite, aumentando a atividade metabólica, promovendo a utilização de energia e inibindo o armazenamento de gordura ⁷⁷. Por outro lado, em estados de deficiência de energia, como a restrição calórica, os níveis de leptina diminuem, desencadeando respostas fisiológicas que visam conservar energia, aumentar o apetite e reduzir a atividade metabólica ⁷⁸.

Além de seu papel na regulação do peso corporal, a leptina também desempenha funções em outros sistemas fisiológicos, incluindo a regulação da função reprodutiva, da imunidade e da resposta inflamatória ⁷⁹. A leptina é capaz de modular a imunidade adaptativa e inata, incluindo a produção de citocinas inflamatórias em macrófagos, quimiotaxia de granulócitos e aumento da proliferação de linfócitos Th17 ^{80,81}. Na obesidade, a leptina desempenha um papel crítico na inflamação, promovendo fenótipos imunológicos pró-inflamatórios ⁸¹.

2.2.4 Adiponectina

A adiponectina é um hormônio secretado exclusivamente pelo TA e desempenha um papel importante na regulação do metabolismo energético e da homeostase da glicose ⁸², sendo que as concentrações séricas foram inversamente correlacionadas com o risco de desenvolvimento de doenças metabólicas, como diabetes mellitus tipo 2, resistência à insulina

e doenças cardiovasculares ⁷². Além disto, a adiponectina exerce seus efeitos metabólicos por meio da ativação de receptores específicos, incluindo os receptores 1 e 2 de adiponectina (ADIPOR1 e ADIPOR2) que estão amplamente distribuídos em diferentes tecidos e órgãos ⁸³.

A ligação da adiponectina aos seus receptores promove efeitos benéficos na regulação da glicose e do metabolismo lipídico, aumentando a sensibilidade à insulina e promovendo a oxidação de ácidos graxos ⁸⁴. Além disso, a adiponectina tem propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias e reduzindo o estresse oxidativo, com efeitos protetores na função cardiovascular pela inibição da formação de placas ateroscleróticas e redução do risco de doenças cardiovasculares ^{57,83}. Por outro lado, vários fatores, incluindo obesidade, resistência à insulina e inflamação, podem reduzir os níveis circulantes de adiponectina ⁸³.

2.2.5 Remodelamento do tecido adiposo no ganho de peso

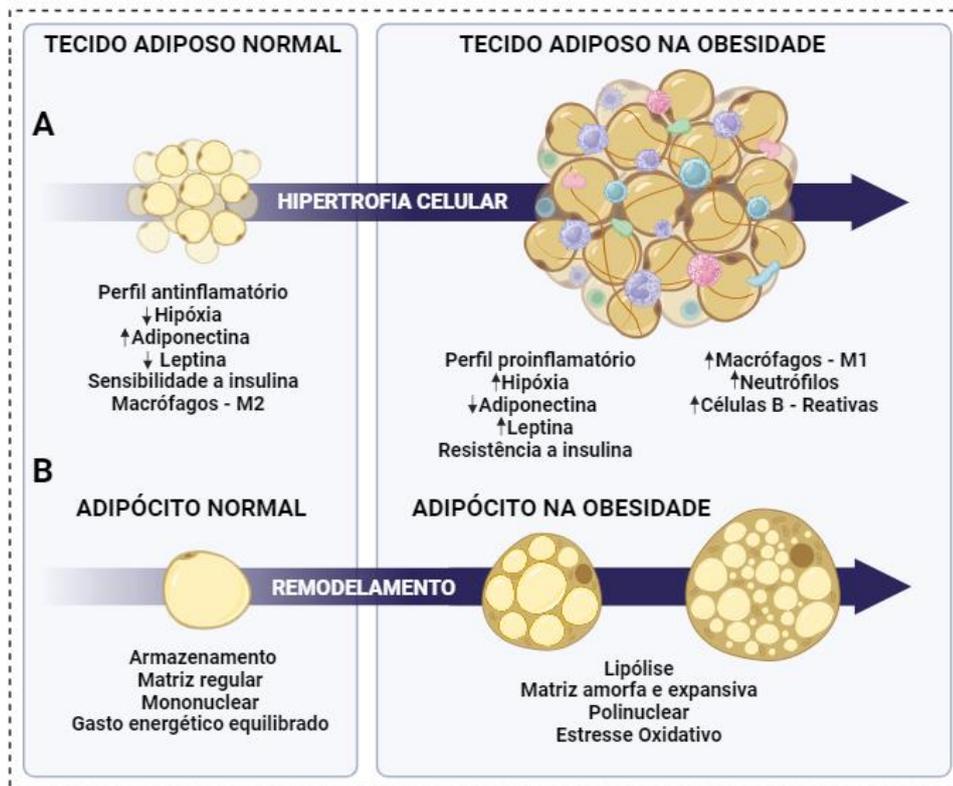
Durante o ganho excessivo de peso ocorre uma expansão e remodelamento do TA, afetando de forma diferencial os depósitos de gordura. O aumento da ingestão calórica e a redução da atividade física levam a um acúmulo excessivo de gordura na região subcutânea, resultando em um aumento no tamanho (hipertrofia) e número de adipócitos (hiperplasia). Esse processo de hipertrofia e hiperplasia adipocitária está associado à disfunção metabólica, contribuindo para o estado inflamatório crônico observado na obesidade ⁸⁵. Além disso, esse remodelamento do TA subcutâneo envolve alterações na matriz extracelular e na vascularização. A expansão do TA subcutâneo requer uma reorganização da matriz extracelular para acomodar o aumento no volume de gordura. A angiogênese, processo de formação de novos vasos sanguíneos é estimulada para fornecer oxigênio e nutrientes aos adipócitos em crescimento. No entanto, a angiogênese desregulada pode resultar em uma rede vascular disfuncional, levando à hipóxia tecidual ¹⁶.

Ainda durante o remodelamento tecidual há formação de adipócitos multinucleados também conhecidos como adipócitos polinucleados. Essas células adiposas apresentam múltiplos núcleos devido à fusão de adipócitos individuais durante o processo de hiperplasia e hipertrofia em resposta ao acúmulo excessivo de gordura. A formação de adipócitos multinucleados é uma característica morfológica associada à expansão descontrolada do TA durante a obesidade e está relacionada à capacidade limitada de novos adipócitos se formarem para armazenar o excesso de energia. Essa alteração na morfologia dos adipócitos também está

associada a mudanças funcionais que contribuem para a disfunção metabólica observada em quadros de obesidade ⁸⁶.

Em consequência deste crescimento exacerbado ocorre à hipóxia local, desencadeando uma resposta inflamatória e a ativação de macrófagos pró-inflamatórios, como os macrófagos M1. Os macrófagos M1 são conhecidos por seu perfil pró-inflamatório, estando mais prevalentes no TA de indivíduos com obesidade. Essas células secretam citocinas inflamatórias, como TNF- α e a IL-6, contribuindo para a instalação de um estado inflamatório crônico no TA. Por outro lado, os macrófagos M2 exibem um perfil anti-inflamatório e estão associados à regulação da homeostase metabólica. Durante a obesidade, ocorre um desequilíbrio na proporção de macrófagos M1:M2, favorecendo a inflamação e a resistência à insulina ^{40,86}. A leptina e a adiponectina desempenham papéis importantes no remodelamento do TA durante o desenvolvimento da obesidade ^{77,83}. Assim, o desequilíbrio na ativação de macrófagos M1 e M2, juntamente com as alterações nos níveis de leptina e adiponectina contribuem para o ambiente inflamatório e disfuncional do TA durante o ganho excessivo de peso (Figura 2).

Figura 2 - Remodelamento do tecido adiposo no ganho excessivo de peso.



Fonte: Elaboração própria. A: Processo de hipertrofia e infiltração de células imunes em TA normal para TA em quadros de obesidade; B: Processo de remodelamento celular do adipócito normal para adipócito na obesidade.

2.3 Mecanismos Epigenéticos: metilação do DNA

Os mecanismos epigenéticos referem-se as alterações hereditárias e reversíveis na expressão gênica que não envolvem mudanças na sequência do DNA, podendo ser modulados por diversos fatores como: dieta, exposição a infecções, atividade física e estresse. Dentre esses mecanismos estão as modificações de histonas (e.g. acetilação, metilação e fosforilação), metilação do DNA e expressão de RNAs não codificantes ⁸⁷.

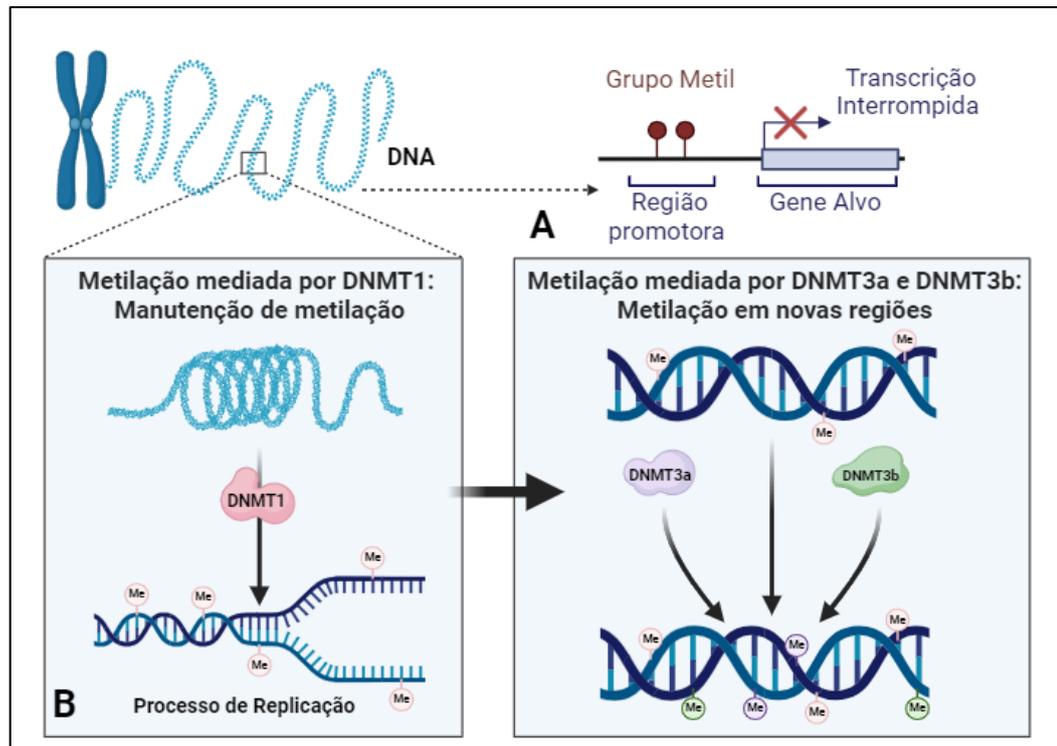
A metilação do DNA, foco do presente estudo, envolve a adição de grupos metil (CH₃) ao carbono 5 de citosinas (5-metilcitosina), geralmente regiões ricas em citosina seguidas por guanina, conhecidas como regiões CpG, podendo influenciar a expressão gênica (Figura 3A) ⁸⁸. Esse processo é mediado por enzimas conhecidas como DNA metiltransferases (DNMTs), sendo as principais DNMT1 e DNMT3 (Figura 3B). A DNMT1 é responsável pela manutenção da metilação do DNA durante a replicação celular, garantindo a herança dos padrões de metilação para as células filhas. Por outro lado, as DNMT3 atuam na metilação *de novo*, adicionando grupos metil em locais previamente não metilados. As DNMTs desempenham um papel fundamental na regulação da expressão gênica, uma vez que a metilação do DNA pode silenciar genes, impedindo a ligação de fatores de transcrição e restringindo a acessibilidade da maquinaria de transcrição aos locais metilados ^{87,89}.

Deste modo, a regulação da metilação do DNA é essencial para o desenvolvimento e função celular adequados. Alterações nos padrões de metilação do DNA estão associadas a diversas condições patológicas, incluindo câncer ⁹⁰, distúrbios neurológicos ⁹¹ e doenças autoimunes ⁹². A compreensão dos mecanismos envolvidos na metilação do DNA e suas consequências patológicas pode fornecer *insights* importantes para o desenvolvimento de terapias direcionadas a distúrbios associados a alterações nos padrões de metilação do genoma ^{93,94}.

2.4 Metilação do DNA no LES

A metilação do DNA desempenha um papel importante no desenvolvimento e na regulação de diversas doenças ^{93,95}, incluindo o LES ⁹⁶. Alguns estudos demonstraram que alterações nos padrões de metilação do DNA estão associadas a diferentes aspectos da doença, como atividade ^{97,98}, seus subtipos ⁹⁹ e resposta a terapia medicamentosa ¹⁰⁰. Assim, a metilação do DNA pode servir como um biomarcador potencial para diferenciar os subtipos de LES e prever a gravidade da doença em pacientes de forma individual ¹⁰¹.

Figura 3 - Processo de metilação do DNA, mediado por DNA metiltransferase.



Fonte: Elaboração própria. A: Silenciamento de um gene a partir da inserção do grupo metil na região promotora do DNA; B: Tipos de metilação mediados pelas enzimas DNMT1, DNMT3A e DNMT3B. Me: grupo metil; DNMT1: DNA metiltransferase 1; DNMT3A: DNA Metiltransferase 3A; DNMT3B: DNA Metiltransferase 3B.

A literatura mostra que pacientes com LES apresentam um perfil de metilação do DNA específico, caracterizado por uma hipometilação do DNA global e em alguns genes relacionados à processos inflamatórios como *IFN*¹⁰², *IL-6*, *IL-4*¹⁰³, *IL-10* e *IL-1R*¹⁰⁴. Por sua vez, a hipometilação do DNA se relaciona a atividade da doença, visto que maior expressão de genes pró-inflamatórios podem conferir uma resposta imune exacerbada, bem como alterações na população celular (T CD4+) responsável pelo controle de processos inflamatórios¹⁰². Estudo comparando o perfil de metilação do DNA e de expressão gênica de pacientes com LES e controles saudáveis evidenciou uma hipometilação global nas células CD4+ T dos pacientes acometidos pela doença. Além disso, as análises de expressão gênica mostraram uma alta expressão de genes relacionados à autoimunidade e perda de tolerância imunológica nos pacientes com LES, indicando um possível papel dessas alterações epigenéticas na patogênese da doença¹⁰⁵.

Em um estudo que avaliou o perfil de metilação do DNA em pacientes com LES de acordo com a gravidade da doença, os autores observaram um perfil de hipometilação em genes relacionados à via de sinalização do interferon. Além disto, alguns genes desse via como o proteína 44 induzida por interferon (*IFI44L*), dinamina MX GTPase 1 (*MX1*) e membro da

família 9 da polimerase (*PARP9*) estavam hipermetilados nos pacientes com formas mais leves da doença em comparação com os grupos mais graves, destacando a relevância da metilação do DNA na diferenciação dos subtipos de LES ⁹⁹. Outro estudo conduzido por Renauer e colegas em 2015 analisaram a metilação do DNA em células CD4+ T de pacientes com LES, comparando aqueles com e sem manifestações cutâneas. Os autores observaram diferenças significativas no padrão de metilação do DNA entre pacientes com histórico de *rash discóide* e *rash malar*, sendo que regiões extensas hipermetiladas foram identificadas em genes como antígeno linfocitário 6 da família G5C (*LY6G5C*) e *ring finger protein 39* (*RNF39*), enquanto uma região hipometilada foi associada ao gene tenascina XB (*TNXB*). Esses resultados sugerem uma associação entre a metilação do DNA e manifestações cutâneas específicas do LES, consolidando a relação entre epigenética e fenótipos clínicos da doença ¹⁰⁶.

Embora as descobertas entre a metilação do DNA e o LES sejam promissoras, ainda há desafios a serem superados para sua implementação clínica. A necessidade de mais pesquisas para validar e aprimorar esses biomarcadores epigenéticos, juntamente com a consideração de fatores como idade, estado nutricional, histórico clínico e separação de tipos celulares, pode contribuir para uma melhor compreensão da patogênese da doença e eventualmente para a personalização do tratamento com base nas características epigenéticas dos pacientes.

2.5 Metilação do DNA na obesidade

Processos epigenéticos do DNA de tecidos de grande representação biológica, como o TA ¹⁰⁷ e o muscular esquelético ¹⁰⁸ têm sido associados a fenótipos relacionados à obesidade, como resistência à insulina e adiposidade ¹⁰⁹. Essas mudanças podem refletir a resposta do organismo juntamente a fatores ambientais, como dieta inadequada e sedentarismo, que podem contribuir para o desenvolvimento do ganho de peso ¹¹⁰. O silenciamento de regiões promotoras de genes associados ao metabolismo energético e à homeostase do peso corporal podem levar a mudanças na atividade transcricional desses genes, impactando diretamente os processos metabólicos e o acúmulo de TA ¹¹¹.

A literatura a respeito da associação entre o perfil de metilação do DNA e a obesidade é ampla, com resultados variados ¹¹²⁻¹¹⁴. Alguns estudos apontam que pacientes com obesidade apresentam regiões diferencialmente metiladas em relação a controles com peso adequado ¹¹²⁻¹¹⁴. Estudo comparando mulheres com peso adequado e obesidade grave evidenciou um perfil de metilação do DNA distinto entre os grupos, caracterizado pela hipermetilação de CpGs nas

mulheres com peso adequado, as quais foram associadas a via metabólica das adipocinas ¹¹³. Por outro lado, menores níveis de metilação do DNA do gene leptina (*LEP*) na mucosa retal e sangue foram evidenciados em indivíduos com obesidade quando comparado ao grupo controle ¹¹⁵. Além disto, a análise do perfil de metilação do DNA em resposta a intervenções como atividade física, cirurgia bariátrica e dietas restritivas mostrou associações significativas entre os níveis de metilação do DNA de genes específicos e a magnitude da perda de peso ^{113,116,117}. Ainda, ElGendy e colaboradores ao avaliar a metilação do DNA após seis meses de cirurgia bariátrica observou que o procedimento cirúrgico normalizou os níveis de metilação do gene *LEP* ¹¹⁵.

2.6 Binômio LES e obesidade

Em termos imunológicos, a obesidade em pacientes com LES pode levar a um estado de inflamação crônica de baixo grau, caracterizado por um aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias e uma resposta imune hiperativa. Essa inflamação crônica pode desencadear ou exacerbar os sintomas do LES, contribuindo para a progressão da doença. Além disso, a obesidade pode regular a resposta imune adaptativa, afetando a ativação e diferenciação de células T e a produção de autoanticorpos, que são marcadores distintivos do LES ¹¹⁸.

No contexto da epigenética, o excesso de peso em pacientes com LES pode influenciar a expressão de genes envolvidos na regulação da resposta imune e na tolerância imunológica. Estudos em modelos animais demonstraram que a dieta pode influenciar a expressão de genes associados à autoimunidade por meio de mecanismos epigenéticos, como a metilação do DNA e a modificação das histonas ¹¹⁹. Além disso, a obesidade em pacientes com LES pode estar associada a mudanças na microbiota intestinal, bem como a permeabilidade intestinal, o que por sua vez pode modular a resposta imune e a inflamação. A composição da microbiota intestinal pode influenciar a ativação do sistema imunológico e a produção de citocinas pró-inflamatórias, desempenhando um papel importante na patogênese do LES. Portanto, a interação entre obesidade, microbiota intestinal e resposta imune pode ser um importante mecanismo subjacente à relação entre obesidade e LES ^{120,121}.

Em suma, a relação entre LES, excesso de peso e epigenética é multifacetada e complexa, envolvendo interações entre fatores genéticos, imunológicos e ambientais. A obesidade pode modular a expressão gênica por meio de mecanismos epigenéticos, influenciando a resposta imune e a inflamação no contexto do LES. Compreender essas interações pode fornecer *insights* importantes para o desenvolvimento de estratégias

terapêuticas personalizadas e direcionadas para pacientes com LES, visando melhorar o manejo e o prognóstico da doença. Nesse sentido, o presente estudo vem abordar a hipótese de que pacientes com LES associado ao excesso de peso apresentam um perfil de metilação do DNA diferente daqueles com LES e peso adequado, caracterizado, principalmente, pela hipometilação de genes pró-inflamatórios.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Primário

Avaliar e comparar de maneira exploratória o perfil de metilação do DNA no tecido adiposo de pacientes com LES com peso adequado ou com excesso de peso.

3.2 Secundários

- Avaliar em pacientes com LES com peso adequado ou com excesso de peso:
 - ✓ Expressão dos genes *DNMT1*, *IL-6*, *STAT3*, *LEP* e *ADIPOQ* no tecido adiposo;
 - ✓ Medidas antropométricas, composição corporal, marcadores inflamatórios, bioquímicos, imunológicos e hematológicos;
- Avaliar se existe uma assinatura epigenética específica de pacientes com LES com excesso de peso.

PACIENTES E MÉTODOS

4. PACIENTES E MÉTODOS

4.1 Local do estudo e considerações éticas

O presente estudo faz parte de um projeto Jovem Pesquisador da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) intitulado “*Progressos em estudos epigenéticos nas doenças reumáticas autoimunes: da bancada a clínica no lúpus eritematoso sistêmico*”.

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os padrões éticos e com a declaração de Helsinque de 1964 e suas posteriores alterações. A aprovação ética foi obtida pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) (CAAE.: 47317521.8.0000.0068). Todas as participantes foram informadas dos benefícios e riscos potenciais de sua participação e assinaram o Termo de consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO A).

Este estudo foi realizado no Laboratório de Avaliação e Condicionamento em Reumatologia (LACRE) do HC-FMUSP e no Centro de Medicina do Estilo de Vida - Laboratório de Fisiologia Aplicada e Nutrição da FMUSP.

4.2 Recrutamento e seleção das participantes

As participantes do estudo foram recrutadas no Ambulatório de Lúpus Adulto da Divisão de Reumatologia do HC-FMUSP. Foram consideradas elegíveis aquelas que atendessem aos critérios de inclusão: 1. sexo feminino; 2. no período pré-menopausa, 3. idade entre 18 e 45 anos; 4. que atendessem aos critérios de classificação SLICC ¹²²; 5. com atividade da doença controlada (pontuação SLEDAI ≤ 4) ¹²³; 6. sob tratamento com prednisona em uma dosagem menor que 10 mg ao dia, 7. sob tratamento com cloroquina em dose estável; 8. não fazer uso de metotrexato, e 9. com índice de massa corporal (IMC) maior que 18,5 kg/m². Pacientes envolvidas em programas de treinamento físico e/ou dietas prescritivas, que fizessem uso de metotrexato, suplementações com vitamina B12 e ácido fólico ou que fizessem uso contínuo de anticoagulantes, não foram consideradas elegíveis para a participação no estudo. Além disto, adotou-se como critérios de exclusão a presença de infecção atual, diabetes mellitus, hipertensão arterial, outras doenças autoimunes, tabagismo e gravidez.

Considerando que o gênero feminino é um forte contribuinte para a fisiopatologia do LES (mulheres são 9 a 10 vezes mais afetadas quando comparadas aos homens) e que a presença de um segundo cromossomo X contribui para o aumento da prevalência de LES ^{124,125}, optou-

se por selecionar apenas mulheres para o presente estudo. Além disso, os hormônios estrogênicos podem afetar os níveis de metilação do DNA ¹²⁶ e por esse motivo, foram selecionadas apenas mulheres no período pré-menopausa. Ainda, considerando que a metilação global do DNA pode estar reduzida em indivíduos idosos ¹²⁷, optou-se por selecionar apenas mulheres em faixa etária adulta. Ademais, considerando os efeitos das drogas antirreumáticas na metilação do DNA, determinou-se como critérios de inclusão o uso de prednisona na dose menor que 10 mg ao dia e o uso de cloroquina em dose estável. É importante observar que todos os outros medicamentos utilizados pelas participantes foram avaliados e monitorados ao longo do estudo. Optou-se por não incluir pacientes em uso de anticoagulantes devido a possíveis complicações durante ou após o procedimento de biopsia para a coleta de TA.

De acordo com recomendações da literatura ^{128,129}, os seguintes fatores foram levados em consideração para determinar o tamanho da amostra: 1. número de pacientes potencialmente elegíveis no referido serviço ambulatorial, 2. capacidade da equipe de pesquisa e 3. disponibilidade de recursos e tempo disponíveis para conduzir o projeto. O alto custo da tecnologia empregada no presente estudo também foi um dos fatores determinantes do tamanho da amostra. A análise de viabilidade desses fatores em conjunto permitiu a determinação mínima de 24 participantes (12 em cada em cada grupo).

Primeiramente, por meio das agendas de consultas obteve-se uma lista de pacientes rotineiramente atendidas no referido ambulatório. Em seguida, por meio de entrevistas pessoais ou por contato telefônico (via *WhatsApp*/Ligação) e buscas nos prontuários médicos pelo portal ProntMed (sistema de registros de pacientes do HC-FMUSP), realizou-se uma triagem (Quadro 1) das participantes potencialmente elegíveis. Logo, todas as pacientes consideradas elegíveis e com contato telefônico disponível foram convidadas a participar do estudo. Após a inclusão da paciente no estudo, verificou-se a disponibilidade de horário e dia e realizou-se o agendamento para coleta dos dados e material biológico. Por fim, um arquivo (APÊNDICE A) contendo a descrição de cadastramento e localização do LACRE foi enviado a cada paciente individualmente a fim de facilitar a chegada e entrada das pacientes ao complexo hospitalar.

Quadro 1 - Questionário para confirmação da inclusão da paciente no estudo.

Faz uso de algum suplemento (Vitaminas, Ácido Fólico)?
Faz uso de algum anticoagulante?
É tabagista (fumante)?
É gestante?
Possui diabetes?
Qual a estimativa do seu peso e altura?
Qual a sua idade? Já entrou na menopausa?
Você atualmente faz parte de algum estudo de algum grupo do LACRE?
Qual a sua idade?
Qual o ano do diagnóstico de LES?
Faz uso de Hidroxicloroquina? Se sim, qual a dose atual e quantas vezes por semana faz o consumo e qual o horário?
Faz uso de Prednisona? Se sim, qual a dose atual e quantas vezes por semana faz o consumo? E em qual horário?

4.3 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo exploratório e transversal, no qual as participantes foram divididas em dois grupos de acordo com a classificação do estado nutricional segundo IMC. O Grupo EUT inclui pacientes com LES e peso adequado (IMC entre 18,5 e 24,9 kg/m²) e o Grupo EP inclui pacientes com LES e excesso de peso (IMC maior que 25 kg/m²). Pelo caráter do estudo foram realizadas avaliações antropométricas e de composição corporal, coleta e processamento de amostra de sangue e biópsia de tecido adiposo em um único momento. O desenho experimental está apresentado na Figura 4.

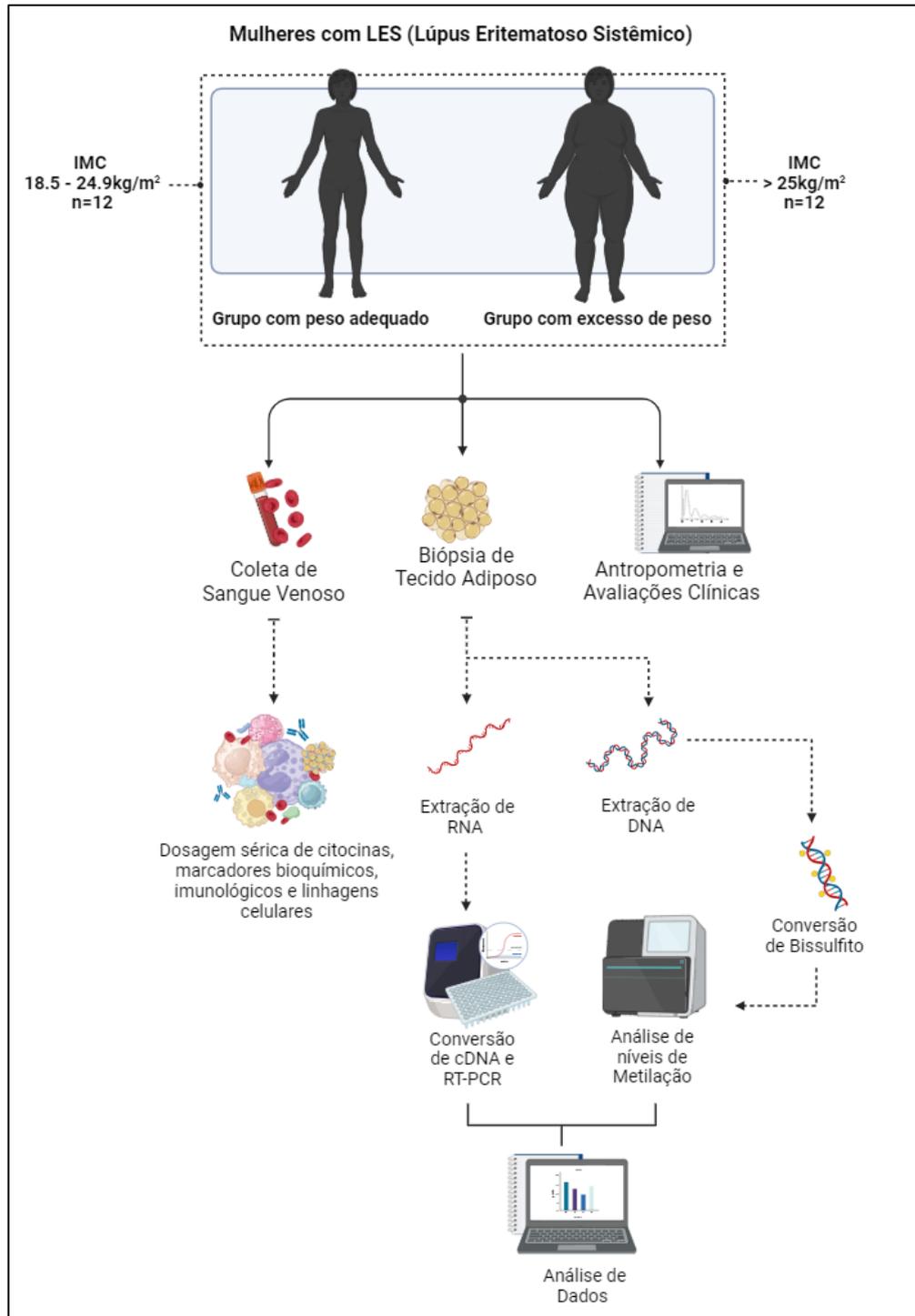
4.4 Avaliação dos parâmetros sociodemográficos, clínicos e da doença

A partir da coleta de dados do sistema de prontuários do HC-FMUSP (ProntMed) e entrevistas com as pacientes foram obtidas informações sobre idade, raça declarada, estado civil, escolaridade, tabagismo prévio e parâmetros da doença (e.g., idade de início, tempo de doença desde o diagnóstico, dose atual de prednisona, hidroxicloroquina e demais medicações complementares).

A atividade da doença foi avaliada por meio do questionário SLEDAI realizado previamente pelo médico reumatologista nas consultas ambulatoriais. Esse instrumento inclui parâmetros clínicos e laboratoriais, levando-se em consideração o órgão acometido. É composto por 24 itens, cada item podendo ter pontuação igual a 1, 2, 4 ou 8, sendo que o escore total pode variar de 0 a 105. Maiores escores representam uma maior atividade da doença, a qual pode ser

classificada em inativa (score=0); leve (score=1-5); moderada (score=6-10); alta (score=11-19) ou muito alta (score=20 ou mais).

Figura 4 - Esquema representativo do desenho experimental.



Fonte: Elaboração própria. IMC: Índice de massa corporal; RT-PCR: Reação em cadeia da polimerase por transcriptase reversa.

4.5 Avaliações antropométricas e de composição corporal

Para a aferição de estatura das pacientes foi utilizado um estadiômetro com escala de 0,5 cm. A medição foi realizada com as pacientes descalças e com os calcanhares juntos, costas eretas e braços paralelos ao corpo. O peso foi aferido por uma balança digital, com capacidade de 300 kg e sensibilidade de 100 g. Para isto, as pacientes ficaram descalças e com roupas leves. A partir dos valores de peso (kg) e altura (m) foi calculado o IMC, fazendo uso da fórmula descrito por Adolphe Quetelet ¹³⁰: peso (kg)/altura (m)².

A composição corporal (massa livre de gordura e massa gorda) foi estimada por meio da aferição de dobras cutâneas (DC), sendo elas tricipital, bicipital, subescapular e supra-íliaca (Figura 5A). As equações preditivas de Durnin (1974) e Siri (1961) foram utilizadas como referência para a realização dos cálculos dentro da plataforma nutricional *WebDiet*® ^{131,132}. A circunferência abdominal foi aferida com fita plástica com graduação de 0,1 mm posicionada na mesma linha da cicatriz umbilical com as pacientes em posição ereta (Figura 5B). Todas as aferições e cálculos foram realizadas pelo mesmo pesquisador.

Figura 5 - Aferição de medidas antropométricas.



A: Aferição da dobra cutânea bicipital. B: Aferição da circunferência abdominal.

4.6 Análises bioquímicas, hematológicas, imunológicas e inflamatórias

4.6.1 Coleta e processamento de amostras de sangue periférico

As amostras de sangue foram coletadas após jejum prévio de 10 horas por profissional qualificado (enfermeiro ou biomédico). A coleta de sangue teve risco mínimo (Categoria 2; 45 CFR 46.110). Para as análises bioquímicas, imunológicas e hematológicas, as amostras de sangue foram coletadas em um tubo *vacutainer* com gel separador. Posteriormente, os tubos foram cadastrados conforme o sistema de identificação interno e conduzidos para o Laboratório Central do HC-FMUSP para o seu respectivo processamento. Para ensaios de dosagem séricas de leptina, adiponectina e citocinas, as amostras foram coletadas em tubos contendo o anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetraacético) e conduzidas para as dependências dos laboratórios da FM-USP (Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo), onde o material foi centrifugado a 3000 rpm, por 15 minutos, para a separação do plasma e armazenado a -80°C.

4.6.2 Análises laboratoriais

Análises bioquímicas, hematológicas e imunológicas foram realizadas nas dependências do Laboratório Central do HC-FMUSP. Os métodos de análise utilizados, assim como os valores de referência considerando o sexo feminino e os índices pré-estabelecidos pelas técnicas e kits utilizados estão descritos no Quadro 2.

As análises de leptina, adiponectina, TNF- α e interleucinas séricas (IL-2, IL-6 e IL-17) foram avaliadas com utilização dos kits comerciais: MILLIPLEX MAP *Human Adipocyte Magnetic Bead Panel - Endocrine Multiplex Assay* e MILLIPLEX® *Human Cytokine/Chemokine/Growth Factor Panel A - Immunology Multiplex Assay* (Millipore, Missouri, EUA) em um analisador Luminex® (Luminex®, MiraiBio, EUA) de acordo com instruções do fabricante. Por fim, os dados obtidos foram normalizados e expressos pelo software *Milliplex Analyst 5.1* (EMD Millipore).

Quadro 2 - Parâmetros bioquímicos, hematológicos e imunológicos analisados e respectivos métodos de quantificação e valores de referência.

Parâmetros	Método de quantificação	Valores de Referência
Glicose (mg/dL)	Hexoquinase	70 - 99
Colesterol total (mg/dL)		< 190
LDL (mg/dL)		< 100
HDL (mg/dL)		> 40
não-HDL (mg/dL)		< 130
VLDL (mg/dL)		< 30
Triglicérides (mg/dL)	Enzimático Colorimétrico	< 150
Vitamina B12 (pg/mL)		197 - 771
Ácido fólico (ng/mL)	Eletroquimioluminescência	3,1 - 17,5
PCR (mg/dL)	Imunoturbidimetria	< 5
VHS (mm/hora)	Westergren modificado	até 15
DHL/LDH (U/L)	Imunoturbidimetria	125 - 222
	Automatizado /	
Eritrócitos (milhões/mm ³)	Microscopia / Coloração Panóptica	3,9 - 5,6
Hemoglobina (g/dL)		11,5 - 15,5
Hematócrito (%)		36 - 48
VCM (fL)		80 - 95
HCM (pg)		27 - 34
CHCM (g/dL)		30 - 35
RDW*CV (%)	Automatizado /	11,7 - 14,4
RDW*SD (fL)	Microscopia	36,4 - 46,3
	Automatizado /	
Leucócitos (mil/mm ³)	Microscopia / Coloração Panóptica	4 - 11
Neutrófilos (%)		40 - 75
Eosinófilos (%)		1 - 6
Basófilos (%)		0 - 1
Linfócitos (%)	Automatizado /	20 - 45
Monócitos (%)	Microscopia	2 - 10
Plaquetas (mil/mm ³)		150 - 400
VPM (fL)	Automatizado	9,4 - 12,4
Anti-dsDNA (UI/mL)	Imunoensaio fluoroenzimático	< 10: Negativo / > 15: Positivo
Anti-SM (UR/mL)	Imunoensaio fluoroenzimático	< 20
Complemento C3 (mg/dL)		67 - 149
Complemento C4 (mg/dL)	Imunoturbidimetria	10 - 38
Ant-Ro/SSA, anti-LA/SSB (UR/mL)		< 20
Anti- B2GPI IGG (U)		< 20
Anti- B2GPI IGM (U)	Imunoensaio	< 20
Anti-P	fluoroenzimático	Negativo

LDL-c: Lipoproteína de baixa densidade, HDL-c: Lipoproteína de alta densidade, VLDL: Lipoproteína de muito baixa densidade, PCR: Proteína C reativa, VHS: Velocidade de hemossedimentação, DHL/LDH: Desidrogenase láctica/lactato desidrogenase, VCM: Volume corpuscular médio, HCM: Hemoglobina corpuscular média, CHCM: Concentração da hemoglobina corpuscular média, RDW: Largura da distribuição das células vermelhas, VPM: Volume plaquetário médio, Anti-dsDNA: autoanticorpos anti-DNA de dupla hélice, Anti-SM: autoanticorpos anti-Smith, Anti-B2GPI: anticorpos anti-Beta 2 glicoproteína 1.

4.7 Coleta e processamento do tecido adiposo subcutâneo

Foram coletados 2 g de TA subcutâneo abdominal por meio de procedimento de biópsia. A biópsia foi realizada na região abaixo da cicatriz umbilical da paciente, sob antisepsia e anestesia com lidocaína a 2% sem vasoconstrictor em via subcutânea. As biópsias foram realizadas na enfermaria de Reumatologia do Instituto Central do HC-FM/USP por profissional habilitado. O mesmo médico realizou todos os procedimentos.

Imediatamente após o procedimento de biópsia, a amostra de TA foi particionada em duas, sendo que uma parte, destinada a extração de DNA, foi inserida em um tubo criogênico puro e a outra parte, destinada a extração de RNA, em um tubo contendo 1 mL de trizol. Para garantir a integridade do material genético, ambos os tubos foram inseridos em solução de nitrogênio líquido para o congelamento instantâneo e em seguida armazenados a -80°C. Após o procedimento de biópsia, as pacientes receberam um informativo impresso (APÊNDICE B) descrevendo o passo a passo para os demais cuidados de limpeza e manutenção do curativo do local da incisão da biópsia, bem como a medicação adequada para atenuação de dor local.

4.8 Análises de metilação do DNA

4.8.1 Extração e quantificação de DNA de tecido adiposo

O DNA do TA foi extraído utilizando o *QIAamp DNA Blood Kit* (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante. A concentração e a pureza do DNA foram determinadas por espectrofotometria usando o equipamento *Nano Vue Plus*. A concentração do DNA foi avaliada a 260 nm e a relação de leituras a 230 nm e a 280 nm para estimar a pureza do DNA, estabelecendo-se o valor de 1,5 como referência mínima.

4.8.2 Tratamento com bissulfito de sódio

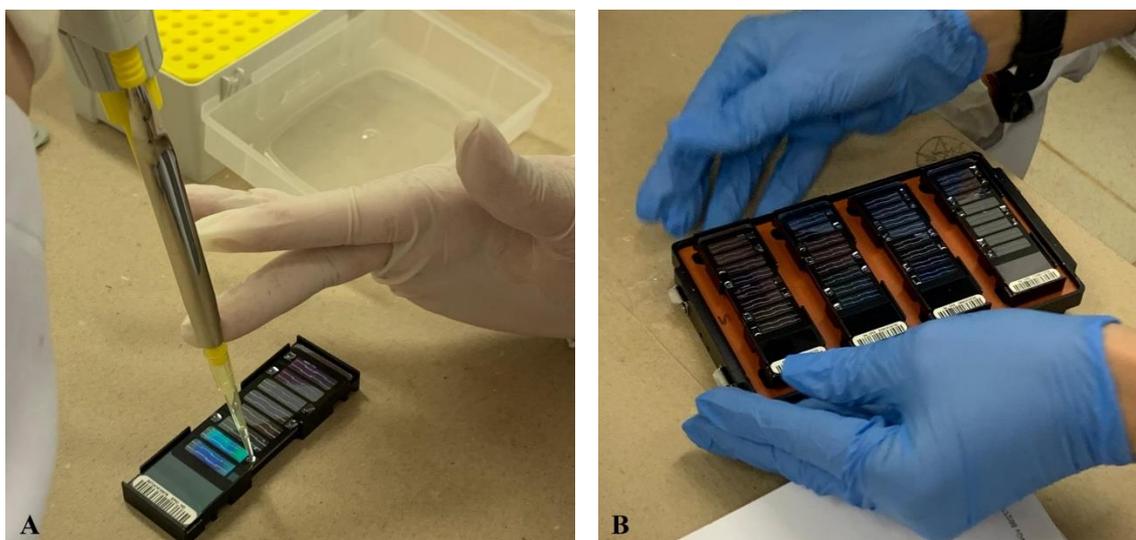
O DNA foi tratado com bissulfito de sódio e purificado utilizando o kit *EZ DNA Methylation-Gold* (Zymo Research) de acordo com as instruções do fabricante, sob condições de incubação a 95°C durante 30 segundos e 16 ciclos a 50°C durante 60 minutos. Com o tratamento, as citosinas não metiladas foram convertidas em uracilas, enquanto as citosinas metiladas permaneceram inalteradas.

4.8.3 Ensaio de metilação do DNA

O DNA (a 100 ng) tratado com bissulfito de sódio foi usado para hibridização na plataforma *Infinium Human Methylation EPIC Beadchip* (Illumina, San Diego, CA) de acordo com o protocolo do fabricante (*Infinium HD Assay Methylation Protocol Guide, Illumina*). Primeiramente, o DNA foi submetido a um processo de desnaturação e neutralização, seguido de amplificação isotérmica. O produto amplificado passou por um processo de fragmentação enzimática, e depois foi precipitado e ressuspenso em tampão de solução. A solução foi hibridizada (Figura 6A) nas lâminas dos *beadchips* por emparelhamento covalente com sondas específicas durante uma incubação a 48°C por 16 horas (Figura 6B). Após a hibridização, foi realizada lavagem para remoção dos fragmentos não anelados, e o *beadchip* foi preparado para estender bases alelo-específicas incorporando nucleotídeos de citosina marcados.

A amplificação da marcação embutida forneceu o sinal identificado por um laser (*Illumina™ iScan System*), que excitou os fluoróforos em cada base, permitindo a identificação de sítios metilados. Desta forma, os *beadchips* foram escaneados usando o sistema *Illumina iScanSQ* que emprega um *scanner* a laser fluorescente de duas cores (532 nm/660 nm) com resolução de 0,375 μm capaz de excitar os fluoróforos incorporados durante o protocolo.

Figura 6 - Preparação das amostras de DNA em lâmina para a hibridização.



A: Preparação no *beadchip* para hibridização, com a amostras de DNA, após a conversão por bissulfito. B: Preparação da *chamber* para incubação do *beadchip*.

4.9 Análises de expressão gênica

4.9.1 Extração e quantificação de RNA de tecido adiposo

O RNA foi extraído do TA subcutâneo com utilização do *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) de acordo com o protocolo do fabricante. O RNA foi quantificado em espectrofotômetro (*Nano Vue Plus*) e a absorbância foi medida nos comprimentos de onda de 260, 280 e 230nm, visando avaliação do grau de pureza.

4.9.2 Síntese de cDNA

A síntese de DNA complementar (cDNA) foi realizada com utilização do kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (*Applied Biosystems*), de acordo com as recomendações do fabricante, em aparelho termociclador (*MJ Research PTC-100®*). Para a reação de transcrição reversa foram utilizados 10 ng de RNA. As condições para a reação foram: 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos e 85°C por 5 minutos. Por fim, o material foi armazenado a -80°C para a análises de expressão gênica.

4.9.3 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR)

A análise da expressão dos genes alvos foi realizada em duplicata pelo método de reação em cadeia de polimerase (PCR) quantitativo em tempo real em equipamento *Step One Plus Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems*). Para a reação foram utilizados 100 ng de cDNA, sondas TaqMan MGB 6-FAM fluorogênicas (*Applied Biosystems*) (Quadro 3) e *TaqMan™ Gene Expression Master Mix* (*Applied Biosystems*) para um volume final de reação em 10 µL. As condições para a reação foram de 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, seguido de anelamento e extensão a 60°C por 60 segundos. Como controle endógeno da reação, foram utilizados os genes gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*) e beta-actina (*ACTB*)^{133,134}.

Os dados obtidos a partir da reação de RT-PCR foram expressos como um limiar de ciclagem ou *Cycle threshold* (Ct), que representa uma linha de base de detecção de fluorescência. Deste modo, baseando-se o valor do Ct foi possível correlacionar os níveis de mRNA usados na reação, utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (HEID et al., 1996; LIVAK;

SCHMITTGEN, 2001). Para tanto, nos cálculos de expressão gênica relativa utilizou-se o Grupo EUT como grupo controle.

Quadro 3 - Genes alvos e respectivas sondas utilizadas nos experimentos.

Símbolo	Gene	Assay ID
<i>GAPDH</i>	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	Hs02786624_g1
<i>ACTB</i>	Beta-actina	Hs01060665_g1
<i>DNMT1</i>	DNA metiltransferase 1	Hs00945875_m1
<i>STAT3</i>	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3	Hs00374280_m1
<i>IL-6</i>	Interleucina-6	Hs00174131_m1
<i>LEP</i>	Leptina	Hs00174877_m1
<i>ADIPOQ</i>	Adiponectina	Hs00977214_m1
<i>TNF-α</i>	Fator de necrose tumoral alfa	Hs00174128_m1

4.10 Análises de bioinformática e estatística

4.10.1 Variáveis clínicas

Variáveis numéricas foram descritas pela média e desvio-padrão, enquanto para variáveis categóricas utilizou-se número absoluto e porcentagem. A normalidade de distribuição dos dados foi verificada pelo teste de *Shapiro-Wilk*. Para a comparação da frequência das variáveis categóricas entre os grupos utilizou-se o teste de Qui-quadrado (χ^2). O teste t para amostras independentes e o teste de teste de *Man-Whitney* foram utilizados para comparar as variáveis numéricas entres os grupos. A significância estatística foi estabelecida em 5% ($p < 0,05$), sendo todas as análises realizadas no software *Statistical Package for Social Science* (SPSS versão 22.0 [Inc. Chicago. IL]).

4.10.2 Análise de metilação do DNA

Os dados da matriz de metilação foram processados no ambiente estatístico R 4.1.1 ([//www.r-project.org/](http://www.r-project.org/)). O pacote R (R *Core Team*, 2021) *RnBeads* foi utilizado para controle de qualidade e pré-processamento¹³⁷. Primeiramente, utilizou-se o algoritmo de corte para filtrar sondas e/ou amostras. Posteriormente, sondas que se sobrepunham a polimorfismos de nucleotídeo único, sondas em cromossomos sexuais e/ou sondas cujas sequências mapeavam múltiplas localizações genômicas (reação cruzada) foram removidas. As intensidades brutas obtidas na matriz foram normalizadas usando o método BMIQ, que é uma abordagem de

normalização baseada em modelo para corrigir valores β de sondas do tipo II de acordo com a distribuição beta dos valores β das sondas do tipo I. Assim, um valor β específico foi obtido para cada sítio CpG encontrado. O valor β corresponde a razão do sinal fluorescente entre a sonda metilada (M) em relação à soma das sondas M e não metilada (UM) [$\beta = M/(M + UM)$] e variam de 0 (sem metilação) a 1 (100% de metilação de ambos os alelos). Por fim, modelos lineares hierárquicos foram utilizados com pacote *limma* para obter as diferenças entre grupos¹³⁸. Os valores de p foram corrigidos para testes múltiplos (taxa de descoberta falsa, FDR) usando o método Benjamini-Hochberg. Uma *pipeline* de bioinformática semelhante foi aplicada a todas as comparações realizadas. Posteriormente, aplicou-se um limiar para os sítios CpG significativos baseados em $\Delta\beta$ com um valor mínimo de 5% (valor maior que 0,5 ou menor que -0,5), um valor de p menor que 0,001 e de FDR menor que 0,05. A anotação das ilhas CpGs utilizou a seguinte categorização: (1) *shore*, para cada uma das sequências de 2 kb que flanqueiam uma ilha CpG; (2) *shelf*, para cada uma das sequências de 2 kb próximas a um *shore* (2 a 4 kb de uma ilha CpG); e (3) *open sea*, para DNA não incluído em nenhuma das sequências anteriores ou em ilhas CpGs. O local de início da transcrição, TSS200 e TSS1500, indicou as regiões 200 ou 1500 pb a montante do local de início da transcrição, respectivamente. Considerou-se como região promotora aquela que contemplou 5'UTR, a região entre TSS e o códon AGT (*start site*). A região definida como corpo do gene correspondeu aquela entre o códon AGT e o *stop códon*. Por fim, considerou-se 3'UTR, a região entre o *stop códon* e a cauda poli A.

4.10.3 Análise de enriquecimento de vias metabólicas

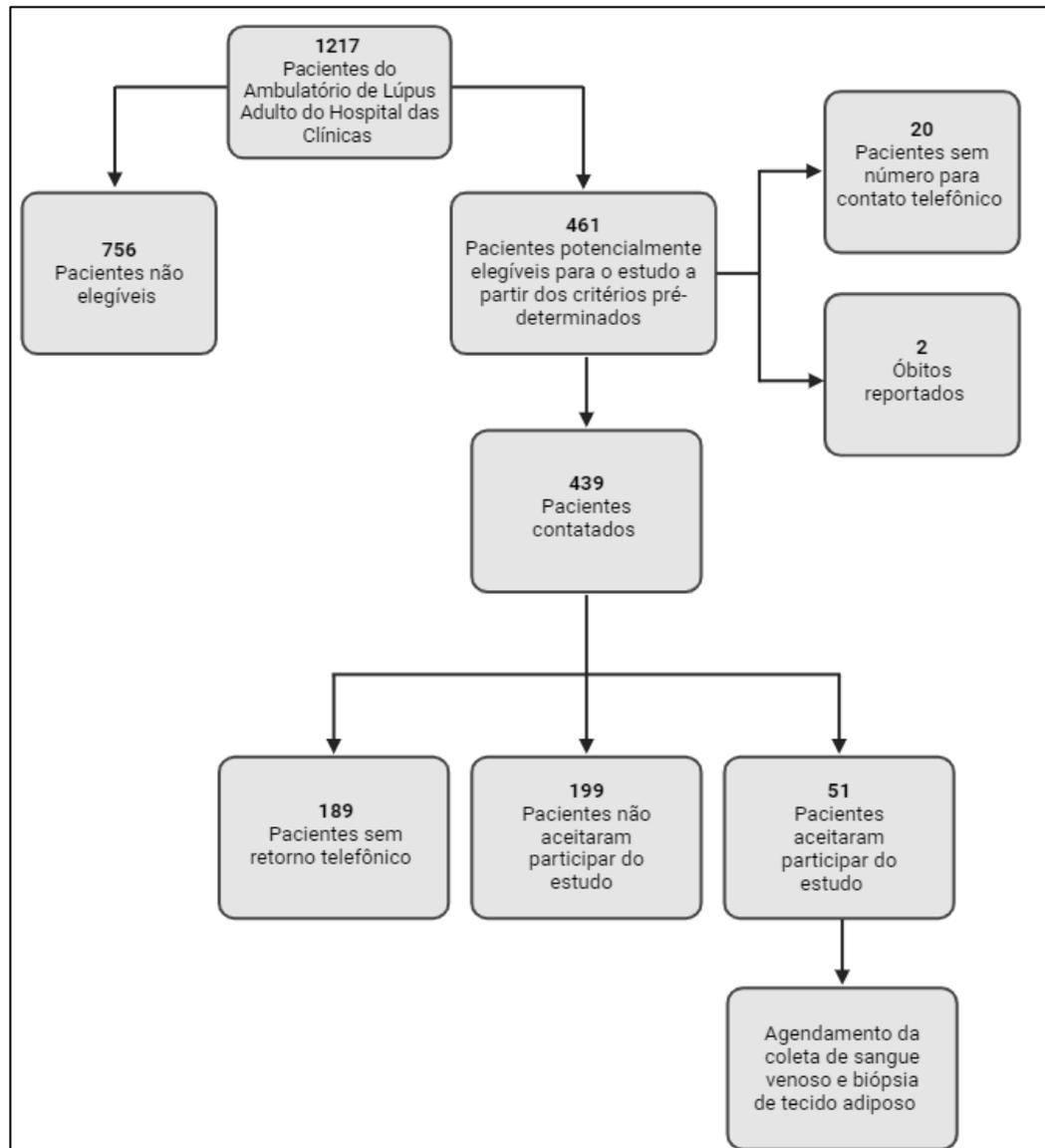
A fim de obter ainda mais relevância biológica das associações significativas entre a metilação do DNA e os fenótipos estudados, foi realizada análise de enriquecimento de vias metabólicas com o programa *WebGestalt* (*WEB-based Gene Set Analysis*, <http://www.webgestalt.org>), utilizando a Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto (KEGG). Os IDs foram carregados e analisados em relação ao genoma humano de referência, sendo que os valores de p para enriquecimento foram ajustados para testes múltiplos utilizando FDR <5%.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

Realizou-se a triagem de 1.217 pacientes atendidas no Ambulatório de Lúpus Adulto da Divisão de Reumatologia do HC-FMUSP. Após a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão, identificou-se 461 pacientes potencialmente elegíveis para o estudo. Destas, 20 contatos telefônicos não foram localizados e dois óbitos foram reportados. Assim, 439 pacientes foram contatadas por telefone ou presencialmente nas consultas médicas, sendo que 189 não responderam ao convite, 199 recusaram participar do estudo e 51 aceitaram e foram incluídas no estudo. O fluxograma abaixo (Figura 7) apresenta de forma representativa o número de pacientes avaliadas, convocadas e incluídas/excluídas no estudo.

Figura 7 - Fluxograma de etapas de inclusão e exclusão de pacientes para a participação do estudo.



Após aferição de peso e estatura e cálculo do IMC, as participantes foram divididas em dois grupos: o Grupo EUT foi formado por 23 pacientes e o Grupo EP por 28 pacientes. Assim, observou-se, conforme esperado, que o Grupo EP apresentou valores médios de peso, IMC, circunferência abdominal e percentual de gordura maiores que o grupo EUT. A caracterização antropométrica e de composição corporal das pacientes incluídas no presente estudo estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1- Variáveis antropométricas e da composição corporal de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e peso adequado ou com excesso de peso incluídas no presente estudo (n = 51).

Variáveis	EUT (n=23)	EP (n=28)	p
Peso (kg)	58,6±6,8	79,7±11,1	0,001
Altura (m)	1,6±0,06	1,6±0,07	0,713
IMC (kg/m ²)	22,3±2,2	30,6±3,7	0,001
Circunferência abdominal (cm)	79,7±6,7	98,2±7,5	0,001
Massa gorda (kg)	19±3,5	29,8±5,3	0,001
Massa gorda (%)	32,1±3,4	37,3±2,3	0,001
Massa magra (kg)	39,6±4,2	49,9±6,4	0,001
Massa magra (%)	67,7±3,4	62,7±2,4	0,001

Valores em média ± DP. IMC: índice de massa corporal, EUT: peso adequado, EP: excesso de peso. Valores em negrito: $p < 0,05$.

O perfil sociodemográfico das pacientes do grupo EUT foi composto majoritariamente por mulheres brancas, solteiras e com ensino médio completo. Pacientes do grupo EP eram, em sua maioria, pardas, casadas e com ensino superior completo. Observou-se uma maior proporção de mulheres com ensino superior completo no Grupo EP quando comparado ao Grupo EUT ($p < 0,05$). Os dados sociodemográficos das pacientes incluídas no presente estudo estão sumarizados na Tabela 2.

Observou-se que 20% das pacientes do Grupo EUT apresentavam concentrações séricas de colesterol total acima dos parâmetros de normalidade. No Grupo EP, cerca de 43% das pacientes apresentavam colesterol total elevado e 61% HDL-c abaixo do recomendado (Figura 8). Além disto, o grupo EP demonstrou maior prevalência de pacientes com LDL-c acima da normalidade, em relação ao grupo EUT ($p=0,035$).

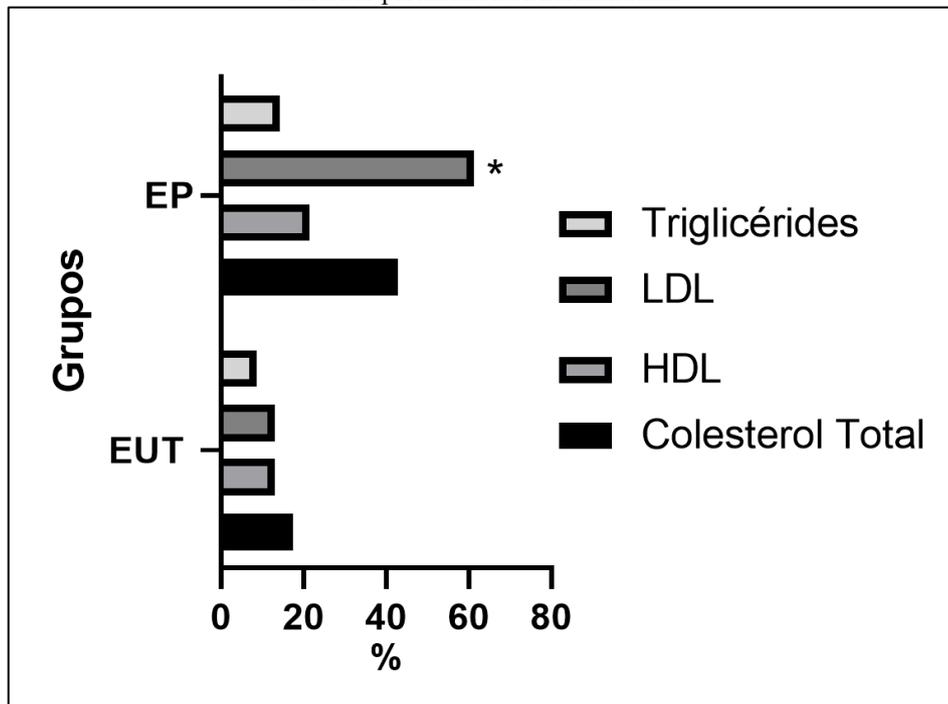
Ainda, observou-se que o grupo EP apresentou maiores concentrações de colesterol total, LDL-c, não-HDL-c e porcentagem de linfócitos e menores concentrações de ácido fólico que o grupo EUT (Tabela 3).

Tabela 2 - Dados sociodemográfico de pacientes com LES e peso adequado ou com excesso de peso incluídas no presente estudo (n = 51).

Variáveis	EUT (n=23)	EP (n=28)	p
Idade atual (anos)	34±6,9	35,5±5,9	0,179
Raça declarada			0,549
Amarela	1 (4,3)	-	
Branca	9 (39,1)	8 (28,6)	
Negra	5 (21,7)	7 (25)	
Parda	8 (34,8)	13 (46,4)	
Estado civil			0,126
Solteira	14 (60,9)	11 (39,3)	
Casada	8 (34,8)	17 (60,7)	
Divorciada	1 (4,3)	-	
Escolaridade			0,037
ES completo	7 (30,4)	11 (39,3)	
ES incompleto	7 (30,4)	1 (3,6)	
EM completo	9 (39)	10 (35,7)	
EM incompleto	-	3 (10,7)	
EF completo	-	1 (3,6)	
EF incompleto	-	2 (7,1)	

Valores em média ± DP ou número de pacientes (porcentagem). EF: Ensino fundamental; EM: Ensino médio; ES: Ensino superior. EUT: peso adequado, EP: excesso de peso. Valores em negrito: p <0,05.

Figura 8 - Distribuição de pacientes que apresentaram concentrações séricas dos marcadores do perfil lipídico fora dos parâmetros de normalidade.



EUT: peso adequado, EP: excesso de peso. Colest. Total: colesterol total; LDL-c: lipoproteína de baixa densidade, HDL-c: lipoproteína de alta densidade, * p=0,035.

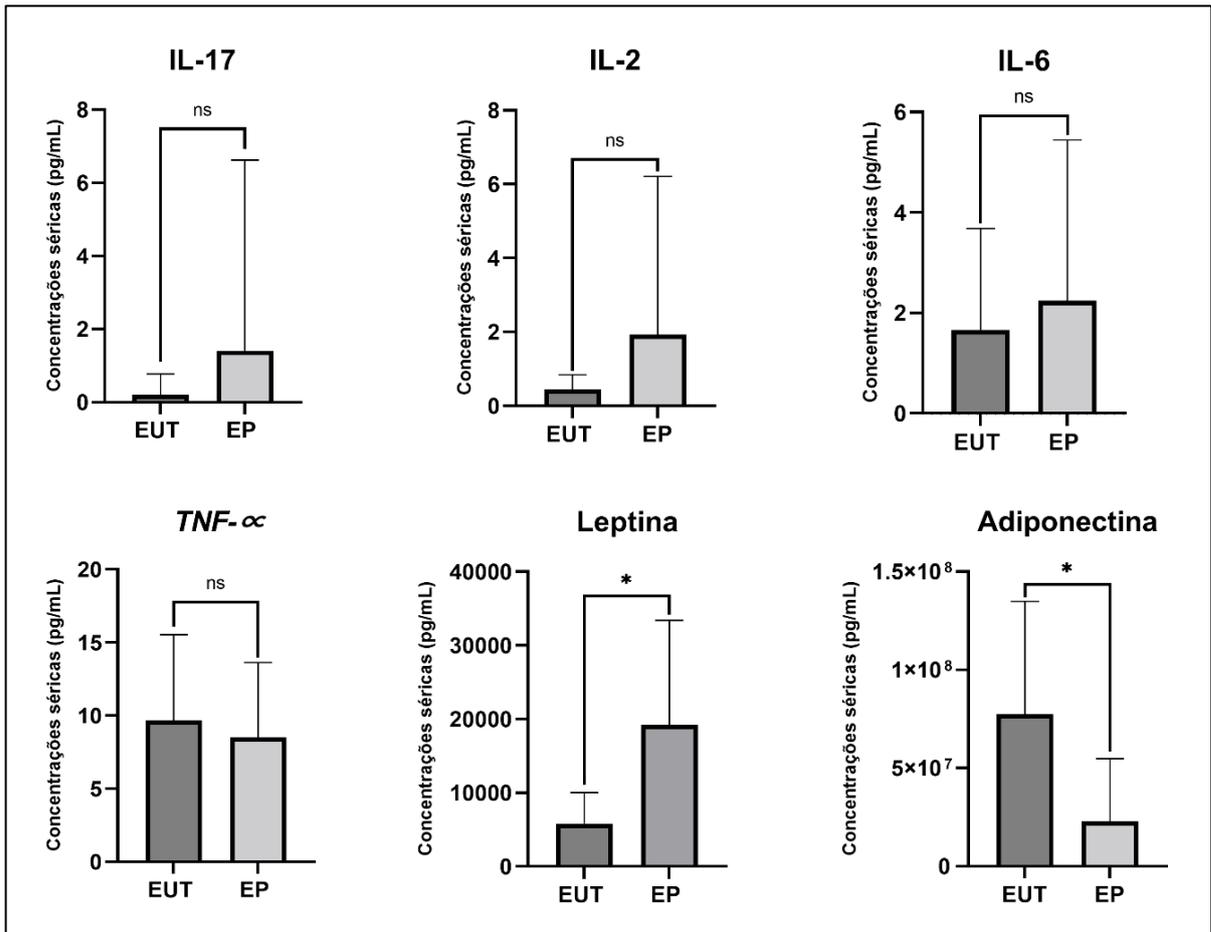
Tabela 3 -Dados bioquímicos, hematológicos e imunológicos de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e peso adequado ou com excesso de peso incluídas no presente estudo (n = 51).

Parâmetro	EUT (n=23)	EP (n=28)	p
Glicose (mg/dL)	80,39±7,5	83,75±8,4	0,145
Colesterol total (mg/dL)	151,22±33,3	174,04±36,8	0,026
LDL-c (mg/dL)	84,7±30,1	105,86±29,0	0,015
HDL-c (mg/dL)	49,13±11,3	46,96±11,3	0,502
não-HDL-c (mg/dL)	102,09±35,7	127,21±32,9	0,012
VLDL-c (mg/dL)	17,39±6,8	21,36±8,0	0,068
Triglicérides (mg/dL)	83,35±50,7	112,96±61,3	0,070
Vitamina B12 (pg/mL)	386,57±139,8	389,11±134,5	0,948
Ácido fólico (ng/mL)	11,4±3,9	9,47±2,6	0,041
PCR (mg/dL)	3,72±7,8	5,01±8,2	0,576
VHS (mm)	23,3±21,7	24,65±16,9	0,808
DHL/LDH (U/L)	181,61±35,7	190,08±37,3	0,423
Eritrócitos (milhões/mm ³)	4,42±0,3	4,4±0,4	0,828
Hemoglobina (g/dL)	12,55±1,0	12,38±1,6	0,67
Hematócrito (%)	37,44±2,7	37,86±3,5	0,645
VCM (fL)	84,9±5,1	86,3±4,7	0,327
HCM (pg)	28,48±2,3	28,75±2,0	0,663
CHCM (g/dL)	33,53±1,3	33,57±1,2	0,915
RDW*CV (%)	11,98±3,9	13,09±0,9	0,197
RDW*SD (fL)	40,44±3,0	40,5±2,7	0,938
Leucócitos (mil/mm ³)	5,41±2,3	5,84±1,7	0,477
Neutrófilos (%)	62,54±9,5	57,87±9,8	0,099
Eosinófilos (%)	1,75±1,3	1,84±1,4	0,813
Basófilos (%)	0,44±0,2	0,49±0,3	0,540
Linfócitos (%)	25,66±7,7	31,33±7,6	0,013
Monócitos (%)	9,25±3,0	8,12±3,0	0,206
Plaquetas (mil/mm ³)	252,87±71,0	270,92±65,8	0,361
VPM (fL)	10,2±1,0	10,25±0,9	0,849
Anti-dsDNA (UI/mL)	55,9±67,8	111,12±175,1	0,162
Anti-SM (UR/mL)	9,1±6,6	6,96±6,6	0,277
Complemento C3	101,7±31,4	104,73±26,4	0,715
Complemento C4	19,79±6,6	22,42±7,0	0,184
Ant-Ro/SSA e anti-LA/SSB	19,36±28,6	17,92±24,8	0,851
ANTI- B2GPI IGG	2,13±1,0	1,96±1,0	0,583
ANTI- B2GPI IGM	4,43±1,6	4,08±1,9	0,490
Anti-P (negativo)	23 (100)	28 (100)	-

Valores em média ± DP ou número de pacientes (porcentagem). LDL-c: lipoproteína de baixa densidade, HDL-c: lipoproteína de alta densidade, VLDL-c: lipoproteína de muito baixa densidade, PCR: proteína C reativa, VHS: Velocidade de Hemossedimentação, DHL/LDH: Desidrogenase Láctica/Lactato desidrogenase, VCM: Volume Corpuscular Médio, HCM: Hemoglobina Corpuscular Média, CHCM: Concentração da hemoglobina corpuscular média, RDW: Largura da distribuição das células vermelhas, VPM: Volume plaquetário médio, Anti-dsDNA: autoanticorpos anti-DNA de dupla hélice, Anti-SM: autoanticorpos anti-Smith, B2GPI: Beta 2 Glicoproteína 1. EUT: peso adequado, EP: excesso de peso. Valores em negrito: $p < 0,05$.

Ainda, não foram observadas diferenças nas concentrações séricas de IL-17, IL-2, IL-6 e TNF- α entre os grupos EUT e EP; porém, o grupo EP apresentou maiores concentrações de leptina e menores de adiponectina que o grupo EUT (Figura 9).

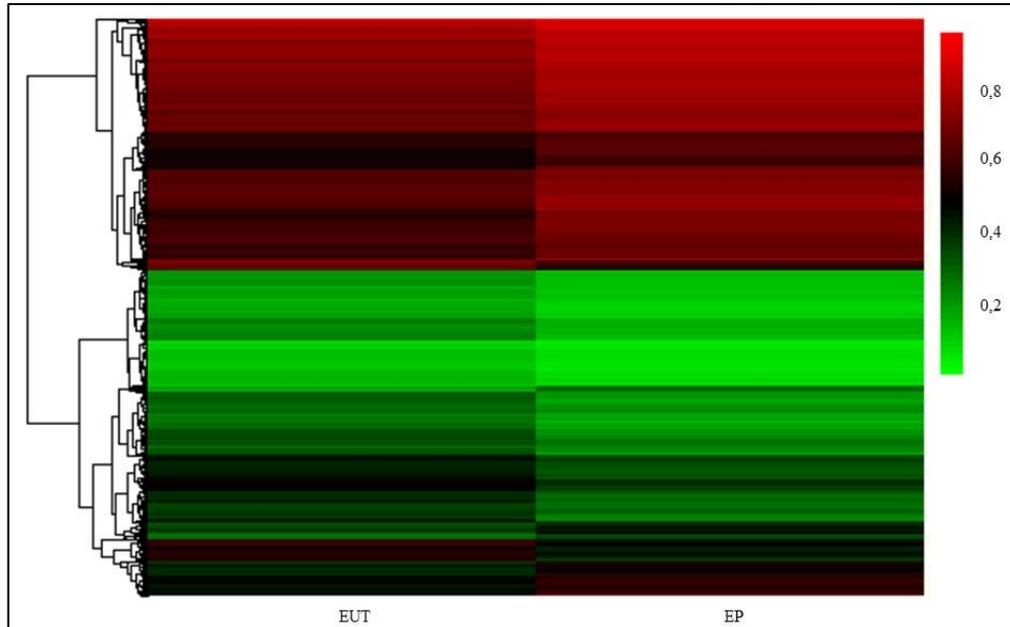
Figura 9 - Valores relativos de níveis séricos de IL-17, IL-2, IL-6, TNF- α , leptina e adiponectina em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e peso adequado ou com excesso de peso.



EUT: peso adequado; EP: excesso de peso. *: $p < 0,05$; ns: não significativo.

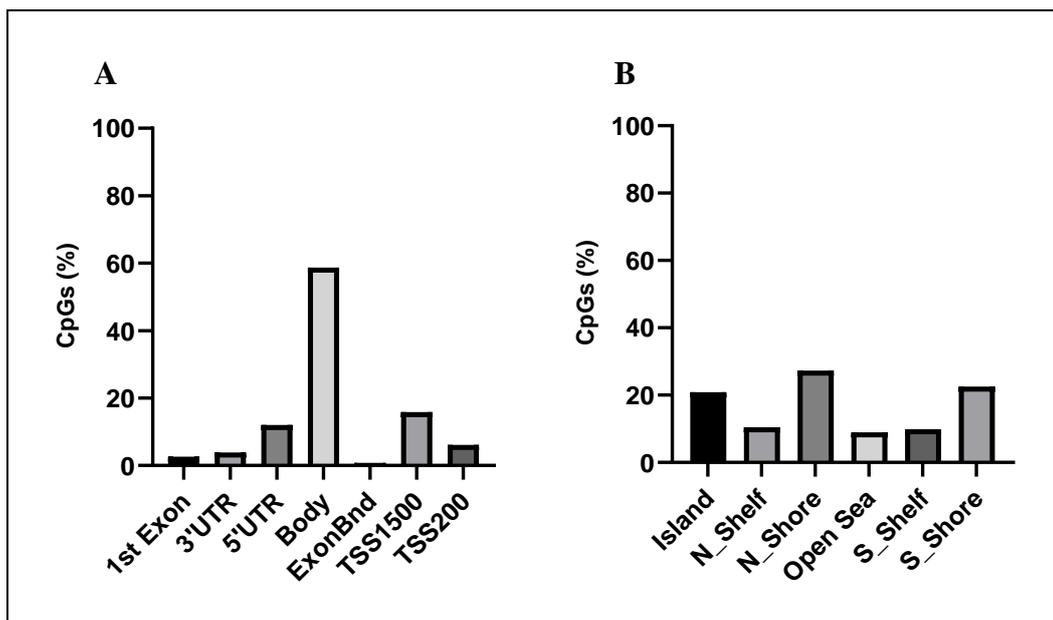
Ao realizar a comparação entre o perfil de metilação de pacientes do grupo EP com o grupo EUT, obteve-se 28.577 sítios CpGs que exibiram metilação diferencial do DNA igual ou superior a 5% (DMCpGs; $p < 0,001$; FDR $< 0,05$) (Figura 10). Tais sítios CpGs foram relacionados a 18.895 genes.

Figura 10 - Heatmap das CpGs diferentemente metiladas entre pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e peso adequado ou excesso de peso.



A Figura 11 mostra a distribuição genômica dos sítios DMCPGs entre pacientes com peso adequado e excesso de peso. Observou-se que a maioria dos DMCPGs se encontravam no corpo do gene (58,7%), sendo que 36,6% encontravam-se na região promotora (Figura 11A). Ainda, a maior parte encontrava-se em “*N_Shore*” e 27,27% em ilhas CpGs (Figura 11B).

Figura 11 - Caracterização dos sítios CpG diferentemente metiladas entre pacientes com LES e peso adequado ou excesso de peso.



A: Proporções das regiões gênicas dos sítios diferencialmente metilados. B: Distribuição genômica de sítios diferencialmente metilados em relação a ilha CpG. EUT: peso adequado, EP: excesso de peso.

Optou-se por realizar as análises minuciosas somente dos sítios DMCPGs localizados nas região promotoras de genes. Destes, 3.730 CpGs estavam hipometilados em pacientes com LES e excesso de peso quando comparadas a pacientes com LES e peso adequado. A variação entre os grupos foi de 5 a 22%. Tais sítios DMCPGs foram relacionados a 2.932 genes conhecidos. Por outro lado, observou-se 3.342 DMCPGs hipermetilados em pacientes do grupo EP quando comparadas as do grupo EUT (relacionadas a 3.028 genes conhecidos). A variação entre os grupos foi de 5 a 26%. A Tabela 4 mostra os 20 principais sítios CpGs que exibiram maior e menor metilação diferencial entre os grupos. As diferenças mais significativas observadas foram para os genes *DLGAP1* e *MBP* ($\Delta >20\%$).

Dentre os sítios DMCPGs hipometilados nas pacientes com LES e excesso de peso, 988 genes foram anotados para as categorias funcionais selecionadas e na lista de referências, sendo assim utilizados para a análise de enriquecimento (Tabela 5). E dentre os sítios DMCPGs hipermetilados nas pacientes com excesso de peso, 982 genes foram anotados para as categorias funcionais selecionadas e na lista de referências, sendo assim utilizados para a análise de enriquecimento (Tabela 6).

Tabela 4 - Os 20 principais sítios CpGs diferentemente metilados entre pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e peso adequado ou com excesso de peso.

CpG	Nível de metilação EUT	Nível de metilação EP	Δ^*	Gene	Posição no gene
Hipometiladas nos pacientes do grupo EP comparado ao grupo EUT					
cg05757358	0,51±0,12	0,32±0,09	0,22	<i>DLGAP1-AS2;DLGAP1</i>	TSS200;Body;Body;Body;Body;Body;Body;Body;Body;Body
cg21636253	0,39±0,10	0,19±0,06	0,20	<i>SPECCIL;SPECCIL-ADORA2A</i>	5'UTR;5'UTR;5'UTR;Body
cg00230120	0,69±0,16	0,44±0,11	0,20	<i>LOC100292680</i>	TSS1500
cg20361475	0,38±0,14	0,21±0,08	0,20	<i>GCG</i>	TSS1500
cg17051399	0,39±0,09	0,20±0,06	0,18	<i>FILIP1L;CMSS1</i>	5'UTR;5'UTR;Body
cg23282852	0,60±0,11	0,41±0,10	0,18	<i>PAQR8</i>	5'UTR
cg00393130	0,39±0,14	0,20±0,06	0,18	<i>CLEC3B</i>	TSS1500;Body
cg05005786	0,54±0,13	0,38±0,08	0,18	<i>MECOM</i>	5'UTR;Body
cg15439745	0,36±0,12	0,20±0,05	0,18	<i>ATAD5</i>	TSS1500
cg23172293	0,58±0,11	0,39±0,08	0,18	<i>MRPL14</i>	ExonBnd;5'UTR
Hipermetiladas nos pacientes do grupo EP comparado ao grupo EUT					
cg17359367	0,29±0,07	0,50±0,07	0,20		TSS1500
cg07157893	0,46±0,12	0,67±0,07	0,21	<i>GBE1</i>	TSS1500;Body
cg15782561	0,46±0,13	0,67±0,13	0,21	<i>MARCH1</i>	1stExon
cg08789933	0,69±0,21	0,83±0,07	0,22	<i>RPL10L</i>	5'UTR;Body
cg23471351	0,18±0,09	0,43±0,10	0,22	<i>KIAA0182</i>	TSS1500
cg01466133	0,45±0,11	0,67±0,14	0,22	<i>ASB8</i>	5'UTR;5'UTR;5'UTR;5'UTR;TSS1500;TSS1500;5'UTR
cg19954348	0,29±0,09	0,55±0,12	0,24	<i>BLCAP;NNAT;NNAT</i>	TSS200
cg01022939	0,51±0,17	0,77±0,07	0,24	<i>C5orf47</i>	TSS1500
cg25389087	0,29±0,15	0,58±0,12	0,24	<i>PRR23C</i>	5'UTR;5'UTR
cg05046305	0,24±0,20	0,56±0,15	0,26	<i>MBP</i>	1stExon;Body;1stExon

Valores em média ± DP. EUT: peso adequado, EP: excesso de peso.

Tabela 5 - Vias metabólicas associadas aos sítios CpGs hipometilados em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e excesso de peso quando comparado ao peso adequado.

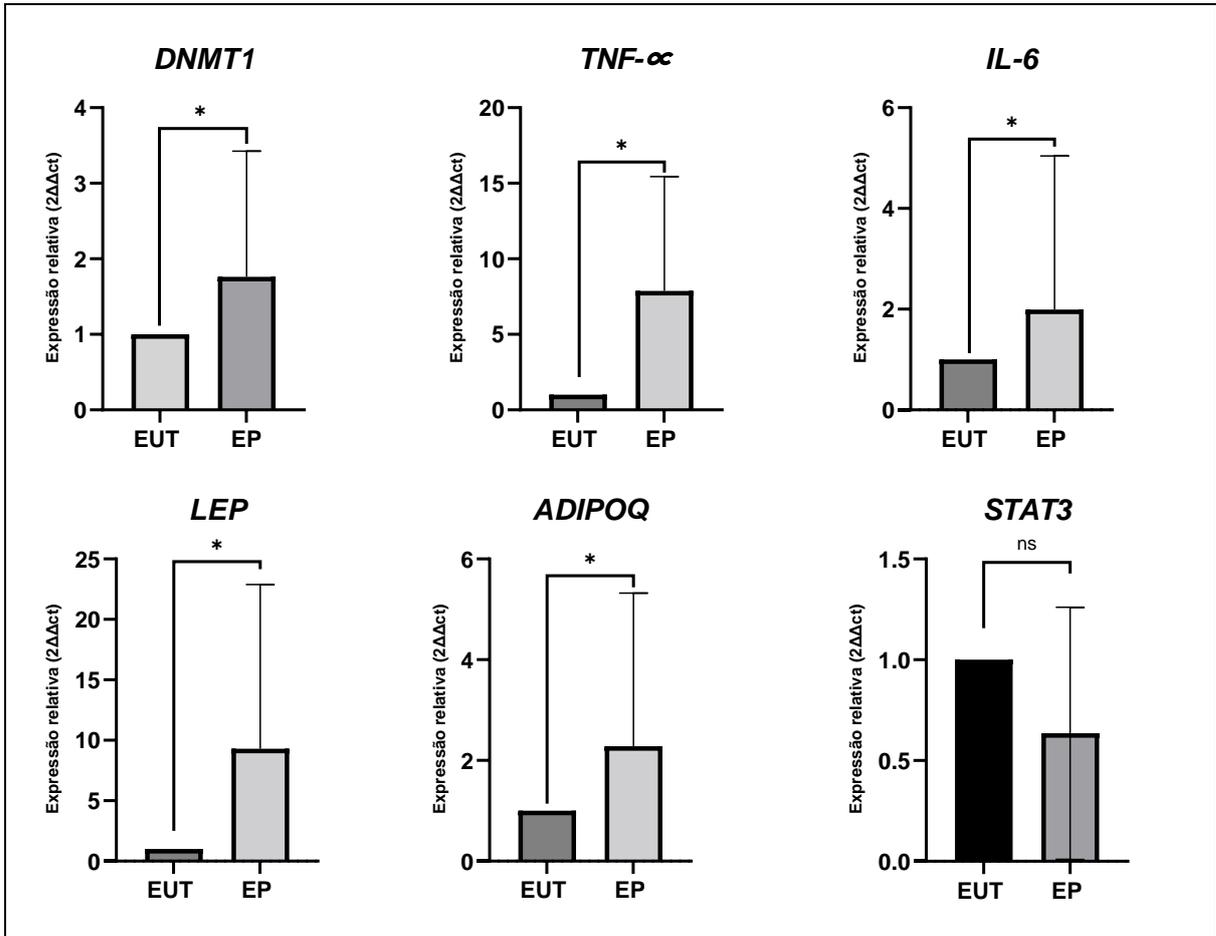
KEEG	Via Metabólica	Razão de enriquecimento
hsa00603	Biossíntese de glicoesfingolípidos	3,02
hsa04010	Via de sinalização MAPK	1,38
hsa04060	Interação citocina-receptor de citocina	1,39
hsa04072	Via de sinalização da fosfolipase D	1,66
hsa04360	Orientação do axônio	1,56
hsa04724	Sinapse glutamatérgica	1,72
hsa04810	Regulação do citoesqueleto de actina	1,46
hsa05032	Dependência de morfina	1,74
hsa05033	Dependência de nicotina	2,46
hsa05200	Vias de sinalização do câncer	1,25

Tabela 6 - Vias metabólicas associadas aos sítios CpGs hipermetilados em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e excesso de peso quando comparado ao peso adequado.

KEEG	Via Metabólica	Razão de enriquecimento
hsa00071	Degradação de ácidos graxos	2,25
hsa00520	Metabolismo de aminoácidos e açúcares de nucleotídeos	2,06
hsa01212	Metabolismo de ácidos graxos	2,38
hsa03320	Via de sinalização PPAR	1,95
hsa04261	Sinalização adrenérgica em cardiomiócitos	1,74
hsa04371	Via de sinalização de apelina	1,67
hsa04668	Via de sinalização TNF	1,66
hsa04724	Sinapse glutamatérgica	1,73
hsa04725	Sinapse colinérgica	1,9
hsa04744	Fototransdução	2,44

Observou-se que os genes *DNMT1*, *TNF- α* , *IL-6*, *LEP*, *ADIPOQ* apresentaram maiores níveis de expressão em pacientes do grupo EP quando comparadas ao grupo EUT, com exceção do gene *STAT3* que por sua vez não apresentou diferença entre os grupos (Figura 12).

Figura 12 - Expressão relativa dos genes *DNMT1*, *TNF- α* , *IL-6*, *LEP*, *ADIPOQ* e *STAT3* em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e peso adequado ou excesso de peso.



EUT: peso adequado; EP: excesso de peso. *: $p < 0,05$; ns: não significativo.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que as pacientes com LES e excesso de peso apresentaram um perfil de metilação do DNA e de expressão gênica no TA distintos daquelas com LES e peso adequado, caracterizado pela hipermetilação de genes relacionados ao metabolismo e degradação de ácidos graxos e hipometilação de genes relacionados a autoimunidade, produção de citocinas e interação das citocinas com seus receptores. Ainda, algumas diferenças no perfil bioquímico caracterizado por maiores concentrações de linfócitos, colesterol total e LDL e menores concentrações de ácido fólico nas pacientes do grupo EP também foram encontradas. Ainda, apesar da diferença entre as concentrações séricas de leptina e adiponectina, não foram observadas diferenças nas concentrações das citocinas inflamatórias entre os grupos.

O perfil clínico dos pacientes com LES é notavelmente complexo e diversificado, refletindo a natureza abrangente dessa doença autoimune, com manifestações e sintomatologia heterogênea entre os indivíduos ¹³⁹. A presença de distúrbios metabólicos nestes pacientes acrescenta uma camada adicional de complexidade aos sintomas apresentados. O ganho de peso excessivo, por exemplo, está associado a um estado inflamatório crônico de baixo grau, caracterizado pela produção aumentada de citocinas pró-inflamatórias e a ativação de vias metabólicas disfuncionais ⁸³. Esses processos podem interagir de maneira complexa e sinérgica com os mecanismos imunológicos, hematológicos, genéticos e epigenéticos envolvidos no LES, influenciando a progressão da doença e as respostas aos tratamentos ^{49,140}.

Evidenciou-se no presente estudo que as pacientes com LES associado ao excesso de peso apresentaram maior massa gorda e circunferência abdominal, refletindo o acúmulo de tecido adiposo, principalmente na região abdominal, o qual pode ocasionar uma piora do quadro inflamatório associado ao LES. Estudos prévios vem demonstrando que o excesso de peso corporal pode acarretar uma maior atividade clínica da doença ^{141,142}, com piora da qualidade de vida ¹⁴³, capacidade cognitiva e funcional ¹⁴⁴, dano renal ¹⁴⁵ e aumento do risco de doenças cardiovasculares ^{146,147}. Neste sentido, Gomez e colaboradores ¹⁴⁸ evidenciaram, por meio aplicação de questionários e a aferição de medidas corpóreas de 1.681 pacientes, que o excesso de peso e a obesidade estão associados a uma pior qualidade de vida e fadiga nos pacientes com LES. Os resultados mostraram que pacientes com este perfil possuíam escores mais baixos em medidas de qualidade de vida, como a Escala de Saúde SF-36 e a Escala de Fadiga FACIT, em comparação com pacientes com peso adequado. Além disso, a obesidade teve um impacto mais significativo na qualidade de vida do que a atividade da doença, destacando a importância de

considerar o peso corporal como parte da avaliação clínica para o manejo de pacientes com LES. Em adição, Munguía-Realpozo e colaboradores ¹⁴⁹ avaliaram o ganho de peso como fator de risco para progressão de complicações cardíacas no LES. No estudo com 70 participantes mulheres foi observado que um IMC mais elevado e uma maior duração da doença estavam significativamente associados a um maior risco de disfunção diastólica do ventrículo esquerdo. Ainda, a resistência à insulina foi identificada em 60% das pacientes, sugerindo uma possível ligação entre a resistência à insulina e a disfunção cardíaca em pacientes com LES.

Curiosamente, apesar de apresentarem menores percentuais de massa gorda que as pacientes do grupo EP, as pacientes com LES e peso adequado apresentaram porcentagem de massa gorda aumentada em relação ao esperado. Sola-Rodríguez e colaboradores ¹⁵⁰ em um estudo transversal envolvendo mulheres com LES evidenciou uma mediana de IMC de 24,0 kg/m² e do percentual de gordura corporal de 34,5. O maior percentual de gordura corporal associado ao LES pode ser justificado por fatores ambientais como o estilo de vida, caracterizado pelo sedentarismo e hábitos alimentares inadequados ¹⁵¹, e outros fatores inerentes a doença como duração e atividade da doença, cronicidade e uso de medicamentos ¹⁵². A prednisona, glicocorticoide amplamente empregado no controle da inflamação aguda e supressão do sistema imunológico autorreativo ¹⁵³, ocasiona vários efeitos adversos como a retenção de eletrólitos (e.g. sódio e potássio) que favorecem a retenção de água, ocasionando o desbalanço osmótico e inchaço ¹⁵⁴, além do favorecimento da hipertrigliceridemia, com consequente aumento do fluxo de ácidos graxos para o fígado, resistência à insulina e acúmulo desenvolvimento da gordura visceral ¹⁵⁵.

Em paralelo, observou-se na uma porcentagem significativa das pacientes com excesso de peso apresentou alterações séricas nas frações de colesterol total e LDL, demonstrando que o excesso de peso pode ser um fator potencial para o desbalanço do metabolismo lipídico ¹⁵⁶, podendo contribuir para evolução de maus prognósticos e doenças cardiovasculares ^{157,158}. Além disto, é notório que características inerentes a própria doença ou tratamento como uso prolongado de glicocorticoides ¹⁵⁴, limitações motoras e sedentarismo ¹⁵⁹, alimentação ¹⁶⁰ e estilo de vida ¹⁶¹ contribuem para a dislipidemia encontrada nesses pacientes ¹⁶².

Em relação aos parâmetros hematológicos, observou-se que as pacientes com LES e excesso de peso apresentaram maiores concentrações de linfócitos circulantes que aquelas com peso adequado; entretanto, não foram observadas diferenças nas outras frações de células brancas, células vermelhas e plaquetas. Esse aumento dos linfócitos circulantes é consistente com achados da literatura tanto em relação ao LES ¹⁶³, como à obesidade ¹⁶⁴. Os linfócitos T fazem parte do sistema imunológico adaptativo e são classificados em diversos subgrupos de

acordo com sua função específica. Os linfócitos T efetores estão envolvidos na ativação de outras células imunes, como os linfócitos B, estimulando a produção de anticorpos, com consequente ativação de linfócitos T citotóxicos e aumento da atividade dos macrófagos ¹⁶⁵.

De maneira interessante, grupo de pesquisadores reportaram previamente que pacientes com LES apresentaram valores significativamente mais elevados da relação entre neutrófilos e linfócitos e relação entre plaquetas e linfócitos em comparação com os controles saudáveis ¹⁶³. Na obesidade, os linfócitos T efetores promovem a produção de citocinas T auxiliares pró-inflamatórias, gerando o estado inflamatório ^{165,166}. Estudo recente que investigou possíveis diferenças imunometabólicas em pacientes com diferentes graus de obesidade, observou que à medida que o grau de obesidade aumentava, a quantidade linfócitos T CD4+ também aumentava ¹⁶⁴. Outros autores observaram aumento de linfócitos T auxiliares no sangue periférico de indivíduos com obesidade ¹⁶⁷. Ainda, outros autores reportaram que a contagem de linfócitos ¹⁶⁷⁻¹⁶⁹, leucócitos, neutrófilos e plaquetas são significativamente afetadas pelo IMC ¹⁶⁸.

Considerando os parâmetros imunológicos, não foi observada diferença entre os grupos; achados esses que diferem da literatura. Correa-Rodriguez e colaboradores ¹⁴² ao avaliarem o impacto da obesidade em uma amostra de 275 pacientes com LES evidenciou que aqueles com maiores IMC apresentaram maiores concentrações séricas de complemento C3 e PCR de alta sensibilidade. Além disso, estudo em modelo animal de LES alimentado com dieta com alto teor de gordura mostrou uma tendência de aumento das concentrações de anti-dsDNA e ANA nesses animais, o que poderia estar relacionado com o desenvolvimento acelerado e exacerbado de LES e autoimunidade encontrado ¹⁷⁰. Apesar desses achados, poucas são as evidências do papel da obesidade nos parâmetros imunológicos de pacientes com LES.

Adicionalmente, evidenciou-se que o grupo EP também apresentou baixas concentrações séricas de ácido fólico quando comparado ao grupo EUT. Resultados prévios mostraram uma correlação negativa entre as concentrações séricas de folato e o IMC em adultos coreanos jovens e de meia-idade, nos quais participantes com baixas concentrações de ácido fólico apresentaram maiores chances de ter IMC e circunferência abdominal elevados, sugerindo que a deficiência de folato pode estar relacionada ao ganho de peso e à obesidade em adultos coreanos ¹⁷¹. Se tratando do LES, estudos vem investigando as concentrações séricas de folato em pacientes acometidos pela doença, com resultados inconsistentes ^{172,173}. Considerando as principais funções do ácido fólico, como modulação dos níveis de metilação de DNA; funções imunomoduladoras no contexto da autoimunidade ¹⁷⁴, e cofator do metabolismo da homocisteína ¹⁷⁵, as baixas concentrações encontradas em pacientes com

excesso de peso podem trazer piora do quadro clínico ou do prognóstico desses pacientes. Destaca-se que o excesso de homocisteína sérica é um fator contribuidor adicional para o risco elevado de aterosclerose em pacientes com LES¹⁷². Ainda, estudo *in vitro* mostrou que a deficiência de folato inibiu a proliferação de linfócitos T CD8+ humanos¹⁷⁶, sendo que a função efetora reduzida das células T CD8+ contribui para a autoimunidade sistêmica e patogênese do LES¹⁷⁷. Por fim, o ácido fólico é um nutriente essencial para os processos de metilação do DNA¹⁷⁸. Nesse cenário, diversos estudos vêm mostrando que o *status* de folato pode influenciar a relação entre metilação do DNA e fenótipo inflamatório¹⁷⁹⁻¹⁸¹.

Como principal achado do presente estudo, observou-se um perfil distinto de metilação do DNA no TA entre pacientes com LES com peso adequado ou excesso de peso. É importante ressaltar que este estudo é pioneiro em comparar o perfil de metilação do DNA em pacientes com LES de acordo com o estado nutricional. Ainda, também é o primeiro estudo a avaliar o TA dessa casuística. Além disto, o enriquecimento das vias metabólicas mostrou que os genes hipometilados em pacientes com LES e excesso de peso se relacionavam a via de sinalização da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e via de interação citocina-receptor de citocina. Por outro lado, os genes hipermetilados nesse grupo de pacientes relacionaram-se a vias do metabolismo e degradação de ácidos graxos, sinalização do receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR) e sinalização de TNF.

É de conhecimento que as vias de sinalização MAPK desempenham um papel de grande importância imunorregulatória, visto que elas conduzem a sinalização intracelular em cascata, desempenhando seu papel condutor em processos celulares, incluindo crescimento, diferenciação, proliferação, sobrevivência e motilidade celular¹⁸². Essas vias são ativadas em resposta a estímulos extracelulares, como fatores de crescimento, e são compostas por uma série de quinases que se ativam sequencialmente. A ativação da via MAPK geralmente se inicia com a ligação de um ligante a um receptor de tirosina quinase na membrana celular, desencadeando sucessivos eventos que culminam na fosforilação e ativação de proteínas quinases específicas de serina/treonina. Uma vez ativadas, as quinases são translocadas para o núcleo celular, onde regulam a expressão gênica e ativam uma variedade de substratos envolvidos em respostas celulares específicas, como a inflamação¹⁸³. Estudos prévios demonstraram que a ativação das vias MAPK é um potencial mecanismo pró-inflamatório em doenças autoimunes^{184,185}. Por exemplo, defeitos na regulação dessa cascata foram associados ao comprometimento da manutenção da tolerância das células T no LES¹⁸⁶. Além disso, foi demonstrado que a ativação da MAPK é crucial para a ativação das células B, levando à produção de imunoglobulinas, e para a produção de uma série de citocinas, incluindo IL-6¹⁸⁷. Estudo recente evidenciou

superexpressão das vias de sinalização de MAPK em células mononucleares do sangue periférico (em inglês, PBMC's) de pacientes com LES associada a fibrose pulmonar idiopática, mostrando que a via de sinalização p38MAPK é um importante mecanismo de resposta inflamatória, regulando a infiltração de certos subconjuntos de células imunes ¹⁸⁸. Assim, sugere-se uma forte correlação de sinalização MAPK à inflamação e excesso de peso e gordura corporal. Acredita-se que a hipometilação do DNA de genes associados a essa via poderia levar a maior expressão gênica e maior produção de citocinas inflamatórias em pacientes com LES com excesso de peso, o que acarretaria a piora da sintomatologia e exacerbação da doença.

Em adição, CpGs em genes associados a via de interação citocina-receptor de citocina também estavam hipometilados em pacientes com LES e excesso de peso. Essa via é responsável pela regulação da resposta imune, inflamação e na patogênese de várias doenças autoimunes ⁴⁹. Participam das respostas inflamatórias e da regulação imunológica proteínas do eixo CCL21/CCR7, as quais são altamente expressas em doenças autoimunes ¹⁸⁹, cujos genes estavam hipometilados nas pacientes do grupo EP. Quando ativado, o ligante de quimiocina 21 (CCL21) se liga ao receptor CCR7, o qual é expresso em várias células do sistema imune (e.g. células T reguladoras, células dendríticas, células *natural killers*), propiciando a migração celular nos tecidos ¹⁸⁹. Nesse sentido, níveis aumentados de CCL21 foram associados a maior exacerbação da atividade da doença de pacientes com LES ¹⁹⁰. Ainda, de acordo com recente revisão, diversos estudos em modelo animal e ensaios clínicos evidenciaram que a interrupção da interação CCL21/CCR7 pode ser uma abordagem terapêutica promissora para o tratamento de doenças autoimunes ¹⁸⁹. Nesse sentido, a hipometilação do gene *CCL21B* e de outros genes associados a via de interação de citocinas com seus respectivos receptores, assim como um possível aumento da expressão desses genes em pacientes com excesso de peso sugere um mecanismo epigenético de regulação da resposta imune, o qual ainda pode estar associado com exacerbação do quadro clínico.

Considerando os sítios CpGs hipermetilados nos pacientes com LES e excesso de peso, destaca-se a via do metabolismo e degradação de ácidos graxos. Os ácidos graxos são degradados nas mitocôndrias por um processo bioquímico denominado β -oxidação, pelo qual o organismo produz energia na forma de ATP. Nos peroxissomos, os ácidos graxos de cadeia longa são convertidos em acil-CoA que, por sua vez, precisam ser transportados até o interior das mitocôndrias pelo sistema de transporte de carnitina, catalisado pela carnitina aciltransferase-1 ou carnitina palmitoiltransferase-1 (CPT-1). Enquanto no citosol, o acil-CoA é convertido em acilcarnitina (pela enzima carnitina aciltransferase I) que entra na matriz mitocondrial e segue o processo de β -oxidação ¹⁹¹.

Sabe-se que no LES, a energia derivada da β -oxidação de lipídios está reduzida ¹⁹². Em paralelo, evidências apontam que as células T são menos eficientes na geração de ATP ¹⁹³, fato esse que pode estar associado com a base molecular da fadiga crônica que os pacientes acometidos pela doença normalmente experimentam ¹⁹². Somado a isso, a obesidade pode levar ao comprometimento do metabolismo celular, incluindo a dependência da oxidação da glicose (para a produção de ATP) e a diminuição da oxidação dos ácidos graxos. Alguns autores sugeriram que indivíduos com obesidade têm atividade reduzida de CPT-1, o que prejudica o fluxo de transferência de ácidos graxos para as mitocôndrias e, portanto, reduz a β -oxidação ¹⁹⁴. Outros demonstraram que o aumento da β -oxidação de ácidos graxos está negativamente correlacionado com o IMC ¹⁹¹. Tais evidências explicam a hipermetilação de genes importantes como acetil-CoA aciltransferase 1 (ACAA1), acetil-CoA acetiltransferase 1 (ACAT1) e CPT-1A encontrada no presente estudo. Assim, acredita-se hipermetilação e possível redução da expressão gênica associa-se a menor atividade das enzimas, menor β -oxidação nos pacientes com excesso de peso.

Outra via metabólica que apresentou um perfil de hipermetilação nas pacientes do grupo EP foi a via de sinalização do PPAR. Observou-se que essa via englobou importantes genes que controlam o metabolismo da glicose e de lipídios, e o processo de inflamação, como lipase lipoproteica (*LPL*), receptor ativado por proliferador de peroxissomo gama (*PPAR γ*), translocase de ácidos graxos (*FAT/CD36*), proteína de ligação a ácidos graxos 5 (*FABP5*) e pirilipina 1 (*PLINI*). Os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs) são fatores de transcrição ativados por ligantes, sendo o *PPAR γ* um subtipo ¹⁹⁵. Quando ativado, o PPAR liga-se ao receptor de retinol X para formar heterodímero e depois se liga ao elemento de resposta do proliferador de peroxissoma (PPRE), que pode ativar algumas proteínas ou genes enzimáticos relacionados ao metabolismo de lipídios ¹⁹⁶. Especificamente, o *PPAR γ* apresenta um papel crítico no metabolismo lipídico, regulando genes como o *LPL* e *FAT/CD36*, além de outros genes envolvidos na liberação, decomposição, transporte e armazenamento de ácidos graxos ¹⁹⁷.

Nesse sentido, a redução da atividade do *PPAR γ* pode levar a disfunções metabólicas, como resistência à insulina e desregulação da homeostase lipídica, contribuindo para o desenvolvimento de condições como obesidade e diabetes mellitus tipo 2 ^{198,199}. Além disso, o *PPAR γ* é extensivamente expresso em células do sistema imune, atuando na inibição da ativação e função de macrófagos e células dendríticas ²⁰⁰ e mediando a sobrevivência, ativação e diferenciação de células T ²⁰¹ e, assim, inibindo processos inflamatórios ²⁰². Assim, a expressão aumentada de *PPAR γ* pode desempenhar um papel protetor na patogênese das

doenças autoimunes, principalmente do LES, modulando a polarização dos macrófagos e suprimindo a resposta inflamatória²⁰³. Estudo experimental evidenciou que agonista do PPAR γ atuam na redução da produção de autoanticorpos, prevenindo doenças renais e cardiovasculares em modelos de camundongos com LES, sendo que indução de adiponectina foi o principal mecanismo molecular posposto²⁰⁴. Ainda, autores recentemente a alteração do metabolismo lipídico e os mecanismos associados estão envolvidos na patogênese e progressão do LES²⁰⁵. Dessa maneira, acredita-se que a hipermetilação de genes da via de sinalização do PPAR associada ao excesso de peso, com possível redução da expressão gênica, levaria a uma disfunção do metabolismo de lipídios, assim como da regulação da inflamação, contribuindo para sua exacerbação dos sintomas e maior risco cardiovascular.

Diferentemente do esperado, CpGs em genes associados a via de sinalização de TNF também estavam hipermetilados em pacientes com LES e excesso de peso. As vias de interação do TNF com seus receptores, TNFR1 e TNFR2, desencadeiam uma cascata de eventos intracelulares que podem levar à ativação de fatores de transcrição como fator nuclear kappa B (NF- κ B) e proteína ativadora 1 (AP-1), resultando na expressão de genes pró-inflamatórios e antiapoptóticos. Além disso, o TNF está envolvido na regulação da resposta imune adaptativa, na diferenciação de células T e na modulação da resposta imune contra patógenos. Quando a via de sinalização do TNF não está sendo expressa ou está comprometida, isso pode resultar em uma série de consequências negativas para o organismo^{206,207}, como aumento da susceptibilidade a infecções, regulação inadequada da cascata de inflamação, com desequilíbrio da resposta inflamatória e desenvolvimento de doenças autoimunes, inflamatórias e crônicas.

Além disto, também pode afetar a regulação da apoptose, levando a uma proliferação celular descontrolada ou à sobrevivência prolongada de células danificadas ou infectadas, contribuindo para o desenvolvimento de distúrbios como câncer²⁰⁷. Assim, havia a hipótese de que tais genes estariam menos metilados e mais expressos em pacientes com excesso de peso quando comparadas àquelas com peso adequado. Entretanto, apesar da hipermetilação das vias de sinalização de TNF, observou-se maiores níveis de expressão gênica de TNF- α no grupo EP. Ainda, a expressão do gene IL-6 também foi maior no TA de pacientes com excesso de peso.

Considerando o papel do TNF- α e da IL-6, nos processos inflamatórios, bem como os suas respectivas funções pleiotrópicas frente a quadros de doenças autoimunes^{208,209} e distúrbios metabólicos²¹⁰, há um consenso de que os níveis de expressão gênica de TNF- α e IL-6 estejam elevados na obesidade²¹¹ e no LES^{212,213}, fato esse observado no presente estudo. Porém, as concentrações séricas das mesmas citocinas não diferiram entre os grupos. A literatura mostra que indivíduos com obesidade, quando comparados ao peso adequado,

apresentam um aumento de duas a três vezes nos níveis circulantes de TNF- α e IL-6, ²¹⁴⁻²¹⁶. Ainda, evidências sugerem que a principal fonte dessa produção aumentada de citocinas inflamatórias associada à obesidade são os macrófagos residentes no tecido adiposo ^{217,218}. Sabendo disso, dois importantes pontos podem ser destacados. Em primeiro lugar, considerando que indivíduos com LES já apresentam níveis de TNF- α e IL-6 aumentados ^{219,220} desde os estágios iniciais de manifestações da doença, pode-se ficar difícil avaliar o efeito do excesso de tecido adiposo nesses parâmetros. Em segundo lugar, as pacientes avaliadas apresentavam excesso de peso e assim, não eram todas com diagnóstico de obesidade, fato este que também pode ter interferido nesses achados.

Adicionalmente, verificou-se maior expressão relativa de *DNMT1*, *LEP*, *ADIPOQ* no grupo excesso de peso quando comparado ao grupo peso adequado. O gene *DNMT1* é responsável por codificar enzima de mesmo nome, a qual desempenha papel crucial no processo de metilação do DNA ²²¹. A literatura sobre a expressão de *DNMT1* no tecido adiposo de pacientes com doenças autoimunes é escassa, sendo que os estudos encontrados avaliaram as células T CD4+. Os resultados comparando a expressão do referido gene em pacientes com LES e controles saudáveis são conflitantes, existindo achados que pacientes com LES exibiram expressão reduzida de *DNMT1* ^{222,223}, enquanto nenhuma diferença também foi reportada ²²⁴. Se tratando do excesso de peso, os resultados da literatura divergem entre si. De um lado, estudo avaliando expressão de *DNMT1* em TA subcutâneo e visceral demonstrou uma superexpressão em pacientes com obesidade e resistência insulínica ²²⁵. Por outro lado, outros autores demonstraram menor expressão de *DNMT1* no TA de indivíduos com obesidade do que em indivíduos sem obesidade, demonstrando possível mecanismo epigenético pelo qual o perfil de metilação do DNA específico do TA é modificado devido a perda de DNMT1, levando à hipertrofia de adipócitos, à bioenergética mitocondrial prejudicada e à intolerância sistêmica à glicose ²²⁶. Interessantemente, Hou e colaboradores ²²⁷ evidenciou a influência da obesidade na hipometilação global de células T CD4+ em pacientes com LES. Por fim, observaram menor expressão de DNMT1 nos pacientes com LES e obesidade, sendo que seu nível estava negativamente correlacionado com o IMC. Curiosamente, alguns estudos apontam que, no LES, vias metabólicas como a via de sinalização da MAPK regulam negativamente a atividade da DNMT ^{228,229}. Assim, esperava-se que a hipermetilação dessa via em indivíduos com excesso de peso levaria a uma maior inibição da expressão de *DNMT1* em pacientes do grupo EP, resultado contrário ao encontrado.

Ademais, foi observado maiores níveis de expressão gênica e níveis séricos de leptina no grupo de pacientes com excesso de peso corroborando ao que era esperado. Estudos já

descreveram o gene *LEP* como um dos potenciais marcadores relacionados ao ganho de peso. Eldosouky e colaboradores em 2018 revelaram que crianças com sobrepeso e obesidade apresentaram uma superexpressão do gene *LEP* e concentrações significativamente mais elevadas de leptina no sangue em comparação com o grupo controle²³⁰. A literatura demonstra que concentrações séricas de leptina elevadas devido ao excesso de tecido adiposo, promovem à resistência à ação da leptina no cérebro, resultando em uma falha na regulação do apetite e do metabolismo, contribuindo para a manutenção do ganho excessivo de peso⁷⁹.

Apesar dos estudos demonstrarem menores concentrações séricas de adiponectina em indivíduos com excesso de peso^{231,232}, observou-se no presente estudo concentrações séricas aumentadas nesses pacientes quando comparados aos com peso adequado. Ressalta-se que concentrações séricas elevadas de adiponectina já foram descritas em outras doenças inflamatórias, como a artrite reumatóide e o LES^{233,234}. Assim, acredita-se que a característica inflamatória do LES se sobrepõe ao efeito do excesso de peso na concentrações de adiponectina nas pacientes avaliadas.

Os resultados apresentados propiciam uma visão esclarecedora sobre a distinção da assinatura epigenética entre pacientes com LES e diferentes estados nutricionais, além das características fenotípicas esperadas. Uma abordagem holística da investigação dos padrões de metilação do DNA, os quais desempenham um papel na regulação da expressão gênica, torna-se imperativa para a compreensão dos mecanismos subjacentes à heterogeneidade do LES e sua correlação com outras condições médicas, bem como com a resposta aos tratamentos. A medicina de precisão emerge como um paradigma promissor ao individualizar as medidas terapêuticas, visando prognósticos mais precisos²³⁵. Portanto, é essencial adotar uma abordagem diferenciada ao avaliar pacientes com excesso de peso em comparação com aqueles com peso adequado. Estes estudos têm o potencial não apenas de distinguir os subgrupos de pacientes com LES, mas também de guiar o desenvolvimento de abordagens terapêuticas personalizadas que considerem a complexidade do perfil clínico de cada indivíduo.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Concluiu-se que pacientes com LES e excesso de peso possuem um perfil de metilação do DNA no tecido adiposo subcutâneo distinto daqueles com LES e peso adequado, caracterizado por uma hipermetilação de vias relacionadas a degradação de ácidos graxos, sinalização do PPAR e do TNF; e hipometilação de vias relacionadas a sinalização da MAPK e de interação de citocinas com seus receptores. Concomitante com essa diferença no perfil de metilação do DNA, pacientes com LES e excesso de peso apresentaram maior expressão gênica de importantes marcadores inflamatórios. Assim, existe assinatura epigenética específica de pacientes com LES e excesso de peso decorrente do aumento das reservas de tecido adiposo, assinatura essa que se associa ao estado inflamatório e pode explicar o porquê pacientes com excesso de peso possuem um pior estado clínico e possível prognóstico desfavorável.

Dada a sua natureza exploratória, este estudo abre caminhos para novas investigações sobre a regulação epigenética de vias metabólicas associadas ao LES, com o objetivo de identificar possíveis biomarcadores. Esse avanço poderá contribuir significativamente para um diagnóstico mais preciso e um tratamento mais personalizado no futuro.

REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MOK, C. C. Metabolic syndrome and systemic lupus erythematosus: the connection. **Expert Review of Clinical Immunology**, v. 15, n. 7, p. 765-775, 2019.
2. FORTUNA, G; BRENNAN, M. T. Systemic lupus erythematosus: epidemiology, pathophysiology, manifestations, and management. **Dental Clinics**, v. 57, n. 4, p. 631-655, 2013.
3. SELMI, C.; LU, Q.; HUMBLE, M. C. Heritability versus the role of the environment in autoimmunity. **Journal of autoimmunity**, v. 39, n. 4, p. 249-252, 2012.
4. HEDRICH, C. M. Epigenetics in SLE. **Current rheumatology reports**, v. 19, p. 1-13, 2017.
5. KREBS, C. F. et al. T helper type 17 cells in immune-mediated glomerular disease. **Nature Reviews Nephrology**, v. 13, n. 10, p. 647-659, 2017.
6. LÓPEZ, P. et al. Th17 responses and natural IgM antibodies are related to gut microbiota composition in systemic lupus erythematosus patients. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 24072, 2016.
7. PISETSKY, D. S.; LIPSKY, P. E. New insights into the role of antinuclear antibodies in systemic lupus erythematosus. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 16, n. 10, p. 565-579, 2020.
8. PISETSKY, D. S. et al. The interaction of anti-DNA antibodies with DNA: evidence for unconventional binding mechanisms. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 9, p. 5227, 2022.
9. SANTOS, F. M. M. et al. Adipokines, tumor necrosis factor and its receptors in female patients with systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 26, n. 1, p. 10-16, 2017.
10. STOJAN, G. et al. Cachexia in systemic lupus erythematosus: risk factors and relation to disease activity and damage. **Arthritis care & research**, v. 73, n. 11, p. 1577-1582, 2021.
11. CAO, H. Adipocytokines in obesity and metabolic disease. **Journal of endocrinology**, v. 220, n. 2, p. T47-T59, 2014.
12. GEORGE, M.I D.; BAKER, J. F. The obesity epidemic and consequences for rheumatoid arthritis care. **Current rheumatology reports**, v. 18, p. 1-9, 2016.
13. GÓMEZ, R. et al. What's new in our understanding of the role of adipokines in rheumatic diseases? **Nature Reviews Rheumatology**, v. 7, n. 9, p. 528-536, 2011.
14. PASARICA, M. et al. Reduced adipose tissue oxygenation in human obesity: evidence for rarefaction, macrophage chemotaxis, and inflammation without an angiogenic response. **Diabetes**, v. 58, n. 3, p. 718-725, 2009.

15. HANNA KAZAZIAN, N. et al. Lupus autoimmunity and metabolic parameters are exacerbated upon high fat diet-induced obesity due to TLR7 signaling. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 2015, 2019.
16. CHOE, S. S. et al. Adipose tissue remodeling: its role in energy metabolism and metabolic disorders. **Frontiers in endocrinology**, v. 7, p. 30, 2016.
17. VERSINI, M. et al. Obesity in autoimmune diseases: not a passive bystander. **Autoimmunity reviews**, v. 13, n. 9, p. 981-1000, 2014.
18. KONO, M. et al. The impact of obesity and a high-fat diet on clinical and immunological features in systemic lupus erythematosus. **Nutrients**, v. 13, n. 2, p. 504, 2021.
19. CLAYCOMBE, K.; BRISSETTE, C. A.; GHRIBI, O. Epigenetics of inflammation, maternal infection, and nutrition. **The Journal of nutrition**, v. 145, n. 5, p. 1109S-1115S, 2015.
20. FRISO, S. et al. One-carbon metabolism and epigenetics. **Molecular aspects of medicine**, v. 54, p. 28-36, 2017.
21. KOUZARIDES, T. Chromatin modifications and their function. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 693-705, 2007.
22. GUTIERREZ-ARCELUS, M; RICH, S. S.; RAYCHAUDHURI, S. Autoimmune diseases—connecting risk alleles with molecular traits of the immune system. **Nature Reviews Genetics**, v. 17, n. 3, p. 160-174, 2016.
23. RAO A.P., RAGHURAM J. Systemic lupus erythematosus. **Indian Journal of Practical Pediatrics**. 1º de outubro de 2016;18(4):313–9.
24. DAMIANI, G. et al. Malar rash is a predictor of subclinical airway inflammation in patients with systemic lupus erythematosus: a pilot study. **Clinical Rheumatology**, v. 38, p. 2541-2546, 2019.
25. DAS, N. K.; DUTTA, R. N.; SENGUPTA, S. R. Skin lesions in lupus erythematosus: a marker of systemic involvement. **Indian journal of dermatology**, v. 56, n. 5, p. 537-540, 2011.
26. ANDERS, H. J. et al. Lupus nephritis. Vol. 6. **Nature Reviews Disease Primers**. **Nature Research**, 2020.
27. MINER, J. J.; KIM, A. HJ. Cardiac manifestations of systemic lupus erythematosus. **Rheumatic Disease Clinics**, v. 40, n. 1, p. 51-60, 2014.
28. MITTOO, S.; FELL, C. D. Pulmonary manifestations of systemic lupus erythematosus. In: **Seminars in respiratory and critical care medicine**. Thieme Medical Publishers, 2014. p. 249-254.
29. SHABAN, A.; LEIRA, E. C. Neurological complications in patients with systemic lupus erythematosus. **Current neurology and neuroscience reports**, v. 19, p. 1-10, 2019.

30. TIAN, J. et al. Global epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comprehensive systematic analysis and modelling study. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 82, n. 3, p. 351-356, 2023.
31. BARBER, M. RW et al. Global epidemiology of systemic lupus erythematosus. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 17, n. 9, p. 515-532, 2021.
32. PAN, L. et al. Immunological pathogenesis and treatment of systemic lupus erythematosus. **World Journal of Pediatrics**, v. 16, p. 19-30, 2020.
33. CROW, M. K. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus: risks, mechanisms and therapeutic targets. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 82, n. 8, p. 999-1014, 2023.
34. GARCCARRASCO, M. et al. Insulin resistance and diabetes mellitus in patients with systemic lupus erythematosus. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders)**, v. 23, n. 4, p. 503-514, 2023.
35. MUNGUIA-REALPOZO, P. et al. Systemic lupus erythematosus and hypertension. **Autoimmunity reviews**, v. 18, n. 10, p. 102371, 2019.
36. FERNÁNDEZ, S. A. C. et al. Infecciones en enfermedades autoinmunes sistémicas. **Reumatología Clínica**, v. 17, n. 10, p. 582-587, 2021.
37. PEGO-REIGOSA, J. M. et al. The risk of infections in adult patients with systemic lupus erythematosus: systematic review and meta-analysis. **Rheumatology**, v. 60, n. 1, p. 60-72, 2021.
38. COZIER, Y. C. et al. A prospective study of obesity and risk of systemic lupus erythematosus (SLE) among Black women. In: **Seminars in arthritis and rheumatism**. WB Saunders, 2019. p. 1030-1034.
39. BASTA, F. et al. Systemic lupus erythematosus (SLE) therapy: the old and the new. **Rheumatology and Therapy**, v. 7, n. 3, p. 433-446, 2020.
40. HERNÁNDEZ-NEGRÍN, H. et al. Obesity, diabetes, and cardiovascular risk burden in systemic lupus erythematosus: Current approaches and knowledge gaps—A rapid scoping review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 22, p. 14768, 2022.
41. ALGHAREEB, R. et al. Cardiovascular complications in systemic lupus erythematosus. **Cureus**, v. 14, n. 7, 2022.
42. SJÖWALL, C.; PARODIS, I. Clinical Heterogeneity, Unmet Needs and Long-Term Outcomes in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. **Journal of Clinical Medicine**, v. 11, n. 22, p. 6869, 2022.
43. FELD, J.; ISENBERG, D. Why and how should we measure disease activity and damage in lupus?. **La Presse Médicale**, v. 43, n. 6, p. e151-e156, 2014.

44. ARINGER, M.; JOHNSON, S. R. Classifying and diagnosing systemic lupus erythematosus in the 21st century. **Rheumatology**, v. 59, n. Supplement_5, p. v4-v11, 2020.
45. YEE, C. et al. The use of Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index-2000 to define active disease and minimal clinically meaningful change based on data from a large cohort of systemic lupus erythematosus patients. **Rheumatology**, v. 50, n. 5, p. 982-988, 2011.
46. COSTEDOAT-CHALUMEAU N., Francès C, Pouchot J, Piette JC. The new classification criteria for systemic lupus erythematosus (SLICC). **Revue de Médecine Interne**. 2014 Aug;35(8):487-90.
47. SUTTON, E. J.; DAVIDSON, J. E.; BRUCE, I. N. The systemic lupus international collaborating clinics (SLICC) damage index: a systematic literature review. In: **Seminars in arthritis and rheumatism**. WB Saunders, 2013. p. 352-361.
48. QI, S. et al. Clinical application of protein biomarkers in lupus erythematosus and lupus nephritis. **Lupus**, v. 27, n. 10, p. 1582-1590, 2018.
49. YU, H.; NAGAFUCHI, Y.; FUJIO, K. Clinical and immunological biomarkers for systemic lupus erythematosus. **Biomolecules**, v. 11, n. 7, p. 928, 2021.
50. RUIZ-IRASTORZA, G. et al. Clinical efficacy and side effects of antimalarials in systemic lupus erythematosus: a systematic review. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 69, n. 01, p. 20-28, 2010.
51. ALARCÓN, G. S. et al. Effect of hydroxychloroquine on the survival of patients with systemic lupus erythematosus: data from LUMINA, a multiethnic US cohort (LUMINA L). **Annals of the rheumatic diseases**, v. 66, n. 9, p. 1168-1172, 2007.
52. PONTICELLI, C.; MORONI, G. Hydroxychloroquine in systemic lupus erythematosus (SLE). **Expert opinion on drug safety**, v. 16, n. 3, p. 411-419, 2017.
53. TANAKA, Y. State-of-the-art treatment of systemic lupus erythematosus. **International Journal of Rheumatic Diseases**, v. 23, n. 4, p. 465-471, 2020.
54. LAZAR, S.; KAHLENBERG, J. M. Systemic lupus erythematosus: new diagnostic and therapeutic approaches. **Annual review of medicine**, v. 74, p. 339-352, 2023.
55. O'DWYER, T.; DURCAN, L.; WILSON, F. Exercise and physical activity in systemic lupus erythematosus: A systematic review with meta-analyses. In: **Seminars in arthritis and rheumatism**. WB Saunders, 2017. p. 204-215.
56. FANGTHAM, M. et al. Non-pharmacologic therapies for systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 28, n. 6, p. 703-712, 2019.
57. RÀFOLS, M. Esteve. Tejido adiposo: heterogeneidad celular y diversidad funcional. **Endocrinología y Nutrición**, v. 61, n. 2, p. 100-112, 2014.

58. SAKERS, A. et al. Adipose-tissue plasticity in health and disease. **Cell**, v. 185, n. 3, p. 419-446, 2022.
59. GRANT, R. W.; DIXIT, Vishwa Deep. Adipose tissue as an immunological organ. **Obesity**, v. 23, n. 3, p. 512-518, 2015.
60. WENSVEEN, F. M. et al. Interactions between adipose tissue and the immune system in health and malnutrition. In: **Seminars in immunology**. Academic Press, 2015. p. 322-333.
61. SCHELLER, J. et al. The pro-and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1813, n. 5, p. 878-888, 2011.
62. TANAKA, T.; NARAZAKI, M.; KISHIMOTO, T.. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 6, n. 10, p. a016295, 2014.
63. WUEEST, S.; KONRAD, D. The controversial role of IL-6 in adipose tissue on obesity-induced dysregulation of glucose metabolism. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 319, n. 3, p. E607-E613, 2020.
64. BOYMAN, O.; SPRENT, J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 3, p. 180-190, 2012.
65. KOCHUMON, S. et al. Elevated adipose tissue associated IL-2 expression in obesity correlates with metabolic inflammation and insulin resistance. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 16364, 2020.
66. KOLLS, J. K.; LINDÉN, A. Interleukin-17 family members and inflammation. **Immunity**, v. 21, n. 4, p. 467-476, 2004.
67. MCGEACHY, M. J.; CUA, D. J. Th17 cell differentiation: the long and winding road. **Immunity**, v. 28, n. 4, p. 445-453, 2008.
68. SUMARAC-DUMANOVIC, M. et al. Increased activity of interleukin-23/interleukin-17 proinflammatory axis in obese women. **International journal of obesity**, v. 33, n. 1, p. 151-156, 2009.
69. WINER, S. et al. Obesity predisposes to Th17 bias. **European journal of immunology**, v. 39, n. 9, p. 2629-2635, 2009.
70. ARABABADI, M. K. et al. Nephropathic complication of type-2 diabetes is following pattern of autoimmune diseases?. **diabetes research and clinical practice**, v. 87, n. 1, p. 33-37, 2010.
71. ZHANG, J. et al. Changes of serum cytokines-related Th1/Th2/Th17 concentration in patients with postmenopausal osteoporosis. **Gynecological Endocrinology**, v. 31, n. 3, p. 183-190, 2015.

72. GÓMEZ, R. et al. Las adipocinas: mediadores emergentes de la respuesta inmune y de la inflamación. **Reumatología clínica**, v. 5, p. 6-12, 2009.
73. VAN LOO, G.; BERTRAND, M. JM. Death by TNF: a road to inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 23, n. 5, p. 289-303, 2023.
74. MOELANTS, E. AV. et al. Regulation of TNF- α with a focus on rheumatoid arthritis. **Immunology and cell biology**, v. 91, n. 6, p. 393-401, 2013.
75. BALKWILL, F. Tumour necrosis factor and cancer. **Nature reviews cancer**, v. 9, n. 5, p. 361-371, 2009.
76. LIU, J. et al. The leptin signaling. **Neural regulation of metabolism**, p. 123-144, 2018.
77. ZHANG, Y.; CHUA JR, S. Leptin function and regulation. **Comprehensive physiology**, v. 8, n. 1, p. 351-369, 2011.
78. FARR, O. M.; GAVRIELI, A.; MANTZOROS, Christos S. Leptin applications in 2015: what have we learned about leptin and obesity?. **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity**, v. 22, n. 5, p. 353-359, 2015.
79. SÁINZ, N. et al. Leptin resistance and diet-induced obesity: central and peripheral actions of leptin. **Metabolism**, v. 64, n. 1, p. 35-46, 2015.
80. NAYLOR, C.; PETRI, W. A. Leptin regulation of immune responses. **Trends in molecular medicine**, v. 22, n. 2, p. 88-98, 2016.
81. KIERNAN, K.; MACIVER, N. J. The role of the adipokine leptin in immune cell function in health and disease. **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 622468, 2021.
82. WANG, Z. V.; SCHERER, P. E. Adiponectin, the past two decades. **Journal of molecular cell biology**, v. 8, n. 2, p. 93-100, 2016.
83. OHASHI, K. et al. Role of anti-inflammatory adipokines in obesity-related diseases. **Trends in endocrinology & metabolism**, v. 25, n. 7, p. 348-355, 2014.
84. WANG, X.; ZHANG, S.; LI, Zhuo. Adipokines in glucose and lipid metabolism. **Adipocyte**, v. 12, n. 1, p. 2202976, 2023.
85. IBRAHIM, M. M. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. **Obesity reviews**, v. 11, n. 1, p. 11-18, 2010.
86. SUN, K. et al. Adipose tissue remodeling and obesity. **The Journal of clinical investigation**, v. 121, n. 6, p. 2094-2101, 2011.
87. CHEN, Y. et al. Epigenetic modification of nucleic acids: from basic studies to medical applications. **Chemical Society Reviews**, v. 46, n. 10, p. 2844-2872, 2017.
88. MATTEI, A. L.; BAILLY, N.; MEISSNER, A. DNA methylation: a historical perspective. **Trends in Genetics**, v. 38, n. 7, p. 676-707, 2022.

89. JAENISCH, R.; BIRD, A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. **Nature genetics**, v. 33, n. 3, p. 245-254, 2003.
90. POGRIBNY, I. P. et al. Role of DNA damage and alterations in cytosine DNA methylation in rat liver carcinogenesis induced by a methyl-deficient diet. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 669, n. 1-2, p. 56-62, 2009.
91. IRAOLA-GUZMÁN, S.; ESTIVILL, X.; RABIONET, R. DNA methylation in neurodegenerative disorders: a missing link between genome and environment?. **Clinical genetics**, v. 80, n. 1, p. 1-14, 2011.
92. BALLESTAR, E.; SAWALHA, A. H.; LU, Qianjin. Clinical value of DNA methylation markers in autoimmune rheumatic diseases. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 16, n. 9, p. 514-524, 2020.
93. HAN, L. et al. DNA methylation and hypertension: emerging evidence and challenges. **Briefings in functional genomics**, p. elw014, 2016.
94. MURRELL, A.; HURD, P. J.; WOOD, I. C. Epigenetic mechanisms in development and disease. **Biochemical Society Transactions**. 2013. p. 697–9.
95. DE MELLO, V. D. F. et al. DNA methylation in obesity and type 2 diabetes. **Annals of medicine**, v. 46, n. 3, p. 103-113, 2014.
96. SEKIGAWA, I. et al. DNA methylation: its contribution to systemic lupus erythematosus. **Clinical and experimental medicine**, v. 6, p. 99-106, 2006.
97. GUO, G. et al. Disease activity-associated alteration of mRNA m5 C methylation in CD4+ T cells of systemic lupus erythematosus. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 8, p. 430, 2020.
98. VORDENBÄUMEN, S. et al. Methyl donor micronutrients, CD40-ligand methylation and disease activity in systemic lupus erythematosus: A cross-sectional association study. **Lupus**, v. 30, n. 11, p. 1773-1780, 2021.
99. LANATA, C. M. et al. Dynamics of methylation of CpG sites associated with systemic lupus erythematosus subtypes in a longitudinal cohort. **Arthritis & Rheumatology**, v. 74, n. 10, p. 1676-1686, 2022.
100. GUO, Yu; SAWALHA, A. H.; LU, Q. Epigenetics in the treatment of systemic lupus erythematosus: potential clinical application. **Clinical immunology**, v. 155, n. 1, p. 79-90, 2014.
101. KIT, A. H.; NIELSEN, H. M.; TOST, J. DNA methylation based biomarkers: practical considerations and applications. **Biochimie**, v. 94, n. 11, p. 2314-2337, 2012.

102. ABSHER, D M. et al. Genome-wide DNA methylation analysis of systemic lupus erythematosus reveals persistent hypomethylation of interferon genes and compositional changes to CD4+ T-cell populations. **PLoS genetics**, v. 9, n. 8, p. e1003678, 2013.
103. MI, X.; ZENG, F. Hypomethylation of interleukin-4 and-6 promoters in T cells from systemic lupus erythematosus patients. **Acta pharmacologica Sinica**, v. 29, n. 1, p. 105-112, 2008..
104. LIN, S. Y. et al. A whole genome methylation analysis of systemic lupus erythematosus: hypomethylation of the IL10 and IL1R2 promoters is associated with disease activity. **Genes & Immunity**, v. 13, n. 3, p. 214-220, 2012.
105. ZHAO, M. et al. DNA methylation and mRNA and microRNA expression of SLE CD4+ T cells correlate with disease phenotype. **Journal of autoimmunity**, v. 54, p. 127-136, 2014.
106. RENAUER, P. et al. DNA methylation patterns in naïve CD4+ T cells identify epigenetic susceptibility loci for malar rash and discoid rash in systemic lupus erythematosus. **Lupus science & medicine**, v. 2, n. 1, p. e000101, 2015.
107. PINNICK, K. E.; KARPE, F. DNA methylation of genes in adipose tissue. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 70, n. 1, p. 57-63, 2011.
108. TURNER, D. C. et al. DNA methylation across the genome in aged human skeletal muscle tissue and muscle-derived cells: the role of HOX genes and physical activity. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 15360, 2020.
109. LI, S. et al. The links between adipose tissue DNA methylation, obesity, and insulin resistance: A protocol for systematic review. **Medicine**, v. 101, n. 47, p. e31261, 2022.
110. LING, C.; RÖNN, T. Epigenetics in human obesity and type 2 diabetes. **Cell metabolism**, v. 29, n. 5, p. 1028-1044, 2019.
111. LA CAVA, A. The influence of diet and obesity on gene expression in SLE. **Genes**, v. 10, n. 5, p. 405, 2019.
112. MCALLAN, L. et al. Integrative genomic analyses in adipocytes implicate DNA methylation in human obesity and diabetes. **Nature Communications**, v. 14, n. 1, p. 2784, 2023.
113. NICOLETTI, C. F. et al. DNA methylation pattern changes following a short-term hypocaloric diet in women with obesity. **European journal of clinical nutrition**, v. 74, n. 9, p. 1345-1353, 2020.
114. SAMBLAS, M.; MILAGRO, F. I.; MARTÍNEZ, A. DNA methylation markers in obesity, metabolic syndrome, and weight loss. **Epigenetics**, v. 14, n. 5, p. 421-444, 2019.
115. ELGENDY, K. et al. Effects of obesity, and of weight loss following bariatric surgery, on methylation of DNA from the rectal mucosa and in cell-free DNA from blood. **International Journal of Obesity**, v. 47, n. 12, p. 1278-1285, 2023.

116. NICOLETTI, C. F. et al. Exercise training and DNA methylation profile in post-bariatric women: Results from an exploratory study. **Frontiers in Sports and Active Living**, v. 5, p. 1092050, 2023.
117. DE PAULA, B. M. F. et al. Folic acid supplementation modulates offspring genes involved in energy metabolism: In vivo study. **Clinical Nutrition Open Science**, v. 44, p. 15-27, 2022.
118. SURACE, A. E. A.; HEDRICH, C. M. The role of epigenetics in autoimmune/inflammatory disease. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 466419, 2019.
119. OBRI, A. et al. The role of epigenetics in the development of obesity. **Biochemical Pharmacology**, v. 177, p. 113973, 2020.
120. CUERVO, A. et al. Association of polyphenols from oranges and apples with specific intestinal microorganisms in systemic lupus erythematosus patients. **Nutrients**, v. 7, n. 2, p. 1301-1317, 2015.
121. MU, Q.; ZHANG, H.; LUO, X. M. SLE: another autoimmune disorder influenced by microbes and diet?. **Frontiers in immunology**, v. 6, p. 166179, 2015.
122. PETRI, M. et al. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. **Arthritis & Rheumatism**, v. 64, n. 8, p. 2677-2686, 2012.
123. GLADMAN, D. et al. The development and initial validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology damage index for systemic lupus erythematosus. **Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology**, v. 39, n. 3, p. 363-369, 1996.
124. TINIAKOU, E.; COSTENBADER, K. H.; KRIEGEL, M. A. Sex-specific environmental influences on the development of autoimmune diseases. **Clinical Immunology**, v. 149, n. 2, p. 182-191, 2013.
125. LU, Q. et al. Demethylation of CD40LG on the inactive X in T cells from women with lupus. **The journal of immunology**, v. 179, n. 9, p. 6352-6358, 2007.
126. RAUEN, T. et al. cAMP responsive element modulator: a critical regulator of cytokine production. **Trends in molecular medicine**, v. 19, n. 4, p. 262-269, 2013.
127. UNNIKRISHNAN, A. et al. The role of DNA methylation in epigenetics of aging. **Pharmacology & therapeutics**, v. 195, p. 172-185, 2019.
128. BACCHETTI, P. Current sample size conventions: flaws, harms, and alternatives. **BMC medicine**, v. 8, p. 1-7, 2010.
129. BACCHETTI, P; MCCULLOCH, C. E.; SEGAL, M. R. Simple, defensible sample sizes based on cost efficiency. **Biometrics**, v. 64, n. 2, p. 577-585, 2008.

130. EKNOYAN, G. Adolphe Quetelet (1796–1874)—the average man and indices of obesity. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 23, n. 1, p. 47-51, 2008.
131. SIRI, W. E. Body composition from fluid spaces and density: analysis of methods. 1956.
132. DURNIN, J. V.G.A.; WOMERSLEY, J. V. G. A. Body fat assessed from total body density and its estimation from skinfold thickness: measurements on 481 men and women aged from 16 to 72 years. **British journal of nutrition**, v. 32, n. 1, p. 77-97, 1974.
133. HIERONYMUS, K. et al. Validation of reference genes for whole blood gene expression analysis in cord blood of preterm and full-term neonates and peripheral blood of healthy adults. **BMC genomics**, v. 22, n. 1, p. 489, 2021.
134. BARBER, R. D. et al. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. **Physiological genomics**, v. 21, n. 3, p. 389-395, 2005.
135. LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ ΔΔCT method. **methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.
136. HEID, C. A. et al. Real time quantitative PCR. **Genome research**, v. 6, n. 10, p. 986-994, 1996.
137. ASSENOV, Y. et al. Comprehensive analysis of DNA methylation data with RnBeads. **Nature methods**, v. 11, n. 11, p. 1138-1140, 2014.
138. RITCHIE, M. E. et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. **Nucleic acids research**, v. 43, n. 7, p. e47-e47, 2015.
139. NARVAEZ, J. Lupus erythematosus 2020. **Medicina Clínica**, v. 155, n. 11, p. 494-501, 2020.
140. ARAKI, Y.; MIMURA, T. Epigenetic Dysregulation in the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 2, p. 1019, 2024.
141. MEZA-MEZA, M. R. et al. Relationship of excess weight with clinical activity and dietary intake deficiencies in systemic lupus erythematosus patients. **Nutrients**, v. 11, n. 11, p. 2683, 2019.
142. CORREA-RODRIGUEZ, M. et al. The impact of obesity on disease activity, damage accrual, inflammation markers and cardiovascular risk factors in systemic lupus erythematosus. **Panminerva Medica**, v. 62, n. 2, p. 75-82, 2020.
143. ABIRI, B. et al. Mental health and quality of life in different obesity phenotypes: a systematic review. **Health and quality of life outcomes**, v. 20, n. 1, p. 63, 2022.
144. DYE, L. et al. The relationship between obesity and cognitive health and decline. **Proceedings of the nutrition society**, v. 76, n. 4, p. 443-454, 2017.

145. KOTSIS, V. et al. Impact of obesity in kidney diseases. **Nutrients**, v. 13, n. 12, p. 4482, 2021.
146. RESTIVO, V. et al. Systematic review and meta-analysis of cardiovascular risk in rheumatological disease: Symptomatic and non-symptomatic events in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. **Autoimmunity Reviews**, v. 21, n. 1, p. 102925, 2022.
147. CONRAD, N. et al. Autoimmune diseases and cardiovascular risk: a population-based study on 19 autoimmune diseases and 12 cardiovascular diseases in 22 million individuals in the UK. **The Lancet**, v. 400, n. 10354, p. 733-743, 2022.
148. GOMEZ, A. et al. Impact of overweight and obesity on patient-reported health-related quality of life in systemic lupus erythematosus. **Rheumatology**, v. 60, n. 3, p. 1260-1272, 2021.
149. MUNGUÍA-REALPOZO, P. et al. Higher body mass index and disease duration are associated with increased risk of left ventricular diastolic dysfunction in women with systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 31, n. 13, p. 1639-1648, 2022.
150. SOLA-RODRÍGUEZ, S. et al. Physical fitness attenuates the impact of higher body mass and adiposity on inflammation in women with systemic lupus erythematosus. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 729672, 2021.
151. SIECZKOWSKA, S. M. et al. A randomized controlled trial of an intervention promoting physical activity and healthy eating recommendations in systemic lupus erythematosus: the protocol study “Living Well with Lupus”. **Rheumatology international**, v. 43, n. 10, p. 1799-1810, 2023.
152. NEGRÓN, A. M. et al. Factors associated with metabolic syndrome in patients with systemic lupus erythematosus from Puerto Rico. **Lupus**, v. 17, n. 4, p. 348-354, 2008.
153. VAN DER GOES, M. C.; JACOBS, J. W.; BIJLSMA, J. W. The value of glucocorticoid co-therapy in different rheumatic diseases-positive and adverse effects. **Arthritis research & therapy**, v. 16, p. 1-13, 2014.
154. ORAY, M. et al. Long-term side effects of glucocorticoids. **Expert opinion on drug safety**, v. 15, n. 4, p. 457-465, 2016.
155. WIERZBICKI, A. S. Lipids, cardiovascular disease and atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 9, n. 3, p. 194-201, 2000.
156. MEDEIROS, M. C. S. de et al. Impact of overweight and obesity on disease activity and remission in systemic lupus erythematosus: A systematic review and meta-analysis protocol. **Plos one**, v. 18, n. 6, p. e0287753, 2023.
157. DĄBROWSKA, E.; NARKIEWICZ, K.. Hypertension and dyslipidemia: the two partners in endothelium-related crime. **Current Atherosclerosis Reports**, v. 25, n. 9, p. 605-612, 2023.

158. ALLOUBANI, A.; NIMER, R.; SAMARA, R. Relationship between hyperlipidemia, cardiovascular disease and stroke: a systematic review. **Current Cardiology Reviews**, v. 17, n. 6, 2021.
159. HUERTA, M. D. R. et al. Healthy lifestyle habits for patients with systemic lupus erythematosus: a systemic review. In: **Seminars in arthritis and rheumatism**. WB Saunders, 2016. p. 463-470.
160. CHEN, X. et al. Dietary inflammation index is associated with dyslipidemia: evidence from national health and nutrition examination survey, 1999–2019. **Lipids in Health and Disease**, v. 22, n. 1, p. 149, 2023.
161. LI, L. et al. Associations of socioeconomic status and healthy lifestyle with incidence of dyslipidemia: a prospective Chinese Governmental Employee Cohort Study. **Frontiers in Public Health**, v. 10, p. 878126, 2022.
162. WANG, Y.; YU, H.; HE, J. Role of dyslipidemia in accelerating inflammation, autoimmunity, and atherosclerosis in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. **Discovery Medicine**, v. 30, n. 159, p. 49-56, 2020.
163. SOLIMAN, W. M. et al. Neutrophil to lymphocyte and platelet to lymphocyte ratios in systemic lupus erythematosus: relation with disease activity and lupus nephritis. **Reumatologia clinica**, v. 16, n. 4, p. 255-261, 2020.
164. RIVERA-CARRANZA, T. et al. The link between lymphocyte subpopulations in peripheral blood and metabolic variables in patients with severe obesity. **PeerJ**, v. 11, p. e15465, 2023.
165. LIU, R. et al. Regulatory T cells control effector T cell inflammation in human prediabetes. **Diabetes**, v. 71, n. 2, p. 264-274, 2022.
166. TOUCH, S.; CLÉMENT, K.; ANDRÉ, S. T cell populations and functions are altered in human obesity and type 2 diabetes. **Current diabetes reports**, v. 17, p. 1-8, 2017.
167. RODRÍGUEZ, C. P. et al. Peripheral lymphocytes, obesity, and metabolic syndrome in young adults: an immunometabolism study. **Metabolic syndrome and related disorders**, v. 16, n. 7, p. 342-349, 2018.
168. FURUNCUOĞLU, Y. et al. How obesity affects the neutrophil/lymphocyte and platelet/lymphocyte ratio, systemic immune-inflammatory index and platelet indices: a retrospective study. **European Review for Medical & Pharmacological Sciences**, v. 20, n. 7, 2016.
169. PURDY, J. C.; SHATZEL, J. J. The hematologic consequences of obesity. **European journal of haematology**, v. 106, n. 3, p. 306-319, 2021.
170. ZHANG, X. et al. Lupus pathogenesis and autoimmunity are exacerbated by high fat diet-induced obesity in MRL/lpr mice. **Lupus science & medicine**, v. 10, n. 1, p. e000898, 2023.

171. LEE, MR.; JUNG, S. M. Serum folate related to five measurements of obesity and high-sensitivity C-reactive protein in Korean adults. **Nutrients**, v. 14, n. 17, p. 3461, 2022.
172. TSAI, TY. et al. Serum Homocysteine, Folate, and Vitamin B12 Levels in Patients with Systemic Lupus Erythematosus: A Meta-Analysis and Meta-Regression. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 40, n. 5, p. 443-453, 2021.
173. DO PRADO, R. et al. Pediatric rheumatology Increased concentration of plasma homocysteine in children with systemic lupus erythematosus. **Clinical and experimental rheumatology**, v. 24, p. 594-598, 2006.
174. MIKKELSEN, K.; APOSTOLOPOULOS, V. Vitamin B12, folic acid, and the immune system. **Nutrition and immunity**, p. 103-114, 2019.
175. STEED, M.M.; TYAGI, S. C. Mechanisms of cardiovascular remodeling in hyperhomocysteinemia. **Antioxidants & redox signaling**, v. 15, n. 7, p. 1927-1943, 2011.
176. JONES, P. et al. Folate and inflammation—links between folate and features of inflammatory conditions. **Journal of nutrition & intermediary metabolism**, v. 18, p. 100104, 2019.
177. CHEN, PM.; TSOKOS, G. C. The role of CD8+ T-cell systemic lupus erythematosus pathogenesis: an update. **Current opinion in rheumatology**, v. 33, n. 6, p. 586-591, 2021.
178. CLARE, C. E. et al. One-carbon metabolism: linking nutritional biochemistry to epigenetic programming of long-term development. **Annual review of animal biosciences**, v. 7, p. 263-287, 2019.
179. CARLIN, JL.; GEORGE, R.; REYES, T. M. Methyl donor supplementation blocks the adverse effects of maternal high fat diet on offspring physiology. **PLoS one**, v. 8, n. 5, p. e63549, 2013.
180. KOLB, A. F.; PETRIE, L. Folate deficiency enhances the inflammatory response of macrophages. **Molecular immunology**, v. 54, n. 2, p. 164-172, 2013.
181. SINCLAIR, K. D. et al. DNA methylation, insulin resistance, and blood pressure in offspring determined by maternal periconceptional B vitamin and methionine status. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 49, p. 19351- 19356, 2007.
182. SANTARPIA, L.; LIPPMAN, S. M.; EL-NAGGAR, A. K. Targeting the MAPK–RAS–RAF signaling pathway in cancer therapy. **Expert opinion on therapeutic targets**, v. 16, n. 1, p. 103-119, 2012.
183. ROSKOSKI JR, R. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. **Pharmacological research**, v. 66, n. 2, p. 105-143, 2012.

184. THIEL, M. J. et al. Central role of the MEK/ERK MAP kinase pathway in a mouse model of rheumatoid arthritis: potential proinflammatory mechanisms. **Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology**, v. 56, n. 10, p. 3347-3357, 2007.
185. SWEENEY, S. E.; FIRESTEIN, Gary S. Signal transduction in rheumatoid arthritis. **Current opinion in rheumatology**, v. 16, n. 3, p. 231-237, 2004.
186. CEDENO, S. et al. Defective activity of ERK-1 and ERK-2 mitogen-activated protein kinases in peripheral blood T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus: potential role of altered coupling of Ras guanine nucleotide exchange factor hSos to adapter protein Grb2 in lupus T cells. **Clinical Immunology**, v. 106, n. 1, p. 41-49, 2003.
187. BISHOP, G. A. et al. Molecular mechanisms of B lymphocyte activation by the immune response modifier R-848. **The Journal of Immunology**, v. 165, n. 10, p. 5552-5557, 2000.
188. LIAO, S. et al. Identification of the shared genes and immune signatures between systemic lupus erythematosus and idiopathic pulmonary fibrosis. **Hereditas**, v. 160, n. 1, p. 9, 2023.
189. HAN, L.; ZHANG, L. CCL21/CCR7 axis as a therapeutic target for autoimmune diseases. **International Immunopharmacology**, v. 121, p. 110431, 2023.
190. BAUER, J. W. et al. Interferon-regulated chemokines as biomarkers of systemic lupus erythematosus disease activity: a validation study. **Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology**, v. 60, n. 10, p. 3098-3107, 2009.
191. RUPASINGHE, HP V. et al. Phytochemicals in regulating fatty acid β -oxidation: Potential underlying mechanisms and their involvement in obesity and weight loss. **Pharmacology & therapeutics**, v. 165, p. 153-163, 2016.
192. WU, T. et al. Metabolic disturbances associated with systemic lupus erythematosus. **PloS one**, v. 7, n. 6, p. e37210, 2012.
193. FERNANDEZ, D.; PERL, A. Metabolic control of T cell activation and death in SLE. **Autoimmunity reviews**, v. 8, n. 3, p. 184-189, 2009.
194. ROGGE, M. M. The role of impaired mitochondrial lipid oxidation in obesity. **Biological research for nursing**, v. 10, n. 4, p. 356-373, 2009.
195. DEROSA, G.; SAHEBKAR, A.; MAFFIOLI, P. The role of various peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands in clinical practice. **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, n. 1, p. 153-161, 2018.
196. WANG, YX. PPARs: diverse regulators in energy metabolism and metabolic diseases. **Cell research**, v. 20, n. 2, p. 124-137, 2010.

197. LIU, Y. et al. Increased expression of PPAR- γ modulates monocytes into a M2-like phenotype in SLE patients: an implicative protective mechanism and potential therapeutic strategy of systemic lupus erythematosus. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 579372, 2021.
198. WANG, S.; DOUGHERTY, E. J.; DANNER, R. L. PPAR γ signaling and emerging opportunities for improved therapeutics. **Pharmacological Research**, v. 111, p. 76-85, 2016.
199. WAGNER, N.; WAGNER, KD. The role of PPARs in disease. **Cells**, v. 9, n. 11, p. 2367, 2020.
200. KISS, M.; CZIMMERER, Z.; NAGY, L. The role of lipid-activated nuclear receptors in shaping macrophage and dendritic cell function: From physiology to pathology. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 132, n. 2, p. 264-286, 2013.
201. CHOI, JM.; BOTHWELL, A. LM. The nuclear receptor PPARs as important regulators of T-cell functions and autoimmune diseases. **Molecules and cells**, v. 33, n. 3, p. 217-222, 2012.
202. SCHEEN, A. J.; ESSER, N.; PAQUOT, N. Antidiabetic agents: potential anti-inflammatory activity beyond glucose control. **Diabetes & metabolism**, v. 41, n. 3, p. 183-194, 2015.
203. WANG, Z. et al. PPARs/macrophages: A bridge between the inflammatory response and lipid metabolism in autoimmune diseases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 684, p. 149128, 2023.
204. APRAHAMIAN, T. et al. The peroxisome proliferator-activated receptor γ agonist rosiglitazone ameliorates murine lupus by induction of adiponectin. **The Journal of Immunology**, v. 182, n. 1, p. 340-346, 2009.
205. SUN, W. et al. Lipid metabolism: immune regulation and therapeutic perspectives in systemic lupus erythematosus. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 860586, 2022.
206. JANG, D. et al. The role of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in autoimmune disease and current TNF- α inhibitors in therapeutics. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 5, p. 2719, 2021.
207. JUHASZ, K.; BUZAS, K.; DUDA, E. Importance of reverse signaling of the TNF superfamily in immune regulation. **Expert review of clinical immunology**, v. 9, n. 4, p. 335-348, 2013.
208. JIN, S.; YU, C.; YU, B. Changes of serum IL-6, IL-10 and TNF- α levels in patients with systemic lupus erythematosus and their clinical value. **American Journal of Translational Research**, v. 13, n. 4, p. 2867, 2021.
209. DE OLIVEIRA, P. S. S. et al. Atorvastatin inhibits IL-17A, TNF, IL-6, and IL-10 in PBMC cultures from patients with severe rheumatoid arthritis. **Immunobiology**, v. 225, n. 3, p. 151908, 2020.

210. SHI, C. et al. IL-6 and TNF- α induced obesity-related inflammatory response through transcriptional regulation of miR-146b. **Journal of interferon & cytokine research**, v. 34, n. 5, p. 342-348, 2014.
211. SU, X.; CHENG, Y.; CHANG, D. The important role of leptin in modulating the risk of dermatological diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 593564, 2021.
212. FAN, JL. et al. The exploration of shared genes and molecular mechanisms of systemic lupus erythematosus and atherosclerosis. **Lupus**, v. 32, n. 2, p. 239-251, 2023.
213. COPPACK, S. W. Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. **Proceedings of the nutrition society**, v. 60, n. 3, p. 349-356, 2001.
214. SINDHU, S. et al. Obesity is a positive modulator of IL-6R and IL-6 expression in the subcutaneous adipose tissue: significance for metabolic inflammation. **PloS one**, v. 10, n. 7, p. e0133494, 2015.
215. ROŚĆ, D. et al. CRP, but not TNF- α or IL-6, decreases after weight loss in patients with morbid obesity exposed to intensive weight reduction and balneological treatment. **Journal of Zhejiang University. Science. B**, v. 16, n. 5, p. 404, 2015.
216. LARSSON, A. et al. The body mass index (BMI) is significantly correlated with levels of cytokines and chemokines in cerebrospinal fluid. **Cytokine**, v. 76, n. 2, p. 514-518, 2015.
217. CHAIT, A.; DEN HARTIGH, L. J. Adipose tissue distribution, inflammation and its metabolic consequences, including diabetes and cardiovascular disease. **Frontiers in cardiovascular medicine**, v. 7, p. 522637, 2020.
218. BATTINENI, G. et al. Impact of obesity-induced inflammation on cardiovascular diseases (CVD). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 9, p. 4798, 2021.
219. RICHTER, P. et al. Cytokines in Systemic Lupus Erythematosus—Focus on TNF- α and IL-17. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 19, p. 14413, 2023.
220. DING, J. et al. Serum interleukin-6 level is correlated with the disease activity of systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. **Clinics**, v. 75, p. e1801, 2020.
221. REN, W.; GAO, L.; SONG, J. Structural basis of DNMT1 and DNMT3A-mediated DNA methylation. **Genes**, v. 9, n. 12, p. 620, 2018.
222. ABBASIFARD, M. et al. Evaluation of epigenetic-related gene expression (DNMT, HDAC1) in Iranian patients with systemic lupus erythematosus. **Reumatología Clínica**, v. 19, n. 7, p. 358-362, 2023.
223. LIANG, J. et al. A correlation study on the effects of DNMT1 on methylation levels in CD4⁺ T cells of SLE patients. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 8, n. 10, p. 19701, 2015.

224. BALADA, E. et al. Transcript levels of DNA methyltransferases DNMT1, DNMT3A and DNMT3B in CD4+ T cells from patients with systemic lupus erythematosus. **Immunology**, v. 124, n. 3, p. 339-347, 2008.
225. CIERZNIAK, A. et al. DNA methylation in adipocytes from visceral and subcutaneous adipose tissue influences insulin-signaling gene expression in obese individuals. **International Journal of Obesity**, v. 45, n. 3, p. 650-658, 2021.
226. KAJIMURA, S. The epigenetic regulation of adipose tissue plasticity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 118, n. 15, p. e2102944118, 2021.
227. HOU, L.; LI, S.; ZHAO, M. Obesity promotes the global hypomethylation of CD4+ T cells in patients with systemic lupus erythematosus via downregulating DNMT1. **Panminerva Medica**, 2020.
228. GORELIK, G.; RICHARDSON, B. Aberrant T cell ERK pathway signaling and chromatin structure in lupus. **Autoimmunity reviews**, v. 8, n. 3, p. 196-198, 2009.
229. DENG, C. et al. Decreased ras–mitogen-activated protein kinase signaling may cause DNA hypomethylation in T lymphocytes from lupus patients. **Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology**, v. 44, n. 2, p. 397-407, 2001.
230. ELDOSOUKY, M. K. et al. Correlation between serum leptin and its gene expression to the anthropometric measures in overweight and obese children. **Cellular and Molecular Biology**, v. 64, n. 1, p. 84-90, 2018.
231. AL-TAHAMI, B. A. et al. Impaired microvascular endothelial function in relatively young obese humans is associated with altered metabolic and inflammatory markers. **Clinical hemorheology and microcirculation**, v. 47, n. 2, p. 87-97, 2011.
232. SANIP, Z. et al. Obesity indices and metabolic markers are related to hs-CRP and adiponectin levels in overweight and obese females. **Obesity research & clinical practice**, v. 7, n. 4, p. e315-e320, 2013.
233. ROVIN, B. H. et al. Plasma, urine, and renal expression of adiponectin in human systemic lupus erythematosus. **Kidney international**, v. 68, n. 4, p. 1825-1833, 2005.
234. EHLING, A. et al. The potential of adiponectin in driving arthritis. **The Journal of Immunology**, v. 176, n. 7, p. 4468-4478, 2006.
235. WAMPLER MUSKARDIN, T. L. et al. Lessons from precision medicine in rheumatology. **Multiple Sclerosis Journal**, v. 26, n. 5, p. 533-539, 2020.

ANEXOS E APÊNDICES

ANEXO A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do projeto.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP¹

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DA PESQUISA

Título da pesquisa - Efeito da suplementação ácido fólico e vitamina B12 no perfil epigenético de pacientes com lúpus e obesidade

Pesquisador principal – Carolina Nicoletti Ferreira Fino

Departamento/Instituto - Divisão de Reumatologia / Faculdade de Medicina

Convite à participação

Gostaríamos de convidá-la a participar deste estudo. Estamos convidando os pacientes do ambulatório de Reumatologia do Serviço de Reumatologia, Hospital das Clínicas - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) com o diagnóstico de lúpus eritematoso sistêmico (lúpus). Caso você aceite o convite, você realizará alguns exames que estão descritos abaixo, no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Justificativa e objetivos do estudo

Sabe-se que no desenvolvimento do lúpus eritematoso sistêmico se observa aumento da inflamação em diversas partes do corpo, prejudicando a função de diversos órgãos. Mecanismos genéticos relacionados ao DNA podem estar associados a piora do quadro da doença. A suplementação de nutrientes como vitamina B12 e ácido fólico, normalmente feita em cápsulas, parece ter um efeito importante no controle genético da doença, melhorando a inflamação, podendo ajudar na melhora dos sintomas. Dessa forma, o objetivo desse estudo é verificar os efeitos da suplementação de vitamina B12 e ácido fólico em pacientes com lúpus e as possíveis alterações no DNA. Espera-se que a suplementação afete beneficemente a atividade da doença e a melhora de parâmetros clínicos e de qualidade de vida.

Procedimentos que serão realizados e métodos que serão empregados

Abaixo estão descritos os exames que serão feitos por você.

Nome resumido do projeto: Epigenética, obesidade e lúpus	Confidencial
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido versão 1.0 de 17 de maio de 2021	
Nome do pesquisador: Carolina Nicoletti Ferreira Fino Hospital Das Clínicas Da Faculdade De Medicina Da USP	_____ Rubrica do Participante da Pesquisa/Rrepresentante legal
	_____ Rubrica do Investigador Responsável

Após estes exames, você poderá ser sorteada em um destes dois grupos: 1) grupo suplementação (que receberá cápsula com 400 mcg de ácido fólico e 2000 mcg de vitamina B12 por dia) ou 2) Placebo (polpa de celulose). Em ambos os grupos, esta suplementação será feita por meio da ingestão de 1 cápsula ao dia. Após 3 meses de suplementação, os exames que foram realizados antes da suplementação serão repetidos.

- Responder a questionários: você precisará responder algumas perguntas específicas que ajudarão a determinar se a suplementação ajudou a melhorar os sintomas da sua doença e sua qualidade de vida;

- Análise da sua alimentação (todos os alimentos que você consome durante um dia) por meio do questionário chamado de Recordatório 24 horas;

- Medidas de peso, altura (por meio de uma balança) e circunferência do abdômen (por meio de uma fita métrica);

- Avaliação da composição corporal, ou seja, do quanto você tem de massa gorda e de massa magra (massa livre de gordura). Este exame será realizado em um equipamento chamado DXA, o qual consiste em uma máquina que "escaneia" seu corpo, sem nenhum risco;

- Coleta de sangue, que será feita em jejum de 12 horas para ajudar a determinar como está a atividade da sua doença. A coleta será feita na veia do seu braço, como as coletas de sangue que você faz normalmente do laboratório do Hospital das Clínicas;

- Realização de uma biópsia na região do umbigo que será feita na enfermaria da Disciplina de Reumatologia, em uma sala própria para o procedimento, por um médico treinado. Nessa etapa, retiraremos um pequeno pedaço (cerca de 2g) de tecido de gordura da sua região abdominal. Você será orientada a deitar-se em uma maca, com o corpo relaxado. O médico fará uma "limpeza" do local e, em seguida, aplicará anestesia local. Depois que ele confirmar que a anestesia fez efeito, ele fará um pequeno corte (1 cm), retirará o pedaço de gordura e, em seguida, irá costurar com linha própria de cirurgia (cerca de quatro pontos). No final do experimento, o médico fará um curativo que não poderá ser molhado por 24 horas e deverá ser mantido por pelo menos 3 dias. Vale à pena lembrar que essa técnica tem uma baixíssima taxa de problemas após o procedimento. Você poderá sentir um desconforto leve como dor ou inchaço. Esse pedaço de gordura será utilizado para avaliar seu DNA.

Todos os procedimentos descritos acima não fazem parte de sua rotina de acompanhamento no hospital e, portanto, são considerados experimentais.

Explicação de possíveis desconfortos e riscos decorrentes da participação na pesquisa

Nome resumido do projeto: Epigenética, obesidade e lúpus	Confidencial
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido versão 1.0 de 17 de maio de 2021	
Nome do pesquisador: Carolina Nicoletti Ferreira Fino Hospital Das Clínicas Da Faculdade De Medicina Da USP	_____ Rubrica do Participante da Pesquisa/Representante legal
	_____ Rubrica do Investigador Responsável

O exame de densitometria óssea (DXA) envolve a exposição a uma pequena quantidade de radiação (0,002 mSv; colocando em perspectiva, em um vôo de 1 hora você seria exposto a aproximadamente 0,004 a 0,010 mSv, dependendo da localização). Você não sentirá nenhum desconforto e o exame é considerado seguro.

Se você tiver medo de agulhas, você poderá sentir certo desconforto durante a coleta de sangue, que poderá causar um leve desconforto no local da picada, mas deve desaparecer em um dia. Além disso, a agulha poderá causar uma leve dor no local da picada, que deve desaparecer logo após o término do procedimento ou até 24 horas após o exame. Em casos menos comuns, um pequeno roxo (hematoma) aparece no local da picada, mas deve desaparecer em até 7 dias.

Na biópsia, você poderá sentir uma dor leve a moderada por conta da anestesia e da coleta do tecido de gordura. Além disso, após o procedimento, você poderá apresentar dor ou inchaço no local, que devem desaparecer em até 7 dias. Em casos menos comuns, um pequeno roxo (hematoma) aparece no local, mas deve desaparecer em até 7 dias.

A fim de evitar ou minimizar todos os desconfortos ou riscos descritos, as avaliações serão sempre conduzidas por profissionais treinados para as técnicas empregadas. Todas as medidas de segurança, que são específicas para cada exame realizado, serão empregadas a fim de garantir o menor desconforto possível durante sua participação no estudo.

Em conjunto, os desconfortos ou riscos dos procedimentos descritos acima são classificados como médio.

Benefícios esperados para o participante

Você realizará alguns testes, que não são rotineiros, como DXA, análise da alimentação e do seu DNA, estes testes podem trazer informações importante em relação à sua saúde no presente momento. A suplementação de ácido fólico e vitamina B12 pode trazer melhora da inflamação e do quadro clínico da sua doença. Logo, acreditamos que ela também será benéfica para sua saúde.

Esclarecimento sobre a forma de acompanhamento e assistência a que terão direito os participantes da pesquisa

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. A pesquisadora responsável é a Dra. Carolina Nicoletti Ferreira Fino. A pesquisadora irá acompanhá-la em todas as etapas do estudo, desdeo recrutamento e realização dos exames. Ao final do estudo a pesquisadora irá lhe entregar os

Nome resumido do projeto: Epigenética, obesidade e lúpus	Confidencial
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido versão 1.0 de 17 de maio de 2021	
Nome do pesquisador: Carolina Nicoletti Ferreira Fino Hospital Das Clínicas Da Faculdade De Medicina Da USP	_____ Rubrica do Participante da Pesquisa/Rrepresentante legal
	_____ Rubrica do Investigador Responsável

resultados dos seus exames, explicando o significado de cada um deles. Além disso, se os procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo lhe causarem algum mal-estar ou desconforto, você terá direito a tratamento médico no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP.

Os resultados obtidos serão analisados em conjunto com outros pacientes e mantidos em sigilo. Serão divulgados apenas em publicações científicas, sem a menção dos seus dados pessoais. Caso deseje, poderá pessoalmente tomar conhecimento dos resultados, ao final da pesquisa.

Os pesquisadores se comprometem a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Garantias de plena liberdade ao participante de recusar-se a participar ou retirar o seu consentimento em qualquer fase da pesquisa sem penalização alguma, de sigilo e privacidade. Garantia de que o participante receberá uma via do termo de consentimento

Você tem a liberdade de desistir ou interromper sua colaboração e deixar de participar deste estudo no momento em que desejar sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição. Além disso, você receberá uma cópia do presente termo de consentimento livre e esclarecido.

Explicitação das garantias de ressarcimento por despesas decorrentes da pesquisa e explicitação da garantia de indenização por eventuais danos decorrentes da pesquisa

Você não terá despesas pessoais em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Armazenamento e cuidados com as amostras de sangue e tecido adiposo (gordura)

Os pesquisadores se comprometem a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa. Todas amostras de sangue e de tecido de gordura coletadas ficarão armazenadas na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (de acordo com a resolução 441/2011), em um freezer apropriado para o armazenamento do material e protegido com um sistema de digital, pois as análises descritas no tópico 2 precisam ser realizadas em um momento posterior ao dia da coleta das amostras.

Caso parte das amostras coletadas não seja utilizada, manteremos suas amostras sanguíneas e musculares por um período de até 3 anos após a conclusão do projeto, e então iremos descartá-las, conforme normas vigentes, após este período. Respeitamos esse prazo pois

Nome resumido do projeto: Epigenética, obesidade e lúpus	Confidencial
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido versão 1.0 de 17 de maio de 2021	
Nome do pesquisador: Carolina Nicoletti Ferreira Fino Hospital Das Clínicas Da Faculdade De Medicina Da USP	_____ Rubrica do Participante da Pesquisa/Representante legal
	_____ Rubrica do Investigador Responsável

ocasionalmente revistas científicas ou a agência que financia nossa pesquisa pode nos pedir análises adicionais ou esclarecimentos. Dentro desse período, caso haja necessidade ou interesse do nosso grupo de pesquisa ou de outros em realizar análises adicionais com suas amostras já coletadas e armazenadas, o Pesquisador Principal entrará em contato com você para explicar os motivos da nova análise e solicitar a sua aprovação. Caso você autorize o uso das suas amostras para eventuais novas análises, pediremos que você assine um novo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, o qual deverá ter sido aprovado pelo comitê de ética.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de dúvidas. A Dra. Carolina Nicoletti Ferreira Fino pode ser encontrada no endereço Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 255 – 4º andar – LACRE – Laboratório de Avaliação e Condicionamento em Reumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP. Telefone: 2661-8022, e-mail: carol_nicolettif@yahoo.com.br. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: (11) 2661-7585, (11) 2661-1548, (11) 2661-1549; e-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br.

Fui suficientemente informado a respeito do estudo “Efeito da suplementação ácido fólico e vitamina B12 no perfil epigenético de pacientes com lúpus e obesidade”.

Eu discuti as informações acima com a Pesquisador Responsável (Dra. Carolina Nicoletti Ferreira Fino) sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim os objetivos, os procedimentos, os potenciais desconfortos e riscos e as garantias. Concordo voluntariamente em participar deste estudo, assino este termo de consentimento e recebo um via rubricada pelo pesquisador.

_____ Data ____/____/____

Assinatura do participante /representante legal

Nome do participante/representante legal

_____ Data ____/____/____

Assinatura do responsável pelo estudo

Nome resumido do projeto: Epigenética, obesidade e lúpus	Confidencial
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido versão 1.0 de 17 de maio de 2021	
Nome do pesquisador: Carolina Nicoletti Ferreira Fino Hospital Das Clínicas Da Faculdade De Medicina Da USP	_____ Rubrica do Participante da Pesquisa/Rrepresentante legal
	_____ Rubrica do Investigador Responsável

APÊNDICE A – Guia de Localização do LACRE e cadastramento para entrada no Hospital das Clínicas



LABORATÓRIO DE AVALIAÇÃO E CONDICIONAMENTO EM REUMATOLOGIA

LACRE



LOCAL



HOSPITAL DAS CLÍNICAS
AV. DR. ENÉAS DE CARVALHO AGUIAR, 255
CERQUEIRA CÉSAR, SÃO PAULO/SP
CEP 05403-000



LOCAL

LACRE
4º ANDAR DO PRÉDIO DOS AMBULATÓRIOS





ENTRADA

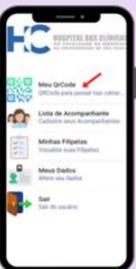
- 1 Baixe o aplicativo "HC-ABRACATRACA" em seu celular.
- 2 Clique em "Cadastre-se" e preencha seus dados: RGHC, aniversário, CPF, nome completo, e-mail e crie uma senha.





ENTRADA

- 3 Clique em "Meu QrCode".
- 4 Você terá acesso a um código que conseguirá liberar sua entrada no prédio!


Caso não consiga baixar o aplicativo...

ENTRE EM CONTATO CONOSCO (JHULIA OU LUCAS) QUE TE ENCONTRAREMOS EM FRENTE ÀS CATRACAS.




ESTAMOS SEGUINDO TODAS AS ORIENTAÇÕES PARA A PREVENÇÃO DA COVID-19!
O USO DE MÁSCARAS DE PROTEÇÃO É OBRIGATÓRIO.





APÊNDICE B – Guia de recomendações básicas para cuidado pós biópsia de tecido adiposo

