

Letícia Lobato Souza

Efeito do tratamento com ácido fólico no perfil de metilação do DNA de adipócitos de
pacientes com lúpus eritematoso sistêmico: estudo *in vitro*

(Versão corrigida. Resolução CoPGr nº 6018, de 30 de outubro de 2011. A versão original está
disponível na Biblioteca FMUSP).

São Paulo

2024

Letícia Lobato Souza

Efeito do tratamento com ácido fólico no perfil de metilação do DNA de adipócitos de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico: estudo *in vitro*

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 30 de outubro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP).

São Paulo

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Souza, Leticia Lobato

Efeito do tratamento com ácido fólico no perfil de metilação do DNA de adipócitos de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico : estudo in vitro / Leticia Lobato Souza; Carolina Nicoletti Ferreira Fino, orientador. -- São Paulo, 2024.

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

1.Obesidade 2.Lúpus eritematoso sistêmico 3.Acido fólico
4.Cultura celular 5.Epigenética 6.Expressão gênica I.Fino, Carolina Nicoletti Ferreira, orient. II.Título

USP/FM/DBD-386/24

Responsável: Daniela Amaral Barbosa, CRB-8 7533

Nome: SOUZA, Letícia Lobato

Título: Efeito do tratamento com ácido fólico no perfil de metilação do DNA de adipócitos de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico: estudo in vitro.

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

Aprovado em: 29 de outubro de 2024.

Banca examinadora

Profa. Dra.:

Lígia Watanabe

Instituição:

FCFRP - USP

Julgamento:

Aprovado.

Prof. Dr.:

Guilherme Giannini Artioli

Instituição:

ICB - USP

Julgamento:

Aprovado.

Profa. Dra.:

Fernanda Montiel Dalio

Instituição:

Externo

Julgamento:

Aprovado.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha gratidão a todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para a conclusão deste trabalho e que facilitaram o processo ao longo desses anos. Esta jornada teria sido imensuravelmente mais difícil sem vocês.

À minha orientadora, Carolina Nicoletti, meu mais sincero obrigada! Não só pela orientação excelente e por ser uma profissional brilhante, mas sobretudo, por ser tão humana e por fazer parte dos motivos pelos quais escolher fazer um mestrado se tornou uma das minhas melhores decisões nesta vida.

Aos meus parceiros de trabalho: Lucas Carvalho, Amanda Ribeiro, Jhulia Caroline e Beatriz Carvalho, vocês são incríveis! Nossos dias de convivência ficarão para sempre em minhas memórias.

Às minhas amigas nesta e em outras vidas, Fernanda e Elisama, por sempre estarem dispostas a me ajudar e me escutar em qualquer circunstância. Vocês são “um apoio e tanto”.

Por fim, agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela oportunidade e pelo apoio financeiro concedido por meio do processo nº 2022/09301-2.

Dedico este trabalho à minha avó e aos meus pais, que, mesmo sem compreenderem completamente sua natureza, sempre foram e serão minha maior torcida e inesgotável fonte de amor.

RESUMO

SOUZA L. L: Efeito do tratamento com ácido fólico no perfil de metilação do DNA de adipócitos de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico: estudo *in vitro* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2024.

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença crônica autoimune com etiologia multifatorial que afeta diversos órgãos e sistemas, impactando severamente a qualidade de vida das pessoas acometidas. Fatores genéticos, epigenéticos, hormonais, ambientais e imunológicos estão envolvidos em sua fisiopatologia, com destaque para as alterações nos níveis de metilação do DNA, que tem sido propostas como fator contribuinte para o desenvolvimento da autoimunidade. A obesidade pode agravar as manifestações clínicas da doença devido à inflamação sistêmica. Neste cenário, evidências sugerem uma relação negativa entre LES e obesidade. O ácido fólico, conhecido por ser um doador de grupo metil, pode influenciar a metilação do DNA. Estudos sugerem que baixos níveis de folato estão associados à diminuição da metilação global do DNA, aumentando o risco de LES e outras doenças autoimunes. Este estudo teve como objetivo avaliar se o tratamento *in vitro* com ácido fólico foi capaz de modular o perfil de metilação do DNA em culturas de adipócitos representativos de LES, verificando possíveis diferenças entre os grupos peso adequado (n=1) e obesidade (n=1). Os objetivos secundários incluíram a comparação dos níveis de expressão dos genes adiponectina (*ADIPOQ*), leptina (*LEP*), interleucina-6 (*IL-6*), transdutor de sinal e ativador da transcrição 3 (*STAT3*), modificador do elemento responsivo ao cAMP 2 (*CREM2*) e DNA metiltransferase 1 (*DNMT1*) antes e após o tratamento. Este é um estudo experimental *in vitro* com adipócitos provenientes de tecido adiposo de pacientes com LES e peso adequado ou obesidade. Os adipócitos foram isolados, cultivados e tratados com ácido fólico diluído em NaOH (0,02g NaOH qs) por 48 horas. Após este período, foi realizada a extração de ácidos nucleicos para análise do perfil de metilação do DNA e de expressão gênica. Na comparação entre os grupos peso adequado e obesidade, foram identificadas 1.755 CpGs diferencialmente metiladas (CpGDMs), com predominância de hipometilação no grupo obesidade. As análises de enriquecimento associaram essas CpGDMs a vias metabólicas relacionadas ao diabetes mellitus tipo 1. Quando o grupo peso adequado foi comparado antes e depois do tratamento com ácido fólico, observou-se hipometilação em 755 CpGs após o tratamento, com destaque para vias metabólicas como a diferenciação dos linfócitos Th1 e Th2. Já nas culturas do grupo obesidade, o tratamento com ácido fólico resultou em hipermetilação da maioria das CpGs, associadas principalmente à via de sinalização cAMP, importante na patogênese do LES. Os resultados da expressão gênica mostraram uma variação significativa entre as culturas celulares de adipócitos dos grupos peso adequado e obesidade. Os genes *ADIPOQ*, *LEP* e *IL-6* apresentaram maior expressão na cultura obesidade em comparação com a peso adequado, tanto antes quanto após o tratamento. A suplementação aumentou os níveis de expressão do gene *STAT3* em ambas as culturas obesidade e peso adequado. Após o tratamento, a expressão de *CREM2* aumentou tanto na cultura peso adequado quanto na cultura obesidade. O tratamento com ácido fólico elevou os níveis de expressão do gene *IL-6* na cultura peso adequado. Assim, o tratamento *in vitro* com ácido fólico alterou o perfil de metilação do DNA e, em partes, de expressão gênica nas culturas de adipócitos representativas do ambiente LES, com efeitos distintos na presença ou não de obesidade associada. Observou-se que o tratamento modificou os níveis de metilação em diferentes genes associados a vias metabólicas, variando entre os grupos, destacando-se o papel da obesidade como um fator agravante da inflamação no contexto do LES.

Palavras-chave: Obesidade. Lúpus eritematoso sistêmico. Ácido fólico. Cultura celular. Epigenética. Expressão gênica.

ABSTRACT

SOUZA L. L: Effect of folic acid treatment on the DNA methylation profile of adipocytes from patients with systemic lupus erythematosus: *an in vitro study* [dissertation]. São Paulo: Faculty of Medicine, University of São Paulo; 2024.

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is a chronic autoimmune disease with a multifactorial etiology that affects various organs and systems, severely impacting the quality of life of those affected. Genetic, epigenetic, hormonal, environmental, and immunological factors are involved in its pathophysiology, with an emphasis on changes in DNA methylation levels, which have been proposed as a contributing factor to the development of autoimmunity. Obesity can exacerbate the clinical manifestations of the disease due to systemic inflammation. In this context, evidence suggests a negative relationship between SLE and obesity. Folate, known for being a methyl group donor, can influence DNA methylation. Studies suggest that low folate levels are associated with a decrease in global DNA methylation, increasing the risk of SLE and other autoimmune diseases. This study aimed to evaluate whether *in vitro* treatment with folic acid could modulate the DNA methylation profile in adipocyte cultures representative of SLE, examining possible differences between the normal weight group (n=1) and the obesity group (n=1). Secondary objectives included comparing the expression levels of the genes adiponectin (ADIPOQ), leptin (LEP), interleukin-6 (IL-6), signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), cAMP-responsive element modulator 2 (CREM2), and DNA methyltransferase 1 (DNMT1) before and after treatment. This is an experimental *in vitro* study with adipocytes derived from adipose tissue of patients with SLE and either normal weight or obesity. The adipocytes were isolated, cultured, and treated with folic acid diluted in NaOH (0.02g NaOH qs) for 48 hours. After this period, nucleic acids were extracted for DNA methylation and gene expression analysis. In the comparison between the normal weight and obesity groups, 1,755 differentially methylated CpGs (CpGDMs) were identified, with a predominance of hypomethylation in the obesity group. Enrichment analyses associated these CpGDMs with metabolic pathways related to type 1 diabetes mellitus. When the normal weight group was compared before and after treatment with folic acid, hypomethylation was observed in 755 CpGs after treatment, with an emphasis on metabolic pathways such as Th1 and Th2 lymphocyte differentiation. In the obesity group cultures, treatment with folic acid resulted in hypermethylation of most CpGs, primarily associated with the cAMP signaling pathway, important in the pathogenesis of SLE. Gene expression results showed significant variation between the adipocyte cultures of the normal weight and obesity groups. The genes ADIPOQ, LEP, and IL-6 exhibited higher expression in the obesity culture compared to the normal weight culture, both before and after treatment. Supplementation increased STAT3 gene expression levels in both obesity and normal weight cultures. After treatment, CREM2 expression increased in both the normal weight and obesity cultures. Folic acid treatment raised IL-6 gene expression levels in the normal weight culture. Thus, *in vitro* treatment with folic acid altered the DNA methylation profile and, in part, the gene expression profile in adipocyte cultures representative of the SLE environment, with distinct effects in the presence or absence of associated obesity. The treatment modified methylation levels in different genes associated with metabolic pathways, varying between the groups, highlighting the role of obesity as an aggravating factor of inflammation in the context of SLE.

Keywords: Obesity. Systemic lupus erythematosus. Folic acid. Cell culture. Epigenetics. Gene expression.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação de um adipócito e imagem do tecido adiposo.	26
Figura 2 - Tecido adiposo branco, vias metabólicas e doenças associadas.	29
Figura 3 - Representação esquematizada de metilação no carbono 5' da citosina.	30
Figura 4 - Representação esquemática da atuação da enzima DNMT1.	31
Figura 5 - Estudos publicados por ano com os descritores (systemic lupus erythematosus (AND) DNA methylation).	32
Figura 6 - Estudos publicados por ano com os descritores “obesity (AND) DNA methylation”.	33
Figura 7 - Representação esquemática do processo de doação de agrupamento metil do ácido fólico as reações de metilação de DNA.	36
Figura 8 - Fluxograma representativo dos procedimentos realizados no presente estudo.	42
Figura 9 - Garrafas de cultura dos grupos: LES e peso adequado: controle e tratamento e grupo LES e obesidade: controle e tratamento.	45
Figura 10 - Culturas celulares de adipócitos.	46
Figura 11 - Beadchip Infinium Methylation EPIC v2.0 Kit (lâmina).	48
Figura 12 - Heatmap das 1.755 CpGs diferencialmente metiladas entre as culturas de células do Grupo peso adequado controle e Grupo obesidade.	53
Figura 13 - Caracterização dos sítios CpG diferentemente metilados entre pacientes com LES e Peso adequado e LES e obesidade controle.	54
Figura 14 - Análise de enriquecimento das CpGs hipometiladas no Grupo obesidade controle quando comparada ao Grupo peso adequado controle.	55
Figura 15 - Análise de enriquecimento das CpGs hipermetiladas no Grupo obesidade controle quando comparada ao Grupo peso adequado controle.	55
Figura 16 - Heatmap das 755 CpGs diferencialmente metiladas entre as culturas de células do Grupo peso adequado controle e tratamento.	56
Figura 17 - Caracterização dos sítios CpG diferentemente metilados entre pacientes com LES e Peso adequado controle e LES Peso adequado tratamento.	57
Figura 18 - Análise de enriquecimento das CpGs hipometiladas no Grupo peso adequado controle quando comparada ao Grupo peso adequado tratamento.	57
Figura 19 - Análise de enriquecimento das CpGs hipermetiladas no Grupo peso adequado controle quando comparada ao Grupo peso adequado tratamento.	58

Figura 20 - Heatmap das 92 CpGs diferencialmente metiladas entre as culturas de células do Grupo obesidade controle e tratamento.	59
Figura 21 - Caracterização dos sítios CpG diferentemente metilados entre pacientes com LES e obesidade controle e LES e obesidade tratamento.....	60
Figura 22 - Análise de enriquecimento das CpGs hipometiladas no Grupo obesidade controle quando comparada ao Grupo obesidade tratamento.....	60
Figura 23 - Análise de enriquecimento das CpGs hipermetiladas no Grupo obesidade controle quando comparada ao Grupo obesidade tratamento.....	61
Figura 24 - Heatmap das 2699 CpGs diferencialmente metiladas entre as culturas de células do Grupo peso adequado tratamento e obesidade tratamento.	62
Figura 25 - Caracterização dos sítios CpG diferentemente metilados entre pacientes com LES e peso adequado tratamento e LES e obesidade tratamento.	63
Figura 26 - Análise de enriquecimento das CpGs hipometiladas na cultura obesidade tratamento quando comparada à cultura peso adequado tratamento.	63
Figura 27 - Análise de enriquecimento das CpGs hipermetiladas na cultura obesidade tratamento quando comparada à cultura peso adequado tratamento.	64
Figura 28 – Intersecção das CpGDMS entre as culturas peso adequado controle X peso adequado tratamento e obesidade controle X obesidade tratamento.....	65
Figura 29 - Intersecção (CpGDMS) entre as culturas peso adequado controle X obesidade controle e peso adequado tratamento X obesidade tratamento.	67
Figura 30 - Análise de enriquecimento das CpGs em intersecção entre a comparação das culturas peso adequado controle X obesidade controle e peso adequado tratamento X obesidade tratamento.	68
Figura 31 - Expressão de genes alvos em cultura celular de adipócitos dos grupos LES e peso adequado e LES e obesidade.	69

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação de peso e IMC e risco de complicações.....	24
Quadro 2 - Substâncias secretadas pelo tecido adiposo	27
Quadro 3 - Reagentes para preparo do meio de digestão.....	43
Quadro 4 - Reagentes para preparo do meio de cultura.	44
Quadro 5 - Fórmula para obtenção da concentração celular de adipócitos em células/mL. ...	44
Quadro 6 - Rendimento e concentração dos adipócitos.	45
Quadro 7 – Genes alvos e respectivas sondas utilizadas nos experimentos.....	50
Quadro 8 - Comparações de ilhas CpGs relevantes e expressão gênica entre os grupos do estudo.....	51
Quadro 9 - Resumo dos resultados obtidos de metilação do DNA e expressão gênica de cada comparação realizada no presente estudo.....	84

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5metil THF	5metil tetrahydrofolato
510metil THF	510metil tetrahydrofolato
5HTT	Transportador de serotonina
ACAT1	Acetil-CoA acetiltransferase 1
ACTB	Actina beta
ADIPOQ	Gene que codifica a adiponectina
ALCAM	Molécula de adesão de células leucocitárias ativadas
AMP	Adenosina monofosfato
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
Anti RNP	Anticorpo antiribonucleoproteína
Anti-RO/SSa	Anticorpo anti RO
ApoE	Apolipoproteína E
ATP	Adenosina trifosfato
B12	Vitamina B12
B2	Vitamina B2
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico
cDNA	DNA complementar
CETP	Proteína de transferência de colesterol esterificado
CH3	Grupo metil
COMP	Proteína oligomérica da matriz da cartilagem
CpGDMs	CpG diferencialmente metiladas
CREM	Modificador do elemento responsivo ao cAMP
Ct	Ciclo limiar
DHF	Dihidrofolato
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNMT1	DNA metiltransferase 1
DNMTs	DNA metiltransferases
EIF4E	Fator de iniciação da tradução eucariótico 4E
EWAS	Epigenome Wide Association Studies

FAN	Fator anti-núcleo
FOXp3	Fator de transcrição forkhead 3
GAPDH	Gliceraldeído3fosfato desidrogenase
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
HbA1c	Hemoglobina glicada
HEPES	Ácido 4(2hydroxyethyl)1piperazineethanesulfonic
HIF3A	Fator induzível por hipóxia 3 alfa
IFN-alfa	Interferon alfa
IFN- γ	Interferon gama
IgA	Imunoglobulina A
IGF1	Fator de crescimento semelhante à insulina 1
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL – 10	Interleucina 10
IL – 2	Interleucina 2
IL – 6	Interleucina 6
IL 17	Interleucina 17
IL-1beta	Interleucina 1 beta
IMC	Índice de massa corporal
KLF5	Fator de transcrição KLF5
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LEP	Gene que codifica a leptina
LKB1	Quinase de linhagem de fígado B1
LPL	Lipase lipoproteica
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MBP	Proteína básica da mielina
MC	Meio de cultura
MCP1	Proteína quimioatrativa de macrófagos 1
MEK/ERK	Mapa/extracellular signal regulated kinase
MMPS	Metaloproteinases da matriz
mRNA	RNA mensageiro
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NcRNAs	RNAs não codificantes

NOTCH	Sinalização Notch
NZB/W	New Zealand Black/White (camundongos)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAI1	Inibidor do ativador do plasminogênio 1
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PP2Ac	Subunidade catalítica da proteína fosfatase 2A
q.s.p.	Quantidade suficiente para
qPCR	PCR quantitativo em tempo real
RNA	Ácido ribonucleico
SAH	S-adenosil-homocisteína
SAM	S-adenosil-metionina
SKEDAI	Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index
SLE	Lúpus eritematoso sistêmico
SLICC	Systemic Lupus Erythematosus International Collaborating Clinics
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
Stat1KO	Knockout de STAT1
STAT3	Proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição 3
TAB	Tecido adiposo branco
TAF4	Fator associado à proteína de ligação à caixa TATA 4
TAS	Tecido adiposo subcutâneo
TGF-beta	Fator de crescimento transformador beta
Th17	Células T helper 17
TIMP1	Inibidor de metaloproteinase de matriz 1
TNF-alfa	Fator de necrose tumoral alfa
Treg	Células T reguladoras
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VIGITEL	Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico
ZFP	Proteína de "dedo de zinco"

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1 Lúpus eritematoso sistêmico.....	20
2.2 Mecanismos associados a inflamação no LES.....	22
2.3 Obesidade.....	23
2.4 Tecido adiposo como órgão secretor e sua interação com a inflamação na obesidade...25	
2.5 Mecanismos Epigenéticos: Metilação do DNA.....	29
2.6 Metilação do DNA no LES e na obesidade: evidências recentes	31
2.7 O papel dos nutrientes doadores de metil nas reações de metilação do DNA.....	35
3. OBJETIVOS.....	39
3.1 Objetivo primário	39
3.2 Objetivos secundários	39
4. MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1 Desenho experimental.....	41
4.2 Isolamento de adipócitos, contagem e semeadura	42
4.3 Cultura celular e suplementação	45
4.4 Extração de ácidos nucleicos	46
4.5 Análise dos níveis de metilação do DNA	47
4.5.1 Tratamento com bissulfito de sódio	47
4.5.2 Ensaio de microarray	47
4.5.3 Análise da bioinformática	48
4.5.4 Análise de enriquecimento das vias metabólicas.....	49
4.5.6 Intersecções entre as CpGDMs - Diagramas de Venn	49
4.6 Análise de expressão gênica	50
4.6.1 Transcrição Reversa.....	50
4.6.2 PCR quantitativo em tempo real (qPCR).....	50
4.7 Análises comparativas.....	51
5. RESULTADOS.....	53
5.1 Metilação do DNA.....	53
5.1.1 Peso adequado controle X Obesidade controle.....	53
5.1.2 Peso adequado controle X Peso adequado tratamento.....	55
5.1.3 Obesidade controle X Obesidade tratamento.....	58
5.1.4 Peso adequado tratamento X Obesidade tratamento.....	61

5.1.5 Intersecção das CpGDMs entre a comparação das culturas peso adequado controle X peso adequado tratamento e obesidade controle X obesidade tratamento.....	64
5.1.6 Intersecção das CpGDMs entre a comparação das culturas peso adequado controle X obesidade controle e peso adequado tratamento X obesidade tratamento.....	67
5.2 Expressão gênica.....	68
6. DISCUSSÃO.....	71
7. CONCLUSÃO.....	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

Introdução

1. INTRODUÇÃO

O LES é uma doença crônica de caráter autoimune que afeta de forma severa a qualidade de vida dos indivíduos que acomete ¹. É uma doença de etiologia multifatorial, com manifestações heterogêneas podendo acometer diversos órgãos e sistemas ² O tratamento do LES pode exigir o uso de glicocorticoides, imunossuppressores, hidroxicloroquina e acompanhamento constante ao longo de toda a vida do paciente ¹. Considerando as modificações epigenéticas, fatores ambientais como dieta, hormônios e certos medicamentos podem regular a expressão de genes relacionados às células do sistema imunológico, promovendo a diferenciação de células imunes, e aumentando a expressão de autoanticorpos e citocinas pró-inflamatórias ³. Ressalta-se que a literatura vem demonstrando que indivíduos acometidos pelo LES possuem um padrão generalizado de hipometilação do DNA, principalmente de genes relacionados à imunidade e auto tolerância ⁴⁻⁸.

O corpo humano como um todo é o resultado da interação entre os genes herdados e o meio ambiente ao qual o indivíduo está inserido ⁹. Tal interação participa ativamente dos mecanismos de regulação gênica tanto de processos fisiológicos como de diversas doenças, estando entre estas, as desregulações autoimunes ¹⁰. Há diversos fatores envolvidos na etiopatogênese das doenças autoimunes e, atualmente, a epigenética está entre um dos mais evidenciados, sendo o padrão de metilação do DNA o mais recentemente estudado ^{3,4}. A epigenética refere-se a todas as modificações hereditárias na atividade gênica que não implicam mudanças na sequência primária de nucleotídeos ¹¹. Modificações epigenéticas influenciam os padrões de expressão gênica e incluem metilação do DNA, modificações das histonas e regulação gênica por RNAs não codificantes ¹², e têm sido associadas à patogênese do lúpus eritematoso sistêmico (LES) ⁴.

O processo de metilação do DNA consiste na adição de um agrupamento metil (CH₃) às bases citosinas e está relacionado ao ciclo de um carbono, da metionina e da homocisteína ¹³. Para que ocorra, é necessário que nutrientes doadores de grupo metil estejam disponíveis no organismo ¹⁴. O folato ou ácido fólico, uma vitamina do complexo B, é um dos mais conhecidos nutrientes doadores de grupo metil, sendo capaz de alterar o padrão de metilação do DNA ¹⁴. Um estudo *in vivo* demonstrou que animais alimentados com dietas deficientes em nutrientes doadores de metil apresentavam hipometilação do DNA tanto de forma global como em genes específicos ¹³. Recente revisão sistemática a respeito do efeito de nutrientes doadores do grupo metil nos níveis de metilação do DNA analisou estudos *in vitro*, em modelos animais e em humanos e evidenciou, apesar de uma grande heterogeneidade entre os estudos em relação a

tipos de amostra, concentração dos nutrientes e tempo de tratamento, alterações nos níveis de metilação do DNA após a suplementação desses micronutrientes ¹⁵. Ainda, o ácido fólico aparenta ter funções imunomoduladoras ¹⁶. Ganeva e Tchobanov (2023) observaram que uma dieta rica em ácido fólico aumentou os níveis de metilação do DNA, especialmente em linfócitos B de camundongos com autoimunidade, mostrando que esses nutrientes podem exercer um papel imunomodulador, com possível potencial terapêutico ¹⁶.

Considerando que o LES é uma doença cujo principal mecanismo fisiopatológico é a inflamação sistêmica, sabe-se que outras condições relacionadas à inflamação, mesmo de baixo grau, podem exacerbar as manifestações clínicas, piorando o prognóstico, tornando assim a qualidade de vida do paciente ainda mais limitada ^{1,17}. Nesse cenário, evidências sugerem uma relação negativa entre obesidade e LES, bem como uma crescente prevalência de obesidade entre pacientes diagnosticados com a doença ¹⁸⁻²⁰. Alguns autores relataram que a obesidade pode agravar as manifestações do LES uma vez que a hipertrofia e hiperplasia do tecido adiposo está relacionada com aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias e desregulação do equilíbrio dos linfócitos T reguladores (Treg) e linfócitos auxiliares ^{17,18,21}.

Considerando o cenário acima descrito, o presente estudo visa testar a hipótese de que existe um perfil de metilação do DNA distinto entre as culturas de adipócitos provenientes do tecido adiposo de paciente com LES e peso adequado ou LES e obesidade e que o tratamento com ácido fólico é capaz de modular o perfil de metilação do DNA em ambas as culturas celulares.

Revisão Bibliográfica

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Lúpus eritematoso sistêmico

O LES é uma doença reumática autoimune, de etiologia multifatorial ainda não completamente estabelecida que possui como maior característica a inflamação crônica e uma grande heterogeneidade em sua apresentação clínica^{22,23}. Acomete em sua maioria mulheres em idade reprodutiva, em uma proporção de 9 mulheres para cada homem². No Brasil, dados recentes mostraram uma incidência do LES de aproximadamente 4,8 a 8,7 casos por 100.000 habitantes ao ano²⁴, sendo a estimativa de que existam cerca de 65 mil pessoas com a doença atualmente (SOCIEDADE BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA, 2022). Em relação as estimativas mundiais, a incidência global do LES e da população recém-diagnosticada é de 5,14 (1,4 a 15,13) por 100.000 pessoas ao ano e 0,4 milhão de pessoas anualmente, respectivamente²⁶. Ainda, dados recentes mostraram que a mortalidade dos pacientes com LES é cerca de 3 a 5 vezes maior que a da população não acometida pela doença, sendo esta característica relacionada à atividade inflamatória da mesma, estando os acometimentos renal, do sistema nervoso central e doenças cardiovasculares como os mais relevantes²². No Brasil, no período de 2012 a 2022 foram registrados 15.105.550 casos de óbito por LES, estando a região Sudeste com o maior número de casos (6.880.170) e a região Norte com o menor (954.826)²⁷.

Apesar de etiologia ainda não completamente estabelecida, sabe-se que fatores genéticos, epigenéticos, hormonais e ambientais estão relacionados com o desenvolvimento do LES^{28,29}. A literatura mostra que, além da predisposição genética, mecanismos epigenéticos têm se mostrado extremamente importantes no desenvolvimento da doença, uma vez que agentes externos (e.g. luz ultravioleta, infecções virais, poluentes ambientais, hormônios e dieta) são capazes de modular a expressão gênica, podendo culminar em uma desregulação autoimune^{3,30}.

Por se tratar de uma condição relativa à perda de auto tolerância e ao desenvolvimento de autoimunidade, o LES é uma doença que pode apresentar-se em intervalos de remissão total ou parcial com duração destes intervalos variável²⁴. Quando ativa (em período de exacerbação), a doença pode afetar qualquer órgão, sistema, e/ou articulação em variadas combinações², de modo a promover uma inflamação grave, uma vez que os autoanticorpos formam imuno complexos que depositam-se em vasos de pequeno calibre iniciando vasculite e disfunção dos locais acometidos³¹.

De natureza heterogênea e difusa, dentre as principais manifestações clínicas do LES destacam-se a fadiga, febre, mialgia, perda de peso, artrite, artralgia, anemia, acometimentos renais, neuropsiquiátricos, pulmonares, cardíacos e gastrointestinais ^{24,29}. Entre os distúrbios observados no sistema imune, ressaltam-se o aumento da expressão de interferon alfa (IFN- α), redução do número e função das células T citotóxicas e supressoras, aumento dos linfócitos T CD4+ auxiliares, bem como ativação policlonal de células B autorreativas. A junção desses eventos resulta em uma cascata de anormalidades na sinalização linfocitária e falhas nos mecanismos de auto tolerância e hiper-reatividade, culminando na formação de autoanticorpos, sobretudo de anticorpos anti-DNA ²⁸. Dentre as alterações imunológicas encontram-se mais frequentemente alterações nos marcadores imunológicos como fator anti-núcleo (FAN), anti-DNA nativo, anti-Sm, anticardiolipinas, imunoglobulinas das classes G, M e A (IgG, IgM ou IgA), anticoagulante lúpico, anti-beta2-glicoproteína1 IgG, IgM ou IgA, anti-La/SSB, anti-Ro/SSA e anti-RNP ²².

Os critérios da *American College of Rheumatology* 1982/1997, do *Systemic Lupus Erythematosus International Collaborating Clinics Group* (SLICC) 2012 ou do *European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology* 2019 são aceitos como diretrizes para diagnóstico e tratamento do LES ²². Já o *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index* (SLEDAI-2K) é a ferramenta mais utilizada para avaliar a atividade da doença. O escore SLEDAI é calculado por meio da análise conjunta da anamnese, exame físico e exames laboratoriais, sendo utilizado como determinante de dano acumulado e estando seu aumento associado ao aumento da mortalidade ^{22,32}.

O tratamento dos pacientes acometidos pelo LES tem foco no controle das manifestações clínicas e laboratoriais, na prevenção das recidivas e do dano ao longo da evolução da doença, além da melhora da qualidade de vida ²². O tratamento é multidisciplinar e as medidas podem ser medicamentosas e não medicamentosas, englobando a educação do paciente não só a respeito do esclarecimento dos fatores de risco para a exacerbação (e.g. exposição a luz ultravioleta, infecções, alterações no estado emocional e psicológico), bem como em relação a adesão ao tratamento, comparecimento às consultas e estilo de vida saudável ^{24,28}. O tratamento medicamentoso baseia-se na classificação e atividade da doença (leve, moderada e grave) e, na maioria das vezes, em combinações de fármacos de um espectro variado ²². A terapia medicamentosa preconizada para todos os pacientes com LES é o uso dos antimaláricos, sendo o mais utilizado a hidroxicloroquina. Outro pilar muito importante da terapia medicamentosa para o LES são os corticosteroides ou glicocorticoides, como prednisona e imunossupressores como azatioprina, metotrexato, micofenolato mofetil,

ciclosporina e, em casos mais graves, o uso de imunobiológicos como o belimumabe também pode ser preconizado^{22,24,28,33}.

2.2 Mecanismos associados a inflamação no LES

No que diz respeito à inflamação característica do LES e seus mecanismos patogênicos, por se tratar de uma condição relativa à perda de auto tolerância e ao desenvolvimento de autoimunidade, as falhas do sistema imune que culminam nessa condição podem ser desencadeadas por diversos fatores como a genética, epigenética, fatores endógenos e exógenos, os quais levam ao aumento da secreção de diversas citocinas pró-inflamatórias^{28,31}.

Uma dessas citocinas pró-inflamatórias é o IFN- α , cujo aumento da secreção e circulação está ligado ao desequilíbrio populacional entre linfócitos T CD4⁺ reguladores (Tregs) e linfócitos T CD4⁺ auxiliares foliculares em indivíduos acometidos pelo LES²⁸. O INF- α influencia neste desequilíbrio pois atua na inativação das células Treg³¹. Os linfócitos Tregs são caracterizados tanto pela alta expressão de CD25 (CD25⁺) como pela expressão constitutiva do fator de transcrição *forkhead 3* (FOXP3), possuindo um papel importante na modulação do sistema imunológico e na prevenção de doenças autoimunes ao auxiliarem na manutenção da auto-tolerância^{28,34}. Em pacientes com LES, estudos descrevem uma diminuição no número de células linfocitárias Tregs e um aumento do número e atividade de linfócitos T auxiliares foliculares^{28,34}. Por sua vez, os linfócitos T auxiliares foliculares apresentam como principais funções, a de promover o desenvolvimento e maturação de células B, bem como produção de anticorpos^{35,36}. Este aumento de linfócitos T auxiliares foliculares vem em conjunto com o aumento de linfócitos B autorreativos e autoanticorpos, ocasionando anormalidades em toda a sinalização linfocitária^{35,36}. Este conjunto de falhas no sistema imune culmina na circulação e deposição defeituosa de complexos imunes em tecidos, levando ao quadro inflamatório conhecido com todas as características e consequências já abordadas^{28,37}.

Como consequência desse desequilíbrio entre as populações de linfócitos T e células imunes, não só ocorre o aumento dos linfócitos T auxiliares foliculares, mas também o aumento da secreção de IL-17 (interleucina 17), a qual também apresenta papel importante na inflamação e na patogênese do LES³⁸. A IL-17 é produzida pelas células Th17 (T helper 17) e, por sua vez, estimula as funções dos linfócitos B, promovendo a produção e secreção de outras citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e IL-1 β (interleucina 1 beta). A secreção aumentada dessas citocinas promove, por sua vez, danos teciduais por meio da indução de

metaloproteinases de matriz (MMPs) e peptídeos antimicrobianos, que em conjunto iniciam vários ciclos de retroalimentação positiva que aumentam ainda mais a produção de IL-17, sustentando um ambiente pró-inflamatório e com danos teciduais excessivos ³⁸.

Outro agente importante na cascata de inflamação associada ao LES é a proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição 3 (STAT3). Quando fosforilados, os STATs sofrem uma mudança conformacional para homodímeros ou heterodímero e uma vez ativos, podem então ser translocados ao núcleo celular e atuar como fatores de transcrição. A STAT3 participa da cascata de sinalização da IL-6 (interleucina 6) e possui papel crítico para a diferenciação de células T auxiliares, tendo participação indireta, mas muito relevante para os mecanismos envolvidos na inflamação do LES ³⁹. Nesse sentido, estudos mostraram que a expressão de *STAT3* encontrava-se aumentada em células T CD4+ de pacientes com LES, assim como uma correlação positiva entre o gene *STAT3* e a produção de IL-17 ⁴⁰⁻⁴³.

Em conjunto com o *STAT3*, a expressão e atividade do gene modulador do elemento responsivo ao cAMP (*CREM*) também se encontra alterada em linfócitos T de pacientes com LES, afetando fortemente a regulação transcricional de numerosos genes-alvo em células T, incluindo *IL-2* (interleucina 2) e *IL-17* ⁴⁴. O gene *CREM* codifica uma proteína de mesmo nome, a qual está envolvida em uma longa cascata de sinalização, desenvolvendo papéis importantes no eixo hipotálamo-hipófise e na regulação transcricional da via de sinalização da adenilato ciclase ⁴⁵. Essa proteína pode afetar os linfócitos T envolvidos nos mecanismos patogênicos do LES uma vez que possui múltiplos alvos dentro das células T. A proteína *CREM* pode atuar em uma longa cascata de sinalização que contribui para a regulação positiva de vias intracelulares que podem diminuir a quantidade de IL-2 secretada, citocina que desempenha um papel crucial na ativação e proliferação de células T, e sua diminuição pode contribuir para a anergia das células T e a disfunção do sistema imunológico observadas no LES ⁴⁵. Além disso, foi observado que seu nível de expressão pode estar relacionado à doença uma vez que este encontra-se mais expresso em células T de pacientes com LES ^{37,44,46}.

A combinação destes fatores acima descritos resulta em um perfil de células T pró-inflamatórias, com aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias, contribuindo para a inflamação generalizada e para os mecanismos patofisiológicos da doença ⁴⁴.

2.3 Obesidade

A obesidade é uma doença multifatorial, caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal, acompanhado de inflamação crônica e de baixo grau ⁴⁷. Atualmente é

considerada uma epidemia mundial, sendo um dos maiores problemas de saúde pública, uma vez que se associa a uma importante taxa de morbimortalidade e está em constante crescimento na população ⁴⁸. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a obesidade pode ser classificada com base nos valores do índice de massa corporal (IMC) (Quadro 1) ⁴⁹.

Quadro 1 - Classificação de peso e IMC e risco de complicações.

Classificação	IMC	Risco de complicações
Sobrepeso	25 - 29,9	Levemente aumentado
Obesidade grau 1	30 - 34,9	Moderado
Obesidade grau 2	35 - 39,9	Grave
Obesidade grau 3	≥ 40	Muito grave

IMC: índice de massa corporal. Fonte: Adaptado de OMS, 2000

Estimativas contabilizaram mais de 2 bilhões de adultos no mundo com sobrepeso e obesidade em 2020 ⁵⁰, e o aumento da prevalência da doença ao longo dos anos mostrou-se tão expressivo que os Estados integrantes da OMS introduziram uma meta para interrupção do crescimento da obesidade até 2025 ⁴⁷. As estimativas mundiais contabilizam que até 2035, mais de 4 bilhões de pessoas possuam sobrepeso ou obesidade ⁵¹. No Brasil, dados da pesquisa Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL) de 2023 indicaram que no conjunto das 27 cidades (referentes as capitais dos 26 estados brasileiros e o distrito federal), a frequência de excesso de peso foi de 61,4%, sendo maior entre os homens (63,4%) do que entre as mulheres (59,6%). A frequência de adultos com obesidade foi de 24,3%, sendo semelhante entre as mulheres (24,8%) e os homens (23,8%)⁵². Apesar de sua etiologia multifatorial, a ascensão da obesidade em termos populacionais é um reflexo de mudanças comportamentais, econômicas, de padrões alimentares e de atividade física pelos quais tanto países desenvolvidos como não desenvolvidos passaram na segunda metade do século 20 ⁵³.

O balanço energético positivo decorrente da alta ingestão calórica e baixa prática de atividade física ou sedentarismo é o principal fator para o ganho excessivo de peso ⁵³. Entretanto, a etiologia da obesidade é complexa, e o excesso de peso resulta da interação de fatores como estilo de vida, componentes genéticos e epigenéticos, e fatores emocionais, psicológicos, econômicos e socioculturais ^{47,54}. A obesidade compromete e reduz a qualidade de vida dos indivíduos acometidos, estando relacionada ao surgimento de outras doenças

crônicas como as cardiopulmonares, hipertensão arterial e dislipidemias, diabetes mellitus tipo 2, osteoartrites e alguns tipos de câncer ⁵⁵.

A base para o tratamento clínico da obesidade inclui mudanças no estilo de vida (prática de atividade física e padrão alimentar saudável), podendo ou não contemplar o uso de fármacos ⁵⁰. Uma vez que a obesidade está classificada como uma condição cognitiva comportamental, se faz necessária uma equipe multidisciplinar, com a associação do tratamento clínico ao comportamental, para que o indivíduo mantenha um padrão sustentável de mudanças de hábito a longo prazo e atinja o peso saudável ^{50,55}.

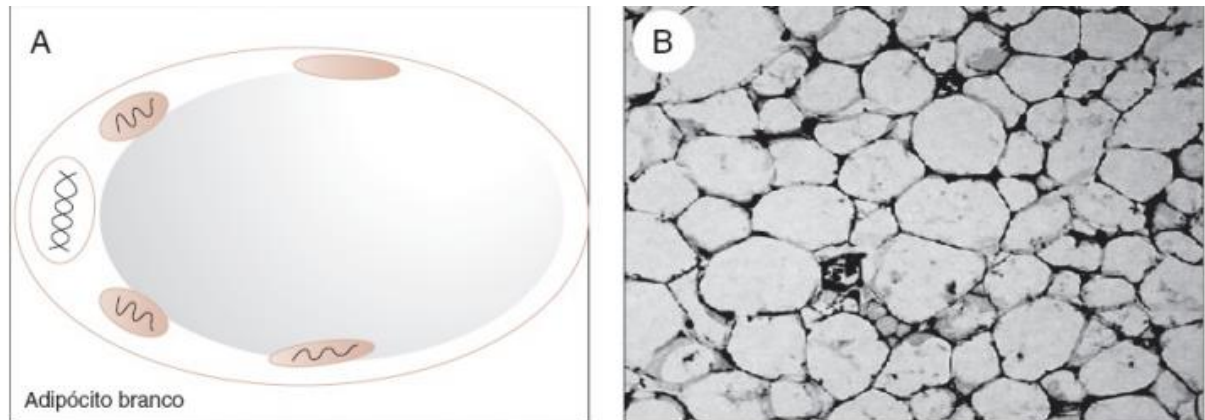
2.4 Tecido adiposo como órgão secretor e sua interação com a inflamação na obesidade

O tecido adiposo é um tipo de tecido conjuntivo que se caracteriza pela sua função e capacidade de armazenamento de energia em forma de triglicerídeos e sua atividade secretora. Além disto, também auxilia no isolamento térmico, delineamento do contorno corporal e na manutenção do posicionamento interno dos órgãos ⁵⁶.

Morfologicamente, há três tipos de tecido adiposo nos mamíferos, sendo eles o branco (TAB), que realiza o armazenamento de energia em forma de triglicerídeos; o marrom, envolvido na manutenção de temperatura e produção de calor, (predominante na espécie humana durante a infância), e o tecido adiposo bege, descrito como produto do processo de escurecimento dos adipócitos brancos causado por estímulos celulares durante o processo de diferenciação na adipogênese, produzindo células mais parecidas com os adipócitos marrons mas, com características predominantes dos adipócitos brancos ⁵⁷. Por questões de especificidade do estudo, neste trabalho nos ateremos ao TAB.

Também denominado unilocular, o TAB é composto em sua maioria por células grandes em formato esférico denominadas adipócitos, que neste tipo de tecido apresentam uma única inclusão de triglicerídeos, com organelas e núcleo localizados periféricamente (Figura 1) ⁵⁸. No TAB, os adipócitos organizam-se em septos de tecido conjuntivo, contendo vasos e nervos não mielinizados, estando sustentados por fibras reticulares de colágeno do tipo III, além da presença de células precursoras (pré adipócitos), fibroblastos, células endoteliais e células imunes com predomínio de macrófagos e células T. ⁵⁹.

Figura 1 - Representação de um adipócito e imagem do tecido adiposo.



A: Representação de um adipócito branco (TAB). B: Imagem do TAB por microscopia, corte histológico corado com hematoxilina e eosina. Fonte: ⁵⁴.

Em adultos, a proporção de TAB em relação ao peso corporal varia de 20 a 28% de acordo com o sexo e idade dos indivíduos ⁵⁷. Ainda, o TAB pode ser dividido em subcutâneo (TAS) e visceral, sendo que fatores como hormônios metabólicos (e.g. insulina, glucagon) e sexuais e influenciam no seu armazenamento e distribuição ⁶⁰.

Atualmente, ao contrário do que se pensava até a década de 1990, o TAB não é mais considerado um depósito de energia inerte ⁶¹. A descoberta da leptina como produto do tecido adiposo ⁵⁷ e o aumento das concentrações de TNF- α em indivíduos com obesidade fez com que a função secretória do tecido adiposo fosse evidenciada, estabelecendo-se assim a ideia de que a obesidade e a resposta inflamatória estão relacionadas ⁶². Nesse cenário, o TAB tem sido definido como parte reguladora importante de diversos processos metabólicos e fisiológicos e como mediador do metabolismo dos ácidos graxos e da inflamação ⁶⁰. Sua função como o maior órgão endócrino do organismo envolve a produção e secreção sistêmica de ácidos graxos e adipocinas ⁶³ que são importantes mediadores nos processos autócrinos e parácrinos como a oxidação de ácidos graxos, lipogênese, gliconeogênese, sinalização de insulina e captação de glicose, e mecanismos de controle da fome/saciedade ⁵⁶. O Quadro 2 mostra as principais substâncias as quais o TAB possui secreção ativa.

Quadro 2 - Substâncias secretadas pelo tecido adiposo

Hormônios	Leptina, resistina, adiponectina, esteroides
Ácidos graxos livres	LPL, ApoE, CETP
Citocinas	TNF- α , IL-6
Proteínas com ação cardiovascular	PAI-1, angiotensinogênio
Fatores de crescimento	IGF-1, TGF- β

LPL: lipase lipoproteica; ApoE: apolipoproteína E; CETP: proteína de transferência de colesterol esterificado; TNF- α : fator de necrose tumoral- α ; IL-6: interleucina 6; PAI-1: inibidor do ativador do plasminogênio-1; IGF-1: fator de crescimento similar a insulina-1; TGF- β : fator transformador do crescimento- β . Fonte: Adaptado de: ⁵⁴.

Dentre as substâncias citadas acima, a mais bem estudada é a leptina, cuja ação é ampla e de extrema importância, podendo atuar em diversos eixos hormonais como eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, hipotálamo-hipófise-adrenal e hipotálamo-hipófise-tireoide ⁶⁴. A leptina é um hormônio peptídico secretado exclusivamente por adipócitos, sendo também classificada como uma adipocina. É codificada pelo gene *LEP* o qual está majoritariamente expresso no TAS. Possui função endócrina, atuando no mecanismo de fome/saciedade, na supressão do apetite e controle da composição e peso corporal ⁶⁵. Ainda, sabe-se que a leptina está envolvida em processos imunes, favorecendo e aumentando a produção de citocinas inflamatórias ⁶⁴.

Também classificada como uma adipocina, a adiponectina é um hormônio peptídico cujo nível de expressão é inversamente proporcional ao nível de adiposidade do indivíduo ⁶⁶. É codificada pelo gene *ADIPOQ* e secretada pelo TAS, tendo sido descoberta quase no mesmo período que a leptina ⁶⁶. O papel da adiponectina também é amplo, atuando em receptores no músculo esquelético, fígado, pâncreas, células endoteliais e no próprio tecido adiposo ⁵⁶. A adiponectina exerce também o papel de hormônio sensibilizador à insulina e inibitório de inflamação vascular, bem como intermediário anti-inflamatório em alguns casos, além de suprimir a produção de glicose no fígado e aumentar a oxidação de ácidos graxos no músculo esquelético ⁶⁷.

No que diz respeito à obesidade, é observada uma disfunção do tecido adiposo tanto em relação a populações celulares quanto em relação ao perfil endócrino e secretório, uma vez que a hipertrofia e a hiperplasia do tecido adiposo, além de induzirem os adipócitos à liberação de mediadores pró-inflamatórios, também alteram a secreção de adipocinas, especificamente adiponectina e leptina, já citadas acima ⁶⁴. Assim, na obesidade é observado níveis de adiponectina significativamente mais baixos em relação a indivíduos com peso adequado ⁶², o que frequentemente culmina em resistência à insulina, uma vez que a adiponectina atua

aumentando a sensibilidade à insulina.⁶⁷ Por outro lado, os níveis de leptina encontram-se aumentados devido a ativação do gene *LEP* pela hipóxia e pelos mediadores inflamatórios presentes no tecido adiposo^{62,68}.

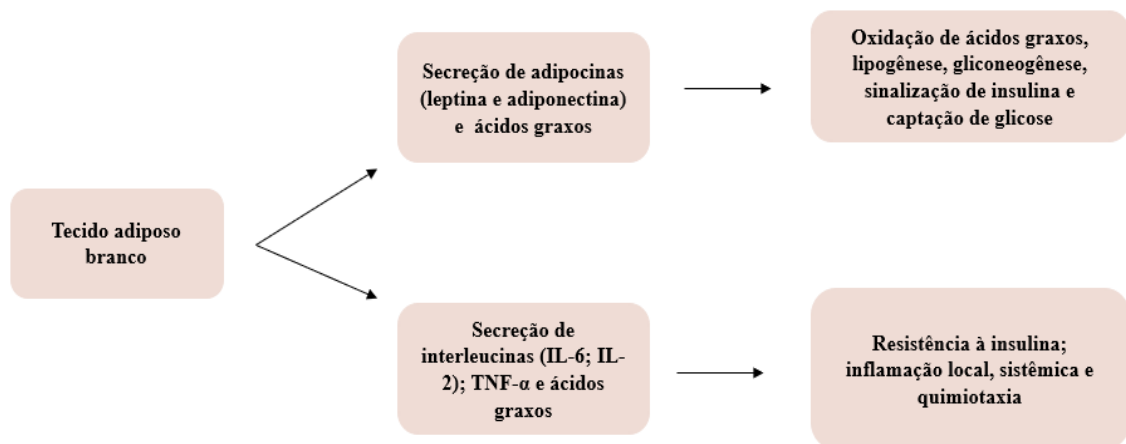
O TNF- α , descoberto em 1975, foi originalmente classificado como uma citocina secretada por macrófagos com função imunológica decorrente da sua capacidade de induzir necrose em células tumorais e ser a principal citocina a participar de processos inflamatórios e imunes⁶⁹. Posteriormente, descobriu-se que a expressão do TNF- α encontrava-se aumentada em indivíduos com obesidade e que a mesma se mostrava reduzida em decorrência da perda de peso corporal, levando a percepção de que essa citocina possuía diversas atividades metabólicas. Ainda que a maior quantidade de TNF- α do tecido adiposo seja proveniente dos macrófagos infiltrados no próprio tecido, observou-se que os adipócitos também produzem e secretam TNF- α , em menores quantidades^{70,71}.

A afirmativa de que a obesidade e a inflamação estão interligadas vêm justamente do fato de que nos indivíduos com obesidade, o perfil de citocinas pró-inflamatórias e proteínas associadas à inflamação encontra-se aumentado⁶². No processo de ganho de peso, ocorre hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos, causando uma diminuição do fluxo sanguíneo e hipóxia celular, com consequente infiltração massiva de macrófagos no tecido adiposo, os quais se agregam em estruturas em forma de coroa ao redor de adipócitos mortos^{72,73}. Esse aumento em volume e em quantidade de adipócitos favorece o aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e a IL-6^{62,74}.

Presente de forma muito relevante nos processos inflamatórios, a IL-6 é codificada pelo gene *IL-6* e cerca de 10 a 30% de seus níveis circulantes é proveniente do TAB⁶⁵. É uma citocina com número elevado de funções que vão desde a regulação do sistema imune entre a transição de imunidade inata e adaptativa, até permeabilidade da barreira hematoencefálica e desenvolvimento embrionário⁶⁵. Presente em quadros inflamatórios, a IL-6 também auxilia no recrutamento de macrófagos e linfócitos para locais de lesão ou infecção e está envolvida na patogênese de diversas doenças autoimunes por conta de seu papel exacerbado na homeostase imunológica⁷⁵. Por possuir efeitos pleotrópicos, em conjunto com outros fatores, a IL-6 induz diferenciação de linfócitos auxiliares, presentes nas doenças autoimunes⁷⁵. Uma das funções mais destacadas e estudadas desta interleucina é a de estimular a produção da proteína C-reativa pelos hepatócitos, a qual desempenha um papel crucial na resposta inflamatória aguda, incluindo o recrutamento e a ativação do sistema complemento, o aumento da atividade do sistema imune e a facilitação da liberação de citocinas⁷⁶.

Este aumento da secreção de adipocinas pró-inflamatórias e diminuição de adipocinas anti-inflamatórias, caracteriza a obesidade como uma inflamação crônica e de baixo grau que causa grande impacto em diversas funções corporais ⁷⁷. Descrito brevemente neste tópico, o papel do tecido adiposo como órgão secretor evidencia uma grande participação no perfil inflamatório da obesidade e na secreção de adipocinas e citocinas. Estas substâncias, além de possuírem papel metabólico intenso, possuem também fatores relacionados ao sistema imune e a inflamação, participando como importantes mediadores nos processos patofisiológicos presentes na obesidade, caracterizando sua condição inflamatória e as altas taxas de mortalidade (Figura 2) ^{56,77,78}.

Figura 2 - Tecido adiposo branco, vias metabólicas e doenças associadas.



TNF- α : fator de necrose tumoral alfa; IL-6: interleucina 6; IL-2: interleucina 2. Fonte: ⁵⁴.

2.5 Mecanismos Epigenéticos: Metilação do DNA

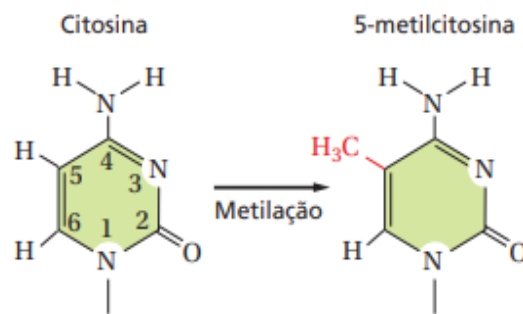
O conceito de epigenética está contido nas modificações moleculares que ocorrem no DNA sem que se altere a sequência de nucleotídeos da fita, ou seja, nas mudanças dos padrões de expressão gênica e nas conformações da cromatina que influenciam diretamente nos fenótipos expressos ⁷⁹. Assim, os eventos epigenéticos relacionam-se às modificações no DNA potencialmente reversíveis, mas herdáveis geneticamente, estabelecendo uma conexão entre a plasticidade fenotípica e o genótipo fixo, desempenhando um papel importante na criação e manutenção da diversidade dos padrões de expressão gênica ⁸⁰.

Os processos epigenéticos são diversos incluindo a modificações de histonas (i.e., metilação e acetilação), metilação do DNA e RNAs não codificantes (ncRNAs). Estes

mecanismos agem de forma distinta, porém com o mesmo objetivo, que é favorecer ou inibir a transcrição e tradução de um determinado gene, de modo que a seleção de qual gene será ou não transcrito e em qual intensidade, se deve a inúmeros fatores como hereditariedade e estilo de vida, por exemplo ^{9,81}. Para fins de relevância e especificidade, nos ateremos para este trabalho, ao processo de regulação epigenética por meio da metilação do DNA.

A metilação do DNA é o processo pelo qual um agrupamento metil (CH₃) é adicionado ao carbono 5 de alguns nucleotídeos de citosina da fita de DNA (Figura 3). Esta reação de incorporação do grupo metil ocorre por um grupo de enzimas denominado DNA metiltransferases (DNMTs) e em sua grande maioria, em locais da fita de DNA denominados ilhas CpG, onde há uma maior concentração dos nucleotídeos citosina e guanina ⁸².

Figura 3 - Representação esquematizada de metilação no carbono 5' da citosina.



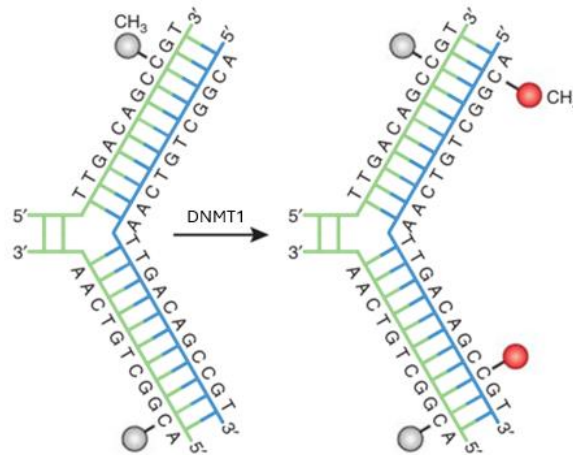
Fonte: ⁸³.

A DNA metiltransferase 1 (DNMT1) é uma enzima codificada pelo gene *DNMT1* e é a principal enzima responsável pela manutenção dos padrões de metilação durante o processo de replicação do DNA, mostrando preferência pelo DNA hemimetilado (quando uma das fitas está metilada e a outra não) ⁸⁴ (Figura 4). Ela é a responsável por restaurar e manter os padrões de metilação, sendo também denominada metiltransferase de manutenção ⁸⁵. Esta remetilação do DNA, além de garantir o padrão epigenético para as células “filhas”, também pode atuar silenciando ou reduzindo a expressão de genes que estavam ativos anteriormente, estando a DNMT1 envolvida no processo de regulação gênica e participando ativamente do mesmo ¹⁰.

Este processo de regulação gênica por meio da metilação do DNA é o mais estudado uma vez que, as ilhas CpG frequentemente estão próximas das regiões regulatórias dos genes, como os promotores ⁸⁶. Estima-se que o genoma possua mais de 28 milhões de ilhas CpGs e destas 60 a 80% encontram-se metiladas ⁸². A hipermetilação das ilhas CpG na região reguladora de um gene em específico leva a uma diminuição ou total interrupção de sua

transcrição e consequente tradução, uma vez que pode impedir a maquinaria de transcrição de agir, assim como a hipometilação resulta em uma maior expressão do gene ⁸⁷.

Figura 4 - Representação esquemática da atuação da enzima DNMT1.

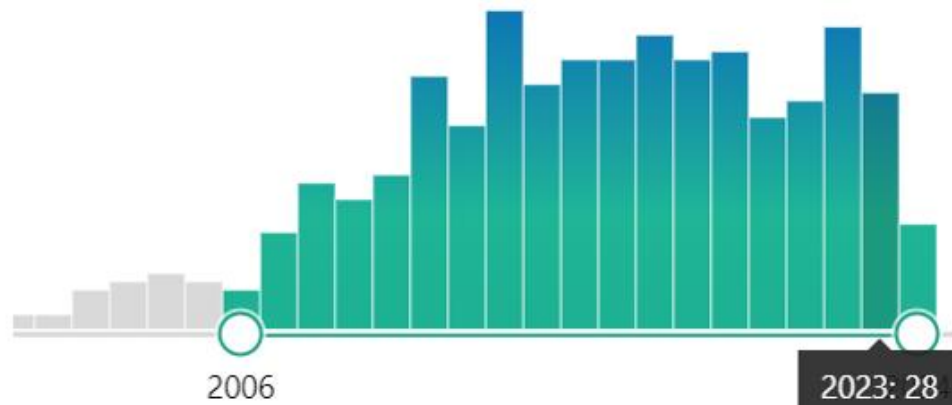


DNMT1: DNA metiltransferase 1. Fonte: Adaptado de: ⁸⁶.

2.6 Metilação do DNA no LES e na obesidade: evidências recentes

Embora as pesquisas a respeito dos aspectos e da influência epigenética em doenças autoimunes tenham se intensificado nos últimos anos, ainda há relativamente pouca informação a respeito do perfil epigenético que apresentam os pacientes com LES se comparado com o número de estudos ou informações sobre outros aspectos relacionados à doença. Uma busca utilizando como descritores “*Systemic lupus erythematosus (AND) DNA methylation*” na base de dados PubMed mostrou que 28 estudos foram publicados nessa temática no ano 2023, e até o presente momento, 12 estudos no ano de 2024 ⁸⁸ (Figura 5).

Figura 5 - Estudos publicados por ano com os descritores (systemic lupus erythematosus (AND) DNA methylation).



Fonte: ⁸⁸.

A literatura acerca da metilação do DNA de pacientes com LES descreve a existência de um padrão de hipometilação do DNA associado a doença, principalmente em genes que participam das vias de sinalização do $\text{INF-}\alpha$ ^{3,89} e das células T ^{5-7,90-92}. Lu et al. (2002) observaram uma hipometilação do DNA no promotor de CD11a/CD18 em células T de pacientes com LES ativo ⁹³. CD11a/CD18, também conhecido como antígeno associado à função do linfócito 1 (LFA-1) ou subunidade alfa L da integrina (ITGAL), é uma integrina que regula a adesão e migração dos leucócitos em tecidos inflamados. A superexpressão de CD11a/CD18 correlaciona-se com o desenvolvimento da autoreatividade das células T ⁵. Ainda, também foi observada hipometilação do DNA no gene *IL-10* (interleucina 10) em pacientes com LES, interleucina essa associada à produção de autoanticorpos pelas células B ⁹¹. A hipometilação do DNA no gene *IL-10* e o recrutamento do *STAT3* ao promotor e intensificador de IL-10 aumentam a expressão de IL-10 em células T ⁶.

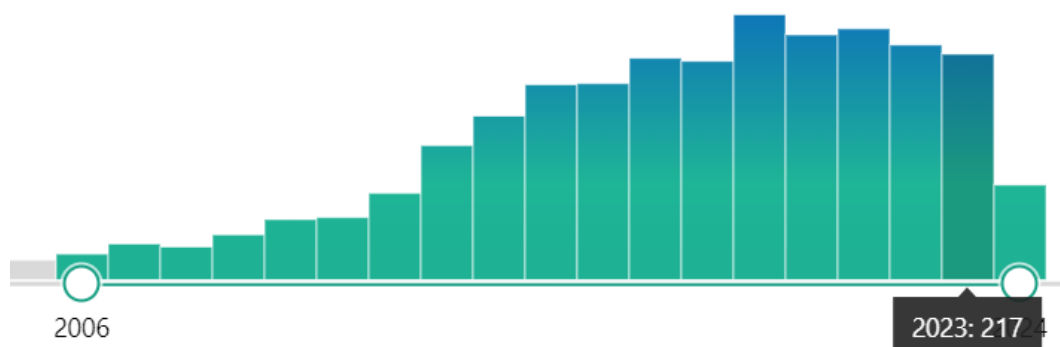
Essa hipometilação do DNA em linfócitos T e B se correlacionou de forma inversamente proporcional com a atividade da doença, e com a super expressão de genes codificadores de citocinas pró-inflamatórias, como as IL-6 e IL-10 ⁷. Além disso, outros autores reportaram que as alterações no perfil metilação do DNA do LES foram associadas aos danos teciduais, subtipos da doença e respostas aos medicamentos ⁸⁹.

Os mecanismos responsáveis pela hipometilação do DNA associada ao LES ainda não foram totalmente elucidados. Uma explicação plausível para esta hipometilação do DNA associada ao LES é a demonstração de que o estresse oxidativo decorrente do estado inflamatório característico da doença diminui a expressão de *DNMT1* ⁹⁴. Um estudo com pacientes com LES ativo, além de demonstrar a hipometilação do DNA, evidenciou que as

células T apresentavam níveis reduzidos de mRNA de *DNMT1*, contribuindo para a hipometilação do DNA nesses pacientes ⁹⁵. Além disso, SUNAHORI et al. (2011, 2013) mostraram que uma parte da proteína fosfatase 2A (PP2Ac), que está em excesso nas células T de pacientes com LES, interfere na atividade da DNMT1 ao afetar a fosforilação das vias de sinalização MEK/ERK nas células T ^{96,97}. Eles examinaram os padrões de metilação de DNA na região promotora de PP2Ac em células T de pacientes com LES, comparando-as com células T normais. Eles descobriram que, nas células T de pacientes com LES ativo, a redução de PP2Ac aumentou a fosforilação na via de sinalização, o que aumentou a expressão e atividade da DNMT1 e, assim, reduziu a expressão de CD70 e CD11a. Concluíram que a PP2Ac pode ser um alvo importante para controlar a metilação de genes em células T de pacientes com LES, atuando por meio da desfosforilação da via de sinalização MEK/ERK e ativação da DNMT1 ^{96,97}.

Ao contrário do que podemos observar no LES, os estudos em relação ao padrão de metilação do DNA na obesidade apresentam-se em maior quantidade. Uma busca utilizando como descritores “*obesity (AND) DNA methylation*” na base de dados PubMed mostrou que 217 estudos foram publicados nessa temática no ano 2023, e até o presente momento, 88 estudos no ano de 2024 (NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE, 2023a) (Figura 6).

Figura 6 - Estudos publicados por ano com os descritores “*obesity (AND) DNA methylation*”.



Fonte: ⁹⁸.

Por se tratar de uma doença com etiologia multifatorial, a variabilidade dos resultados é vasta e indica, em geral, uma hipermetilação do DNA em diversos genes quando comparados indivíduos com obesidade e aqueles com peso adequado ⁹⁹⁻¹⁰¹. Nestes estudos, destacam-se principalmente genes envolvidos no controle do comportamento alimentar, sono, ritmo circadiano, homeostase energética e metabolismo de lipídios ⁹⁹⁻¹⁰¹. De maneira importante, esses padrões generalizados de metilação diferencial do DNA foram associados com o

desenvolvimento das doenças crônicas associadas a obesidade, como o diabetes mellitus tipo 2 e as doenças cardiovasculares^{102,103}.

Desta maneira, diversos “*Epigenome-wide association studies*” (EWAS) vem demonstrando associações entre marcadores da obesidade (e.g. IMC, circunferência abdominal) com padrões de metilação do DNA^{104–107}. Alguns autores reportaram associação entre valores do IMC e os níveis de metilação de sítios CpGs no gene do fator induzível por hipóxia 3 alfa (*HIF3A*) que regula as respostas metabólicas ao baixo nível de oxigênio no organismo^{99–101}, na qual um aumento de 10% nos níveis de metilação do gene *HIF3A* associou-se ao aumento de 8% do IMC^{99,100}. Ainda, os níveis de metilação do DNA dos genes codificadores de leptina e adiponectina foram associados a valores mais altos de IMC, gordura corporal e de concentrações de lipoproteína de baixa densidade (LDL-colesterol)¹⁰⁸.

Se tratando do binômio LES e obesidade, existem poucas evidências na literatura explorando o perfil de metilação do DNA. Hou et al. (2020), com o objetivo de investigar uma possível ligação entre obesidade e a hipometilação das células T CD4+ em pacientes com LES, conduziram um estudo com dois grupos distintos de pacientes: um grupo com LES e obesidade (definida pelo IMC > 30 kg/m²), e outro grupo com LES e peso adequado (IMC entre 18 e 25 kg/m²). A análise comparativa entre esses grupos revelou diferenças significativas nos níveis de atividade da doença, medidos pelo índice SLEDAI, bem como nos marcadores sorológicos como anti-nRNP e anti-dsDNA, todos significativamente mais elevados nos pacientes com LES e obesidade. Além disso, os autores observaram hipometilação do DNA mais acentuada nos pacientes com obesidade em comparação àqueles com peso normal. Essa observação foi acompanhada por uma redução na expressão da enzima DNMT1 nos pacientes com obesidade, sugerindo um possível mecanismo pelo qual a obesidade pode influenciar a epigenética das células T CD4+ em pacientes com LES. Para validar esses achados em um modelo animal, camundongos *New Zealand Black/White* (NZB/W) foram alimentados com uma dieta rica em gordura para induzir obesidade, replicando as condições observadas nos pacientes. Resultados semelhantes foram obtidos, com os animais obesos apresentando níveis reduzidos de metilação das células T CD4+ e baixa expressão de *DNMT1*, comparados aos animais controle alimentados com dieta normal. As descobertas deste estudo apontam para uma associação direta entre obesidade e hipometilação das células T CD4+ em pacientes com LES, indicando que o ambiente obesogênico pode exacerbar os processos epigenéticos alterados observados na doença autoimune²¹.

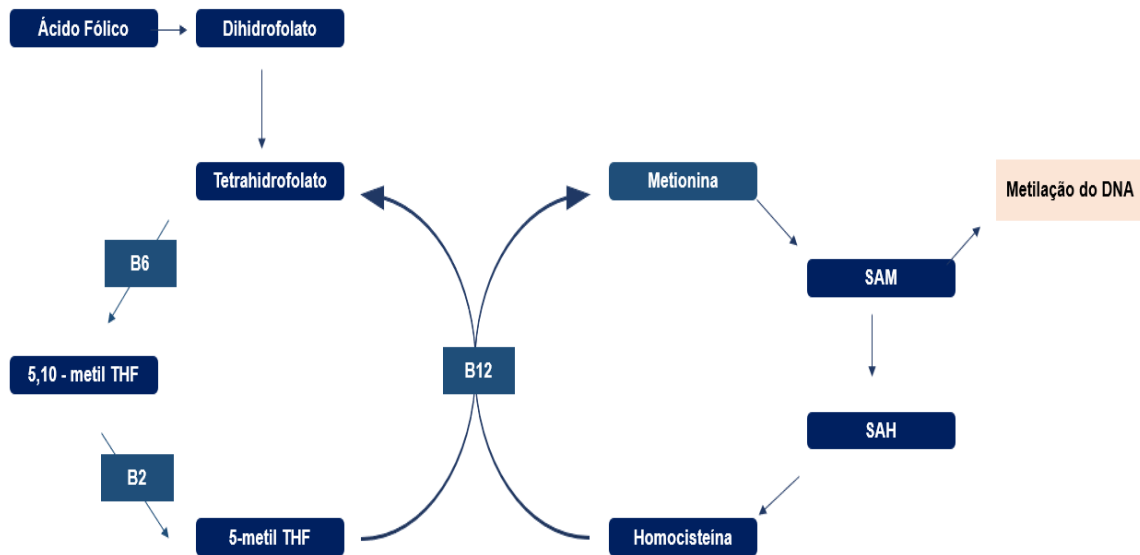
2.7 O papel dos nutrientes doadores de metil nas reações de metilação do DNA

No processo de metilação do DNA, os grupos metil necessários para que a reação ocorra são provenientes de uma molécula doadora universal do grupo metil, a S-adenosilmetionina (SAM), que é parte constitutiva de um ciclo metabólico natural do organismo conhecido como ciclo de 1 carbono ¹⁰⁹.

O ciclo de 1 carbono, ou metabolismo de 1 carbono ocorre compartimentalizado entre o núcleo, citoplasma e mitocôndrias e inclui o ciclo do folato, a via da metionina e vias de transsulfuração ¹¹⁰. Por meio desta rede complexa de reações bioquímicas alimentada com nutrientes denominados de doadores do grupo metil ocorre a transferência de unidades de carbono na forma de grupos metenil, formil e metil, extremamente necessários para diversos processos celulares como a biossíntese molecular, manutenção genômica e controle epigenético da expressão gênica ¹¹⁰. Os elementos doadores de metil são constituintes dietéticos que medeiam o ciclo de 1 carbono e incluem nutrientes como o ácido fólico (vitamina B9) e outras vitaminas do complexo B (B2, B6 e B12), além da metionina, colina e betaina, atuando como substratos ou cofatores essenciais nas vias metabólicas envolvidas ¹¹⁰.

Por meio destes elementos, a SAM é sintetizada dentro da via da metionina em uma reação impulsionada por adenosina trifosfato (ATP) ¹¹¹. A metilação do DNA é uma reação que necessita da participação de SAM para ocorrer como elemento doador final do grupo metil. Estudos demonstraram que deficiências destes nutrientes e menor disponibilidade de SAM podem resultar em alterações que influenciam a atividade das DNMTs e conseqüentemente influenciam os padrões de metilação do DNA ^{112,113}. O folato é uma vitamina a qual o organismo não é capaz de sintetizar, sendo necessária sua ingestão dietética por meio de folhas verdes como aspargos, brócolis, frutas cítricas, e fígado bovino ¹⁴. O ácido fólico é a forma sintética do folato, presente em suplementos e alimentos fortificados ¹⁴. No organismo, o ácido fólico necessita ser reduzido a dihidrofolato (DHF) e posteriormente a tetrahidrofolato, sua forma ativa, a qual entra no ciclo do folato dando origem aos produtos reacionais seguintes, como 5,10-metil tetrahidrofolato, e posteriormente 5-metil tetrahidrofolato, momento o qual o ciclo do folato ou do ácido fólico cruza com o ciclo da metionina, totalizando o ciclo de 1 carbono (Figura 7) ¹¹⁰.

Figura 7 - Representação esquemática do processo de doação de agrupamento metil do ácido fólico as reações de metilação de DNA.



B6: vitamina B6; 5,10-metil THF: 5,10-metil tetrahidrofolato B2: vitamina B2; 5-metil THF: 5-metil tetrahidrofolato; B12: vitamina B12; SAM: S-adenosilmetionina; SAH: S-adenosil-homocisteína.

Fonte: Adaptado de ¹¹¹.

Diversos estudos da literatura vêm relacionando a quantidade ingerida de nutrientes doadores de metil pela dieta, as concentrações séricas e possíveis deficiências desses nutrientes com níveis de metilação do DNA e com características fenotípicas associadas a obesidade ¹¹⁴⁻¹¹⁹. Além disso, há evidências de que a suplementação com ácido fólico pode modular o padrão de metilação do DNA ^{14,111}. Recente revisão sistemática evidenciou que os resultados após a suplementação com ácido fólico foram divergentes entre aumento na metilação global, ausência de mudanças e até mesmo diminuição da metilação do DNA ¹⁵.

Considerando estudos *in vitro*, não há até o presente momento uma grande quantidade de experimentos realizados com adipócitos nesta abordagem. No que diz respeito aos estudos *in vitro* com outras linhagens celulares (e.g. neuroblastoma humano, células endoteliais de veia umbilical humana, mioblastos, células tumorais, entre outras), embora muito escassos na literatura e de cunho muito variado, destacam-se quatro estudos avaliando o efeito do tratamento do ácido fólico na metilação do DNA. As dosagens de ácido fólico administradas (0 a 1000 nmol/L; 26,5 mg/L; 4 mg/L por cultura) e o tempo de tratamento (um a seis dias) divergiram entre si, bem como os resultados obtidos ¹²⁰⁻¹²³. Alguns autores não observaram alterações nos níveis de metilação do DNA após o tratamento com ácido fólico ^{120,121}, enquanto outros observaram aumento dos níveis de metilação do DNA em todo o genoma ¹²² e em genes

específicos como o gene codificador da proteína quimioatrativa de macrófagos 1 (MCP1) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) ¹²³.

De maneira intrigante, em um estudo conduzido também *in vitro* por Nikolova-Ganeva et al. (2023), linfócitos B isolados de sangue periférico de pacientes com LES e voluntários sem a doença foram cultivados na presença de 4 µg/mL ou 16 µg/mL de ácido fólico, foi observado aumento na população de células CD19⁺ IL10⁺ e de células CD19⁻ IL10⁺, o qual pode ser consequência de uma metilação indireta ou direta adicional do DNA em loci específicos das células-alvo ¹²⁴.

Outro estudo mostrou que o tratamento com ácido fólico durante a gravidez afetou os níveis de metilação do DNA fetal ¹²⁵. Amarasekera et al. (2014), utilizando perfilagem em escala genômica, investigaram a metilação do DNA em células T CD4(+) e células apresentadoras de antígenos isoladas do sangue do cordão umbilical neonatal, baseando-se na exposição intrauterina ao folato. Altos níveis de folato materno foram relacionados à hipometilação de uma região próxima ao gene da proteína de “dedo de zinco” ZFP (*ZFP57*), crucial na regulação da metilação do DNA, e a maior expressão desse gene em células CD4(+), indicando que o folato influencia a metilação do DNA, com possíveis impactos inclusive na saúde fetal ¹²⁵.

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo primário

O presente estudo teve como objetivo investigar se o tratamento *in vitro* com ácido fólico por 48 horas é capaz de modular o perfil de metilação do DNA em cultura celular de adipócitos representativos do ambiente LES, e avaliar se esse efeito é diferente a depender da presença de obesidade associada.

3.2 Objetivos secundários

- Comparar os níveis de expressão dos genes *ADIPOQ*, *LEP*, *IL-6*, *STAT3*, *CREM2* e *DNMT1* em cultura celular de adipócitos representativos do ambiente LES, na presença ou ausência de obesidade;
- Avaliar se o tratamento *in vitro* com ácido fólico por 48 horas é capaz de modificar os níveis de expressão dos genes *ADIPOQ*, *LEP*, *IL-6*, *STAT3*, *CREM2* e *DNMT1* em cultura celular de adipócitos representativos do ambiente LES, na presença ou ausência de obesidade.

Materiais e Métodos

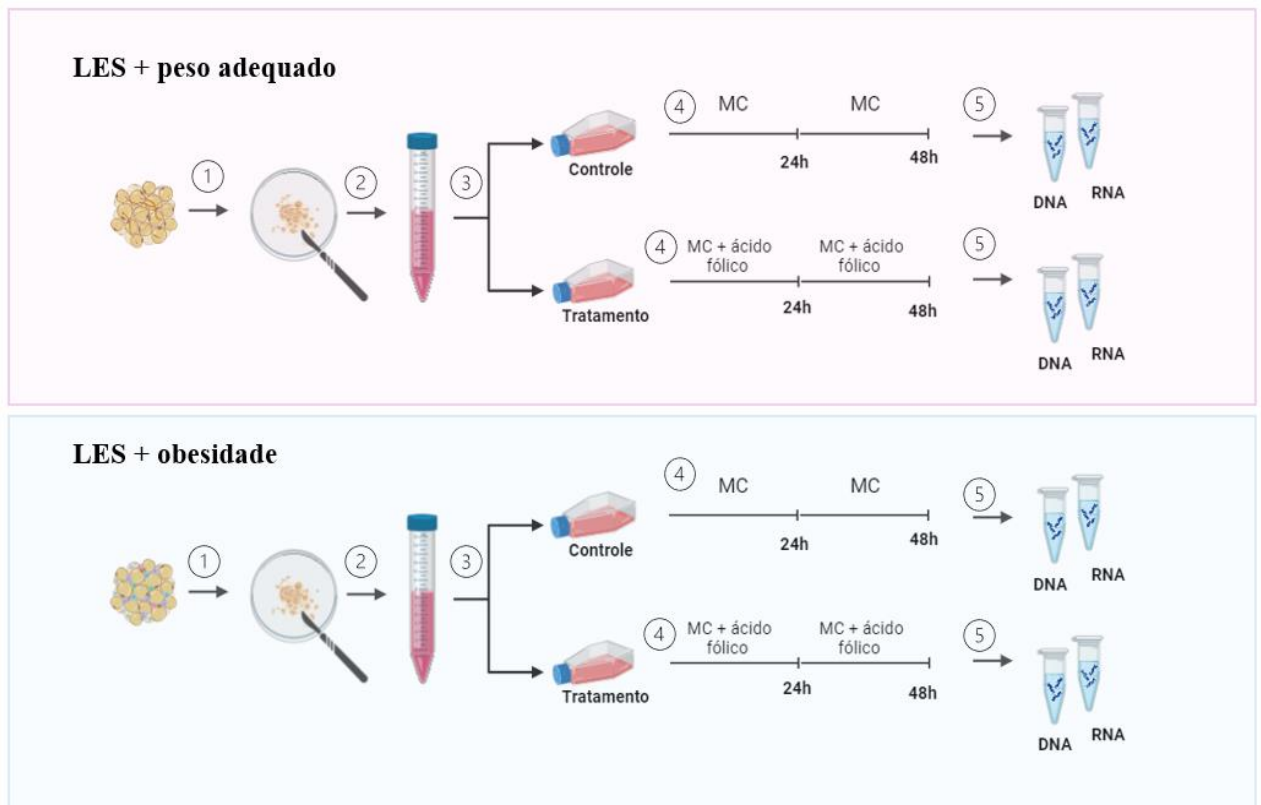
4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Desenho experimental

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”. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) (CAAE.: 47317521.8.0000.0068).

Trata-se de um estudo experimental *in vitro* com adipócitos provenientes de TAS de duas pacientes, uma com LES e peso adequado e uma com LES e obesidade. Os procedimentos experimentais estão descritos na Figura 8. Primeiramente foram realizados procedimentos de biópsias para coleta do TAS da região abdominal. As pacientes selecionadas atendiam a critérios de elegibilidade pré-estabelecidos, sendo semelhantes em relação aos aspectos do LES (tempo de doença, classificação SLEDAI, dose de medicamentos, entre outros), e após leitura e assinatura do termo de consentimento livre esclarecido foi realizada a coleta de aproximadamente 3 gramas de TAS com auxílio de bisturis no Ambulatório de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo (HC-FMUSP). Após a coleta, os respectivos tecidos passaram pelo processo de desagregação da matriz extracelular seguido do isolamento de adipócitos. Os adipócitos isolados do tecido representativo de LES e obesidade foram semeados em duas garrafas de cultura e nomeados como controle e tratamento. O mesmo foi realizado para os adipócitos isolados do tecido representativo de LES e peso adequado. As células foram cultivadas em meio apropriado por 48h e durante esse período as culturas tratamento receberam tratamento com ácido fólico. Após as 48h, foi realizada a extração de DNA e RNA para posterior análise do perfil de metilação do DNA e de expressão gênica.

Figura 8 - Fluxograma representativo dos procedimentos realizados no presente estudo.



1: fragmentação do tecido adiposo; 2: desagregação da matriz extracelular e isolamento de adipócitos; 3: contagem e semeadura de adipócitos em seus respectivos grupos; 4: cultura e suplementação com ácido fólico; 5: extração de ácidos nucleicos. MC: meio de cultura.

Fonte: O autor.

4.2 Isolamento de adipócitos, contagem e semeadura

O isolamento dos adipócitos foi realizado por meio do método de Martin Rodbell descrito em 1964 e adaptado por Peres e Curi em 2005 ¹²⁶, cujo princípio é a desagregação da matriz extracelular do tecido adiposo, liberação dos adipócitos e células estromais e separação por densidade.

Após a coleta, sob condições estéreis, as amostras de TAS foram fracionadas mecanicamente com bisturis lamina 10 e submetidas ao processo de digestão enzimática com colagenase do tipo II na concentração de 1mg/mL (Gibco™ Collagenase Type II – Thermo Fisher Scientific) em solução composta por *dulbecco's modified eagle medium* (DMEM) (com glutamina, piruvato e glicose, sem bicarbonato de sódio (NaHCO₃)), ácido 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic (HEPES), albumina sérica bovina, (NAHCO₃) e água ultrapura, acrescida, após ajuste de pH em 7,4, de penicilina 10.000 UI/mL /estreptomicina 10.000 µg/mL (Gibco™ Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL – Thermo Fischer Scientific) (1%) e utilizada

na proporção de 2,5mL para cada 1g de tecido (Quadro 3). Posteriormente, a solução contendo o TAS fracionado foi incubada em banho maria a 37°C, por aproximadamente 30 minutos com agitações periódicas.

Quadro 3 - Reagentes para preparo do meio de digestão.

Reagente	Quantidade para 50mL	Concentração Final
DMEM	0,1g	1%
HEPES	0,3g	0,6%
Albumina sérica bovina	2g	4%
NaHCO ₃	0,0175g	4,2mM
Água q.s.p.	50ml	-

DMEM: *dulbecco's modified eagle médium*; HEPES: ácido 4-(2-hydroxyethyl) -1-piperazineethanesulfonic; NaHCO₃: bicabornato de sódio; q.s.p.: quantidade suficiente para.

Fonte: Adaptado de ¹²⁶.

Após o período de incubação foi realizada uma centrifugação a 400g por 30 segundos em temperatura ambiente. O infranadante e o sedimento foram aspirados cuidadosamente, preservando o sobrenadante obtido contendo os adipócitos. Foram realizadas então duas lavagens com meio de cultura composto por DMEM (com glutamina, piruvato e glicose, sem NAHCO₃), HEPES, soro fetal bovino, NAHCO₃, albumina sérica bovina e água ultrapura (Quadro 4). Acrescida após ajuste do pH em 7,4 de penicilina 10.000 UI/mL /estreptomicina 10.000 µg/mL (Gibco™ Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL – Thermo Fischer Scientific) (1%).

Quadro 4 - Reagentes para preparo do meio de cultura.

Reagente	Quantidade para 500mL	Concentração Final
DMEM	4,15	0,83%
HEPES	2,4	0,48%
Soro Fetal Bovino	25mL	5%
NaHCO3	0,175g	4,2 mM
Albumina sérica bovina	5g	1%
Água q.s.p.	500mL	-

DMEM: *dulbecco's modified eagle médium*; HEPES: ácido 4-(2-hydroxyethyl) -1-piperazineethanesulfonic; NaHCO3: bicabornato de sódio; q.s.p.: quantidade suficiente para.

Fonte: Adaptado de ¹²⁶.

Ao fim das lavagens, os adipócitos foram ressuspensos em 4mL com o meio de cultura anteriormente citado para posterior contagem e semeadura.

A contagem dos adipócitos foi realizada em câmara de Neubauer, nos quadrantes laterais. Para a avaliação da viabilidade celular foi utilizado o corante Azul de Tripán que identifica, por meio da coloração azul as células inviáveis, devido a impregnação do corante nas membranas celulares desintegradas, ficando as células viáveis sem coloração. Após a contagem dos quadrantes, o número de adipócitos foi submetido à seguinte fórmula para obtenção da concentração celular (Quadro 5) ¹²⁶.

Quadro 5 - Fórmula para obtenção da concentração celular de adipócitos em células/mL.

$$\frac{\text{N}^{\circ} \text{ de células contadas} \times \text{fator de diluição} \times 10^4}{\text{N}^{\circ} \text{ de quadrantes contados}} = \frac{\text{células}}{\text{mL}}$$

Fonte: ¹²⁶.

Foram obtidos no processo de isolamento 1.600.000 adipócitos na concentração de 400.000 adipócitos/mL no grupo LES e obesidade e 613.333 adipócitos na concentração de 153.333 adipócitos/mL no grupo LES e peso adequado (Quadro 6). A quantidade encontrada de adipócitos em cada grupos foi distribuída igualmente em cada garrafa de cultura celular com

volume para 40mL. Cada garrafa foi nomeada de acordo com o grupo (LES e obesidade ou LES e peso adequado) e intervenção (controle ou tratamento com ácido fólico): 1. Peso adequado controle; 2. Peso adequado tratamento; 3. Obesidade controle; 4. Obesidade tratamento (Figura 9).

Quadro 6 - Rendimento e concentração dos adipócitos.

Grupo	Rendimento (valor absoluto)	Concentração (adipócitos/mL)	Por garrafa de cultura (valor absoluto)
LES e obesidade	1.600.000	400.000	800.000
LES e peso adequado	613.333	153.333	306.666

LES: lúpus eritematoso sistêmico.

Fonte: O autor.

Figura 9 - Garrafas de cultura dos grupos: LES e peso adequado: controle e tratamento e grupo LES e obesidade: controle e tratamento.



Fonte: O autor.

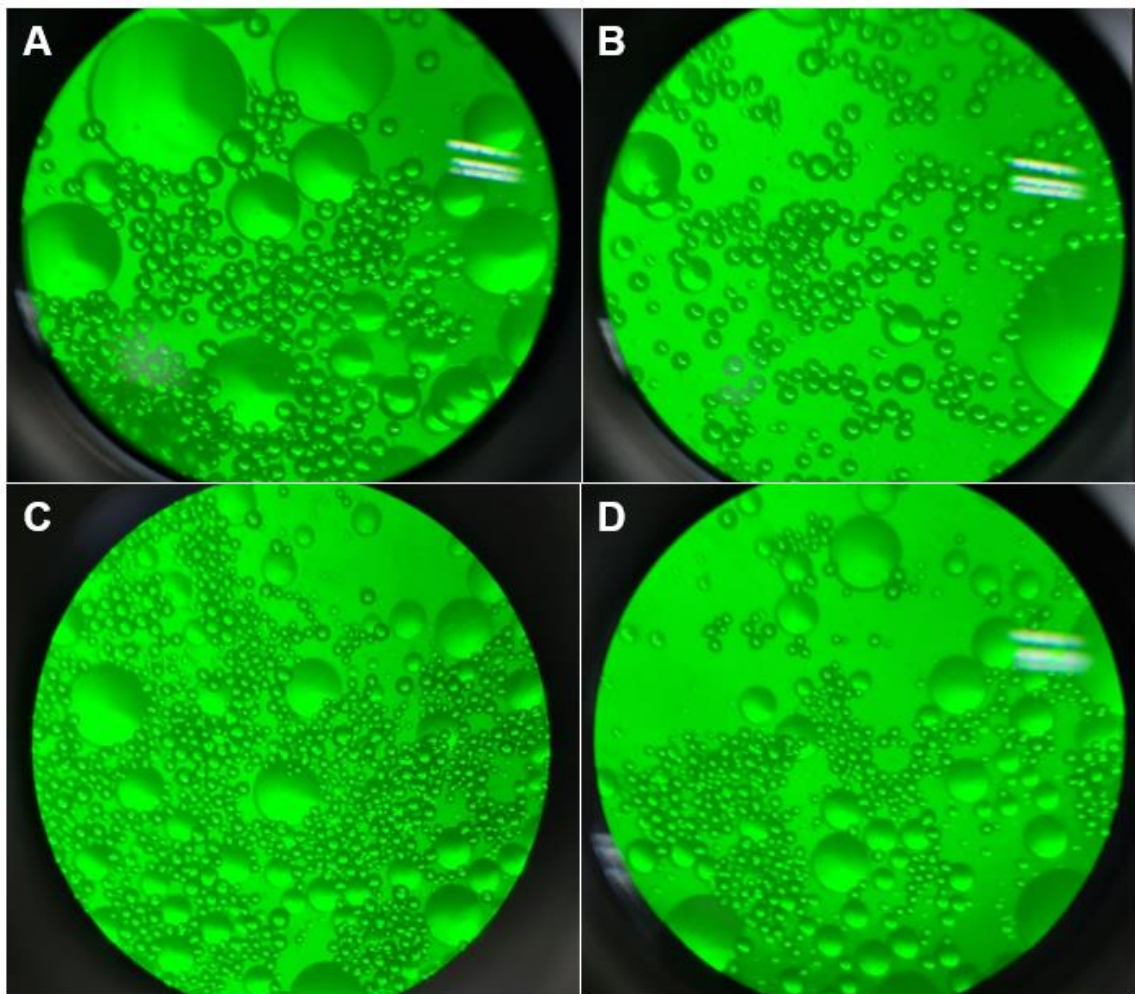
4.3 Cultura celular e suplementação

Após a semeadura, todas as garrafas foram acrescidas de 4mL de meio de cultura e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. As garrafas denominadas tratamento foram

acrescidas, além dos 4mL de meio de cultura, de 1 mL de ácido fólico diluído em NaOH (0,02g NaOH qs) contabilizando 2mg de ácido fólico por garrafa de cultura. O meio de cultura e a suplementação foram repostos a cada 24h durante 48 horas (2mg a cada 24h). As garrafas do grupo controle também tiveram os meios de cultura repostos a cada 24h durante 48 horas.

Durante o período de cultura celular as garrafas foram observadas por microscopia invertida com contraste de fase (Figura 10).

Figura 10 - Culturas celulares de adipócitos.



A: LES e obesidade controle; B: LES e obesidade tratamento; C: LES e peso adequado controle; D: LES e peso adequado tratamento.

Fonte: O autor.

4.4 Extração de ácidos nucleicos

Os ácidos nucleicos foram extraídos após o período de 48h pré-determinado. As extrações de RNA e DNA das culturas celulares foram realizadas com a utilização dos kits

comerciais de extração e purificação RNeasy™Mini Kit e QIAamp™ DNA Mini Kit, respectivamente. O conteúdo de cada garrafa de cultura celular foi homogeneizado por cerca de 30 segundos e transferido para um tubo cônico de 15mL que foi centrifugado a 400g por 30 segundos. Apenas o sobrenadante contendo os adipócitos de cada tubo foi utilizado, tendo sido dividido igualmente para RNA e DNA. As etapas seguintes dos procedimentos foram seguidas de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante.

Após o processo de extração, os ácidos nucleicos foram quantificados por absorvância com a utilização do espectrofotômetro NanoVue™ - Ge Healthcare. As razões 260nm/280nm foram utilizadas para determinar o grau de pureza das amostras.

4.5 Análise dos níveis de metilação do DNA

4.5.1 Tratamento com bissulfito de sódio

As mostras de DNA extraídas foram tratadas com bissulfito de sódio com a utilização do kit de metilação EZ DNA Methylation-Gold (Zymo Research) de acordo com as instruções do fabricante.

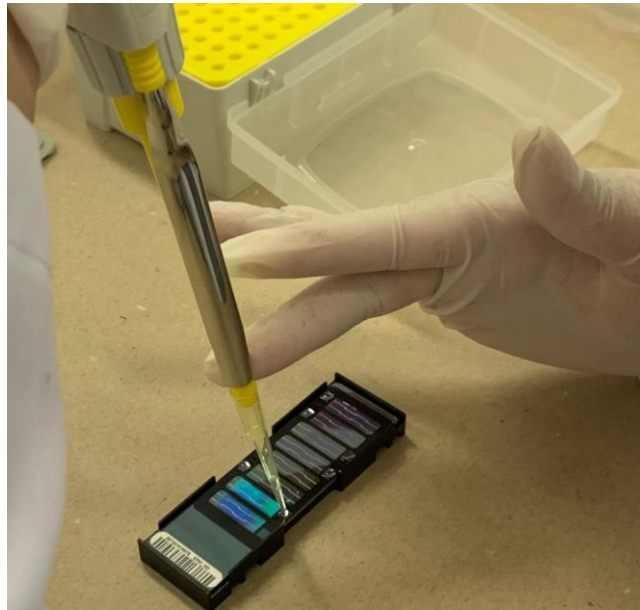
4.5.2 Ensaio de microarray

Para a análise do perfil de metilação do DNA foi utilizada a técnica de microarray com uso do *Beadchip Infinium Methylation EPIC v2.0 Kit* fornecido pela *Illumina™*, de acordo com as instruções do fabricante (*Infinium™ HD Assay Methylation Protocol Guide* (2015)). As amostras de DNA tratadas com bissulfito de sódio (*input* de aproximadamente 100ng) foram submetidas inicialmente a três etapas, sendo elas desnaturação, neutralização e amplificação isotérmica, nas quais o produto amplificado passou por um processo de fragmentação enzimática seguido de precipitação e ressuspensão em solução tampão.

Após esta etapa de preparo, a solução tampão com as amostras já fragmentadas foram depositadas nas lâminas dos chips (*beadchips*) (Figura 11) cuja estrutura contém sondas específicas que ligam-se as amostras por afinidade de sequencias em uma etapa de hibridização. Para esse processo, após pipetadas, as lâminas dos chips foram incubadas a 48°C por 16 horas, seguidas após este período, de lavagem para remoção dos fragmentos não anelados, tendo sido o chip então, preparado para a extensão das bases, amplificação e detecção dos nucleotídeos de citosinas marcados.

A amplificação, correspondeu a amplificação da marcação embutida que forneceu o sinal que foi identificado por um laser, cujo excitou os fluoróforos em cada base, permitindo a identificação de sítios metilados através da conservação das citosinas após o tratamento com bissulfito de sódio. A detecção ocorreu durante o processo de leitura, onde os *beadchips* foram escaneados usando o sistema *Illumina iScanSQ™*.

Figura 11 - *Beadchip Infinium Methylation EPIC v2.0 Kit* (lâmina).



Fonte: O autor.

4.5.3 Análise da bioinformática

O processamento dos dados da matriz de metilação foi realizado em colaboração com um bioinformata especializado, utilizando o ambiente estatístico R 4.1.1 ([//www.r-project.org/](http://www.r-project.org/)). Para controle de qualidade e pré-processamento, utilizou-se o pacote RnBeads (R Core Team, 2021) ¹²⁷.

Inicialmente, um algoritmo de corte foi aplicado para selecionar sondas e/ou amostras. Em seguida, sondas que coincidiam com polimorfismos de nucleotídeo único, localizadas em cromossomos sexuais ou que mapeavam múltiplas posições no genoma (reação cruzada) foram eliminadas. As intensidades brutas da matriz foram normalizadas pelo método BMIQ, que ajusta os valores β das sondas do tipo II para corresponderem à distribuição beta dos valores β das sondas do tipo I. Isso resultou em um valor β específico para cada sítio CpG identificado, representando a razão do sinal fluorescente da sonda metilada (M) em relação à soma das sondas metilada (M) e não metilada (UM) [$\beta = M/(M + UM)$], variando de 0 (sem metilação) a

1 (metilação completa de ambos os alelos). Por fim, modelos lineares hierárquicos foram aplicados utilizando o pacote limma para identificar diferenças entre grupos (RITCHIE et al., 2015). Para os sítios CpG significativos, foi adotado um limiar baseado em $\Delta\beta$, com um valor mínimo de 30% (superior a 0,3 ou inferior a -0,3).

A anotação das ilhas CpG foi categorizada da seguinte forma: (1) shore, referindo-se a cada uma das sequências de 2 kb que flanqueiam uma ilha CpG; (2) shelf, referindo-se a cada uma das sequências de 2 kb adjacentes a um shore (entre 2 e 4 kb de uma ilha CpG); e (3) open sea, para DNA não incluído nas categorias anteriores ou em ilhas CpG. As regiões TSS200 e TSS1500 foram definidas como as áreas de 200 e 1500 pb a montante do local de início da transcrição, respectivamente. A região promotora foi considerada como a que inclui o 5'UTR, a área entre TSS e o códon de início (ATG). A região do corpo do gene foi definida como a que se estende do códon de início ao códon de parada. Por fim, a região 3'UTR foi definida como a área entre o códon de parada e a cauda poli A.

4.5.4 Análise de enriquecimento das vias metabólicas

A fim de obter ainda mais relevância biológica das associações significativas entre a metilação do DNA e as comparações estudadas, foi realizada a análise de enriquecimento de vias metabólicas com o programa modEnrichr (Enrichr H. sapiens & M. musculus, <https://maayanlab.cloud/modEnrichr/>), utilizando a Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto (KEGG).

4.5.6 Intersecções entre as CpGDMs - Diagramas de Venn

Para realizar a análise de intersecções entre diferentes conjuntos de dados, utilizamos a ferramenta online Venny 2.0, disponível em <https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>. Esta ferramenta permite a visualização gráfica das intersecções entre conjuntos distintos, facilitando a identificação de elementos comuns e exclusivos entre eles. Foram realizadas no total duas comparações para obtenção de intersecções. Uma entre as culturas celulares do Grupo peso adequado e do Grupo obesidade, e a segunda por sua vez, entre as culturas peso adequado e obesidade controle e peso adequado e obesidade tratamento.

4.6 Análise de expressão gênica

4.6.1 Transcrição Reversa

O RNA obtido das culturas celulares foi convertido em cDNA (fita complementar de DNA) por meio da reação de transcrição reversa. O processo foi realizado por meio do kit comercial *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit – Applied Biosystems™*, de acordo com as instruções do fabricante. Ao término da reação, as amostras já convertidas em cDNA foram quantificadas novamente por absorbância com a utilização do espectrofotômetro NanoVue™ - Ge Healthcare.

4.6.2 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

Para a análise e mensuração da expressão gênica foram utilizados reagentes fornecidos pela Thermo Fischer Scientific™ como o *Gene Expression Master Mix* e as sondas *TaqMan™* listadas abaixo (Quadro 7). Para as reações de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR) foram realizadas duplicatas partindo de 100ng de cDNA por amostra em um volume final de 10uL por reação. Foi utilizado o equipamento StepOnePlus™ System (Thermo Fischer Scientific™) e 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. Os genes de referência utilizados foram o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*) e o gene da beta actina (*ACTB*).

Quadro 7 – Genes alvos e respectivas sondas utilizadas nos experimentos.

Símbolo	Nome do gene	ID sonda TaqMan
<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

Fonte: O autor.

A análise e os cálculos de expressão gênica foram realizados por meio do método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ descrito por Livak e Schmittgen onde, partindo de um limiar de detecção de fluorescência denominado comumente como *cycle threshold* (Ct) que correlaciona por meio do método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ os níveis de fluorescência obtidos correspondente às moléculas de cDNA com a quantidade de mRNA previamente contidos na amostra ¹²⁸. Após os cálculos, somente alterações de 1,5X na expressão gênica foram consideradas relevantes, tendo sido adotada então esta variação conhecida como ponto de corte para a expressão gênica diferencial (*fold change*) ¹²⁹.

4.7 Análises comparativas

Após o processamento dos dados brutos referentes a ambas as técnicas, tanto à análise da metilação de DNA quanto a análise de expressão gênica foram realizadas as comparações entre os grupos do estudo descritas no Quadro 8.

Quadro 8 - Comparações de ilhas CpGs relevantes e expressão gênica entre os grupos do estudo.

Peso adequado controle X Obesidade controle
Peso adequado controle X Peso adequado tratamento
Obesidade controle X Obesidade tratamento
Peso adequado 48h X Obesidade tratamento

Fonte: O autor.

Resultados

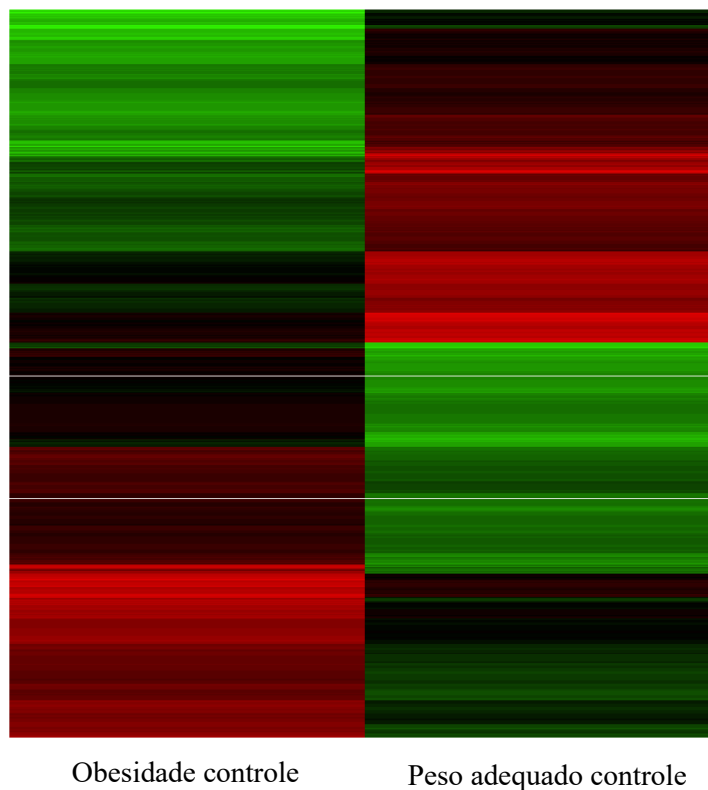
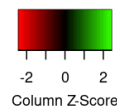
5. RESULTADOS

5.1 Metilação do DNA

5.1.1 Peso adequado controle X Obesidade controle

A comparação do perfil de metilação do DNA entre as culturas de células do Grupo peso adequado controle e Grupo obesidade controle revelou 1.755 CpGs diferencialmente metiladas (CpGDMs), estando estas localizados em 960 genes (Figura 12). Destas, 804 e 951 CpGs estavam hipometiladas e hipermetiladas, respectivamente, nos adipócitos da cultura LES e peso adequado controle.

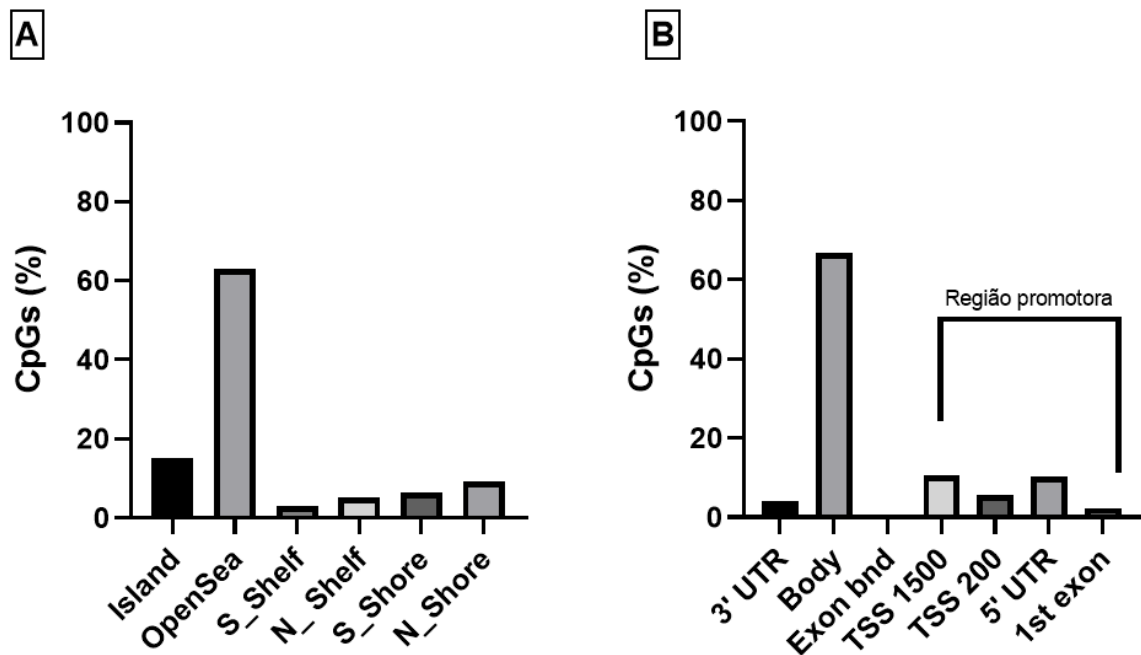
Figura 12 - Heatmap das 1.755 CpGs diferencialmente metiladas entre as culturas de células do Grupo peso adequado controle e Grupo obesidade.



Fonte: O autor.

A maioria dessas CpGDMs (63%) encontrava-se em regiões de *OpenSea* e 15,2% em ilhas CpGs (Figura 13A). Ainda, em relação a posição das CpGs referentes ao gene, 66,7% encontravam-se distribuídas no corpo do gene e 29% na região promotora (Figura 13B).

Figura 13 - Caracterização dos sítios CpGs diferencialmente metilados entre pacientes com LES e peso adequado e LES e obesidade controle.

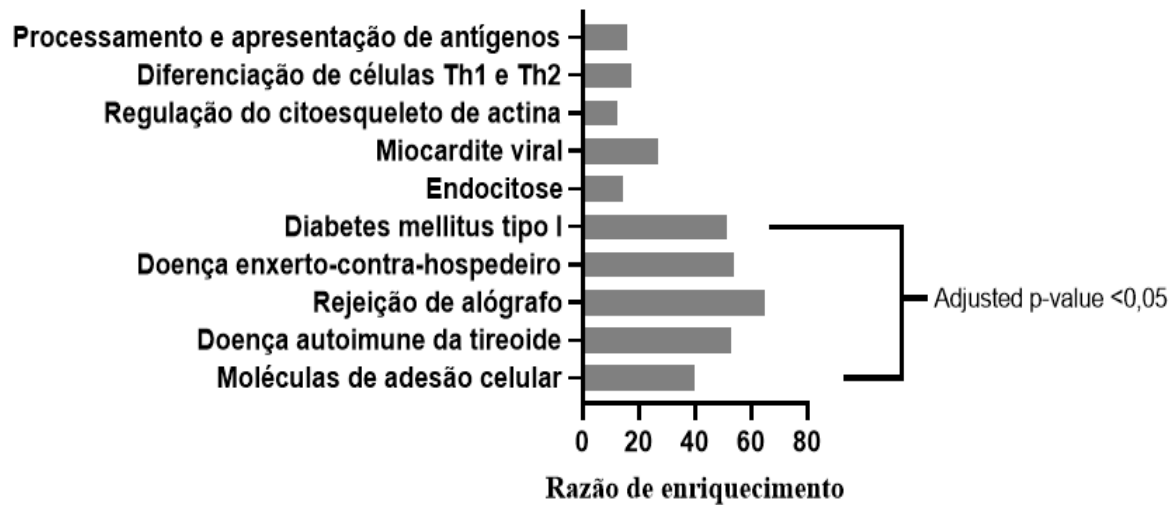


A: distribuição genômica de sítios diferencialmente metilados em relação a ilhas CpG. B: proporções das regiões gênicas dos sítios diferencialmente metilados.

Fonte: O autor.

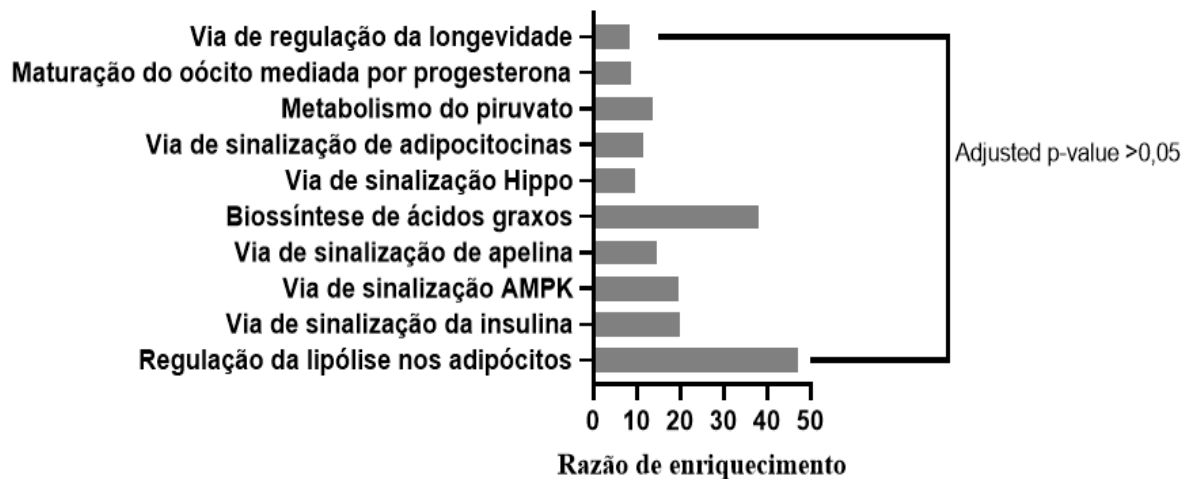
Dentre as CpGDMs hipermetiladas e hipometiladas, respectivamente, 217 e 179 genes foram anotados para as categorias funcionais selecionadas e na lista de referências, sendo assim utilizados para a análise de enriquecimento (Figuras 14 e 15).

Figura 14 - Análise de enriquecimento das CpGs hipometiladas no Grupo obesidade controle quando comparada ao Grupo peso adequado controle.



Fonte: O autor.

Figura 15 - Análise de enriquecimento das CpGs hipermetiladas no Grupo obesidade controle quando comparada ao Grupo peso adequado controle.



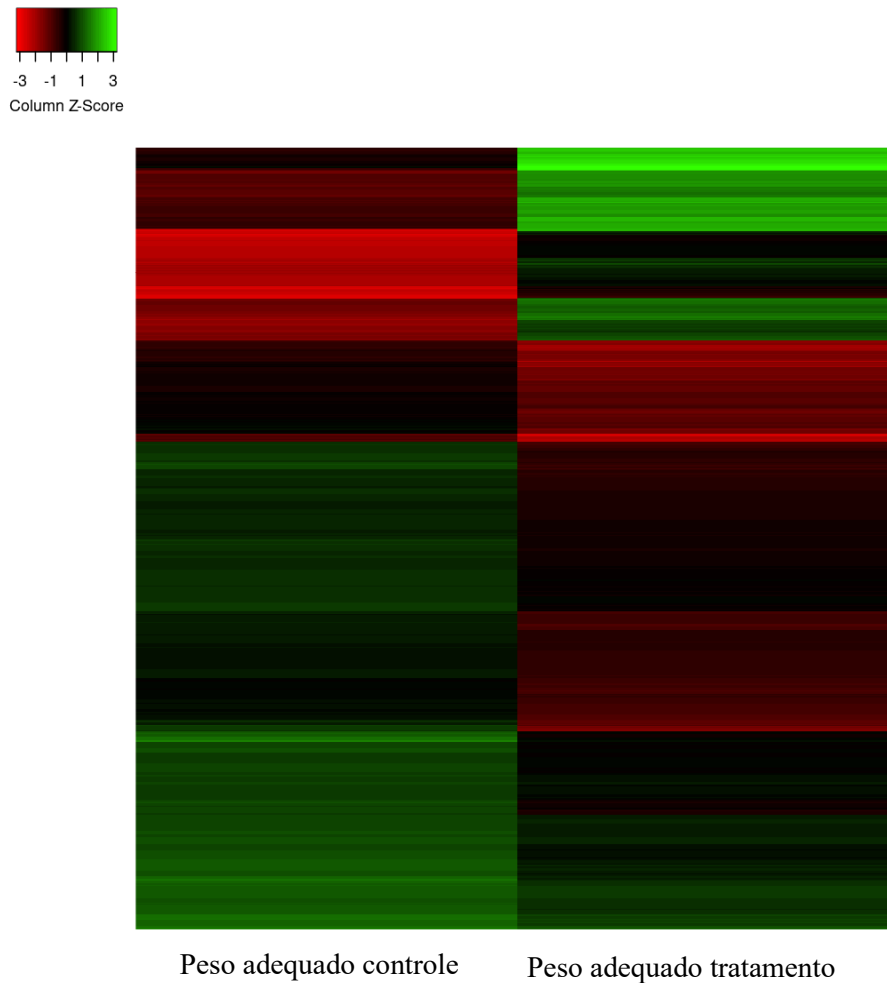
Fonte: O autor.

5.1.2 Peso adequado controle X Peso adequado tratamento

A comparação do perfil de metilação do DNA entre as culturas de células do Grupo peso adequado controle e Grupo peso adequado tratamento revelou 755 CpGDMs, estando estas localizados em 537 genes (Figura 16). Destas, 188 e 567 CpGs estavam hipermetiladas e

hipometiladas, respectivamente, nos adipócitos da cultura LES e peso adequado após o tratamento.

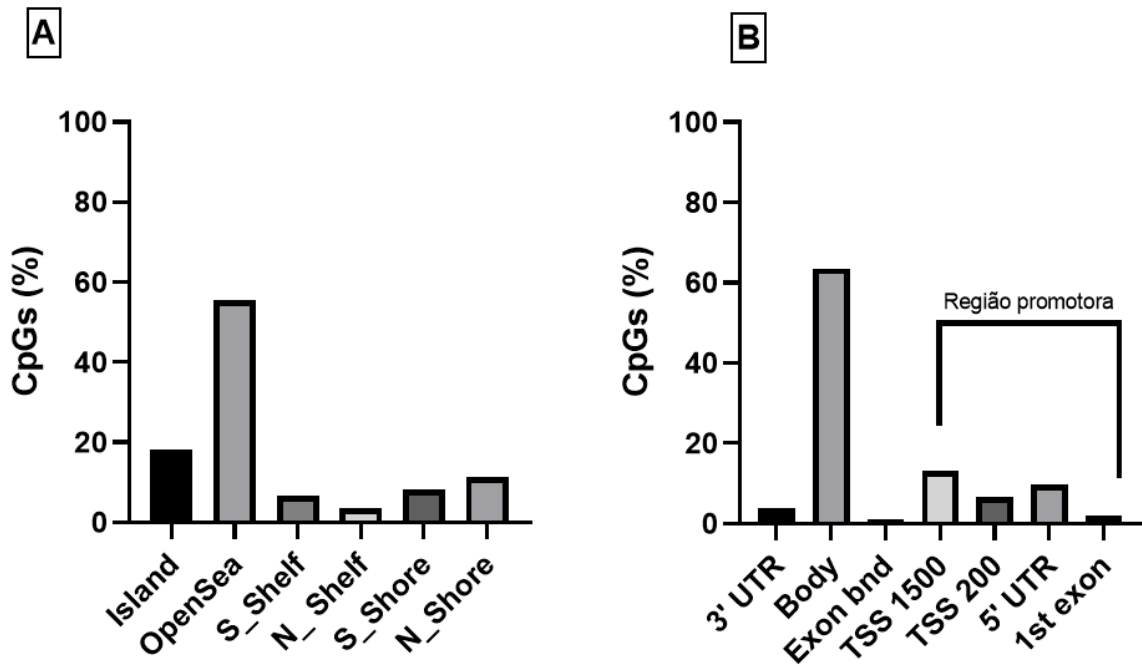
Figura 16 - Heatmap das 755 CpGs diferencialmente metiladas entre as culturas de células do Grupo peso adequado controle e tratamento.



Fonte: O autor.

A maioria dessas CpGDMs (55,4%) encontrava-se em regiões de *OpenSea* e 18,1% em ilhas CpGs (Figura 17A). Ainda, em relação a posição das CpGs referentes ao gene, 63,5% encontravam-se distribuídas no corpo do gene e 31,5% na região promotora (Figura 17B).

Figura 17 - Caracterização dos sítios CpGs diferencialmente metilados entre pacientes com LES e Peso adequado controle e LES Peso adequado tratamento.

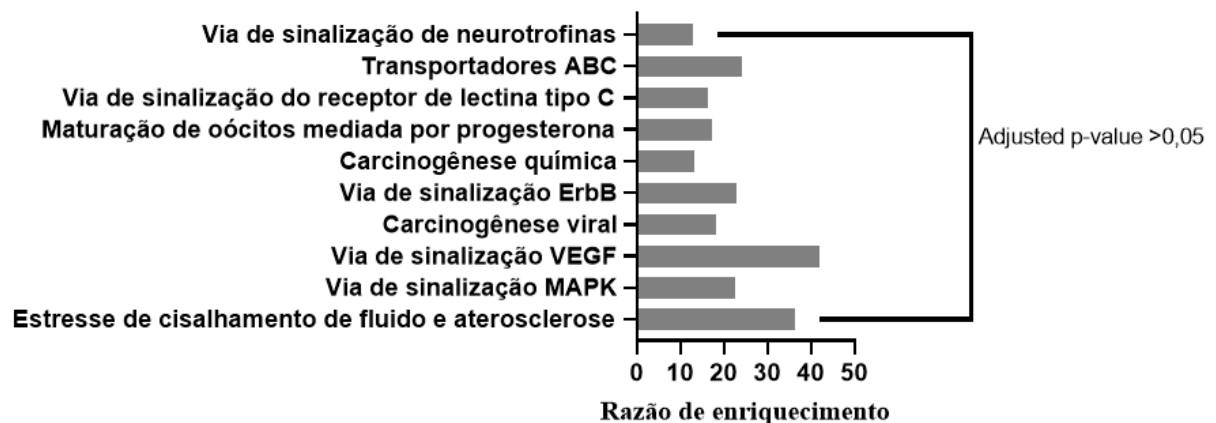


A: distribuição genômica de sítios diferencialmente metilados em relação as ilhas CpGs. B: proporções das regiões gênicas dos sítios diferencialmente metilados.

Fonte: O autor.

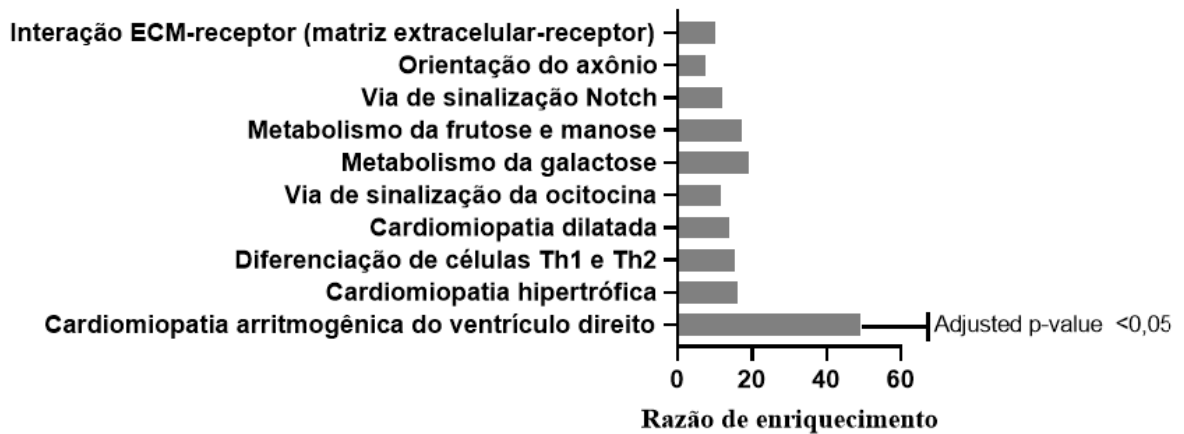
Dentre as CpGDMs hipermetiladas e hipometiladas, respectivamente, 158 e 55 genes foram anotados para as categorias funcionais selecionadas e na lista de referências, sendo assim utilizados para a análise de enriquecimento (Figuras 18 e 19).

Figura 18 - Análise de enriquecimento das CpGs hipometiladas no Grupo peso adequado controle quando comparada ao Grupo peso adequado tratamento.



Fonte: O autor.

Figura 19 - Análise de enriquecimento das CpGs hipermetiladas no Grupo peso adequado controle quando comparada ao Grupo peso adequado tratamento.

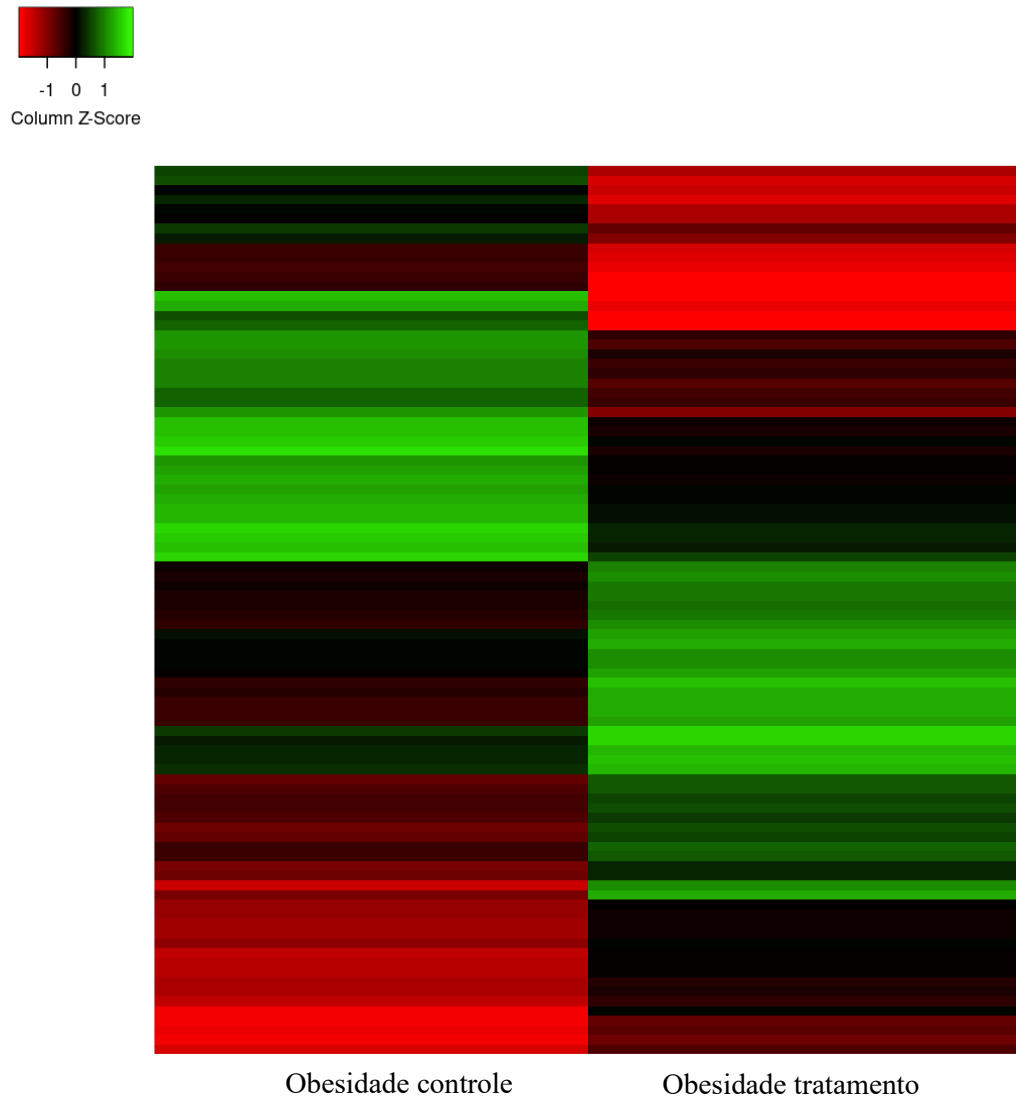


Fonte: O autor.

5.1.3 Obesidade controle X Obesidade tratamento

A comparação do perfil de metilação do DNA entre as culturas de células do Grupo obesidade controle e Grupo obesidade tratamento revelou 92 CpGDMs, estando estas localizados em 71 genes (Figura 20). Destas, 51 e 41 CpGs estavam hipermetiladas e hipometiladas, respectivamente, nos adipócitos do grupo LES e obesidade após o tratamento.

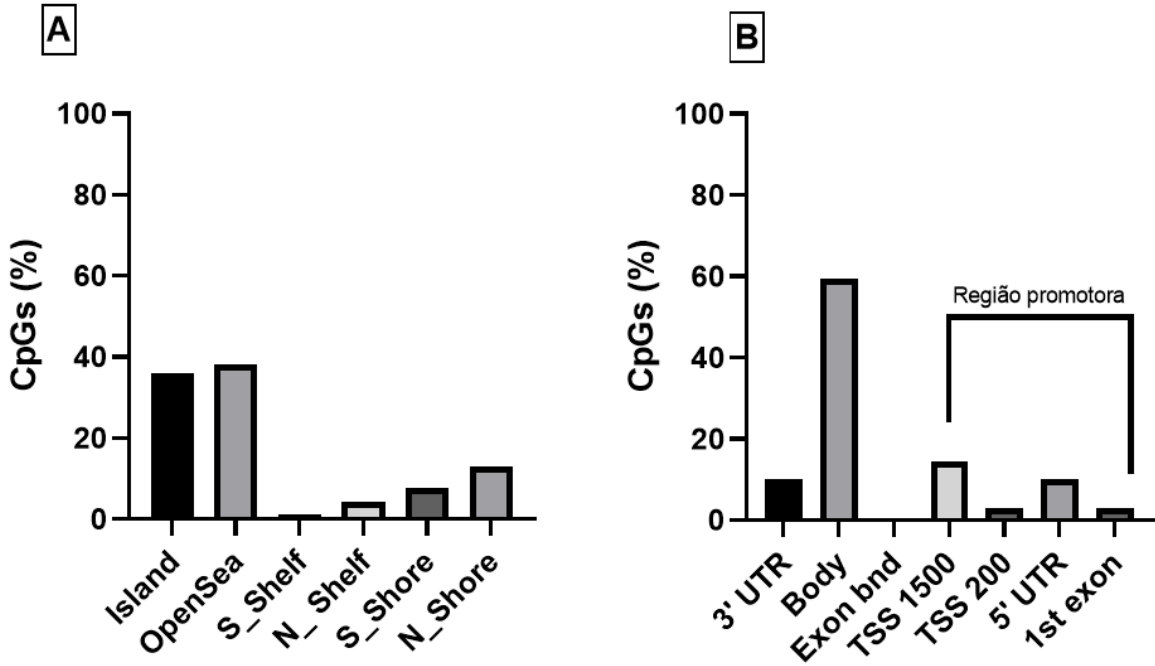
Figura 20 - Heatmap das 92 CpGs diferencialmente metiladas entre as culturas de células do Grupo obesidade controle e tratamento.



Fonte: O autor.

A maioria dessas CpGDMs (38%) encontrava-se em regiões de *OpenSea* e 35,9% em ilhas CpGs (Figura 21A). Ainda, em relação a posição das CpGs referentes ao gene, 59,4% encontravam-se distribuídas no corpo do gene e 25% na região promotora (Figura 21B).

Figura 21 - Caracterização dos sítios CpGs diferencialmente metilados entre pacientes com LES e obesidade controle e LES e obesidade tratamento.

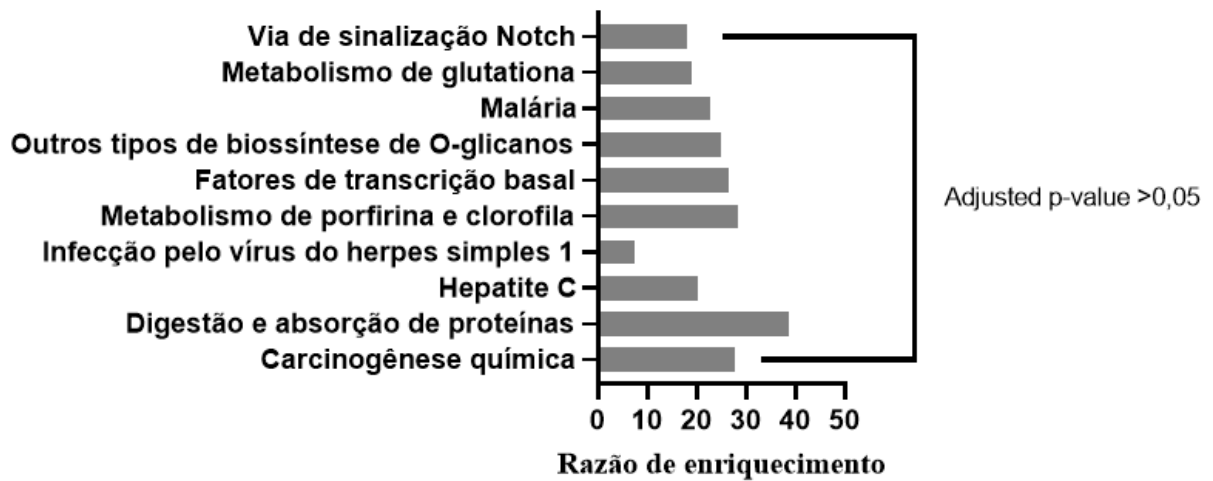


A: distribuição genômica de sítios diferencialmente metilados em relação a ilhas CpG. B: proporções das regiões gênicas dos sítios diferencialmente metilados.

Fonte: O autor.

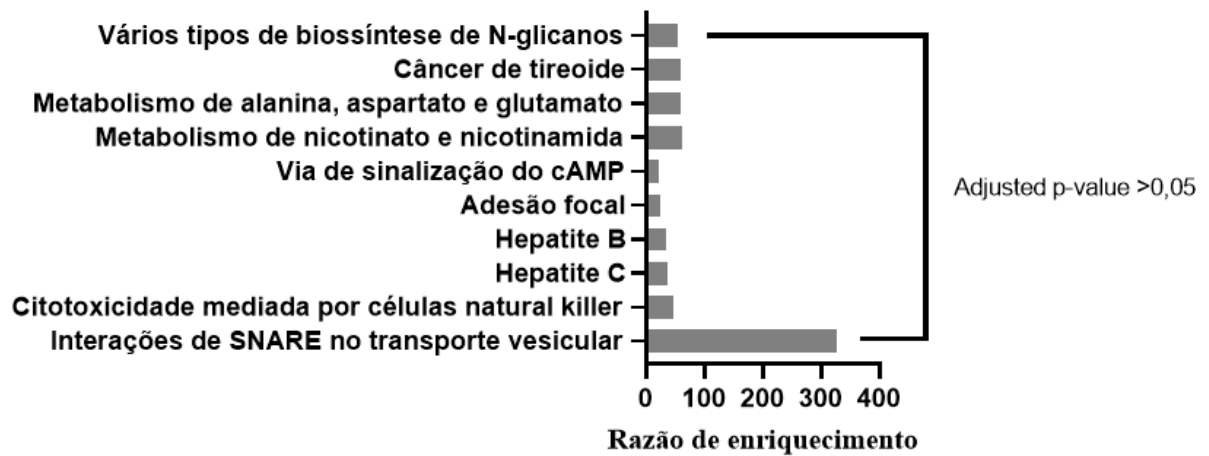
Dentre as CpGDMs hipermetiladas e hipometiladas, respectivamente, 15 e 24 genes foram anotados para as categorias funcionais selecionadas e na lista de referências, sendo assim utilizados para a análise de enriquecimento (Figuras 22 e 23).

Figura 22 - Análise de enriquecimento das CpGs hipometiladas no Grupo obesidade controle quando comparada ao Grupo obesidade tratamento.



Fonte: O autor.

Figura 23 - Análise de enriquecimento das CpGs hipermetiladas no Grupo obesidade controle quando comparada ao Grupo obesidade tratamento.

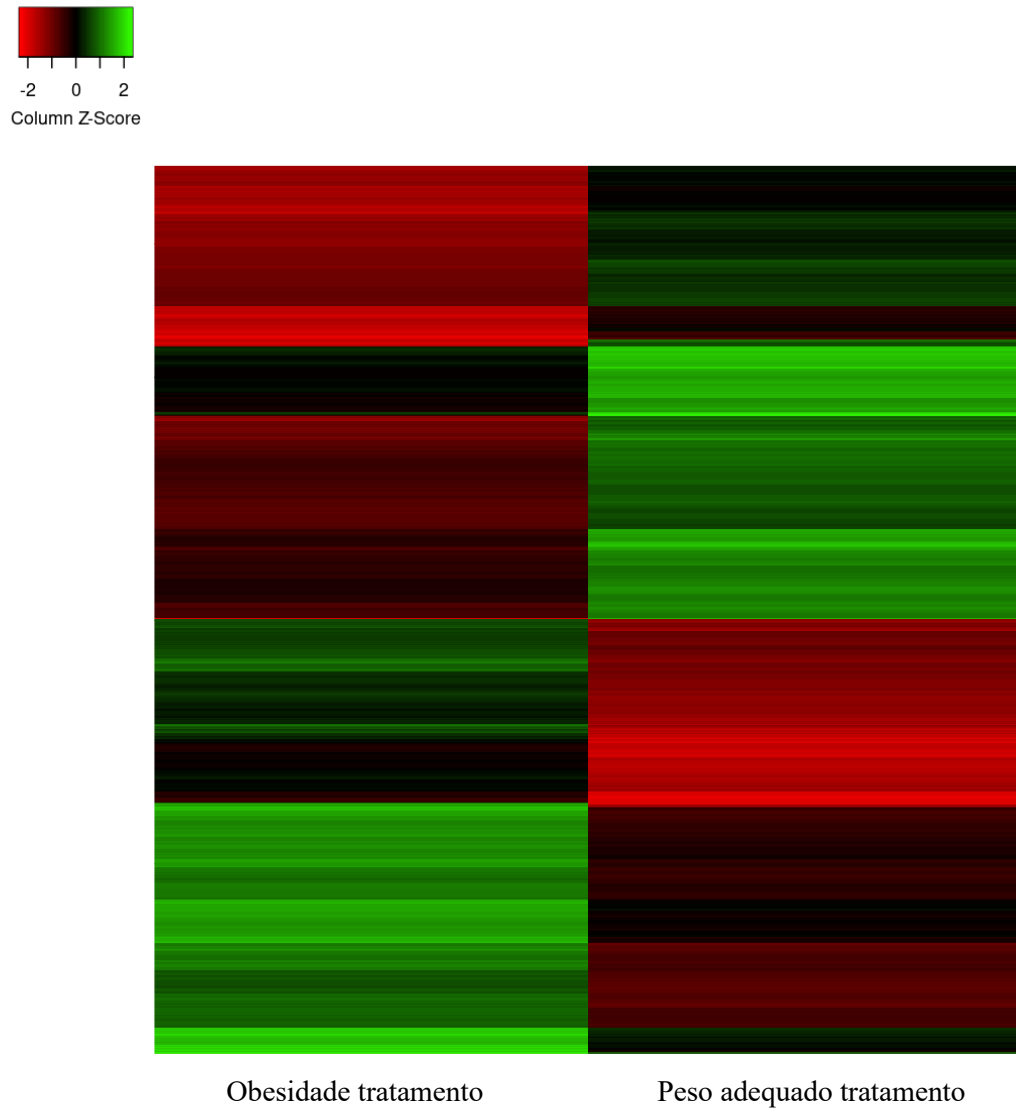


Fonte: O autor.

5.1.4 Peso adequado tratamento X Obesidade tratamento

A comparação do perfil de metilação do DNA entre as culturas de células do Grupo peso adequado tratamento e Grupo obesidade tratamento revelou 2.699 CpGDMs, estando estas localizados em 1.532 genes (Figura 24). Destas, 1.326 e 1.373 CpGs estavam hipometiladas e hipermetiladas, respectivamente, nos adipócitos do grupo LES e peso adequado tratamento.

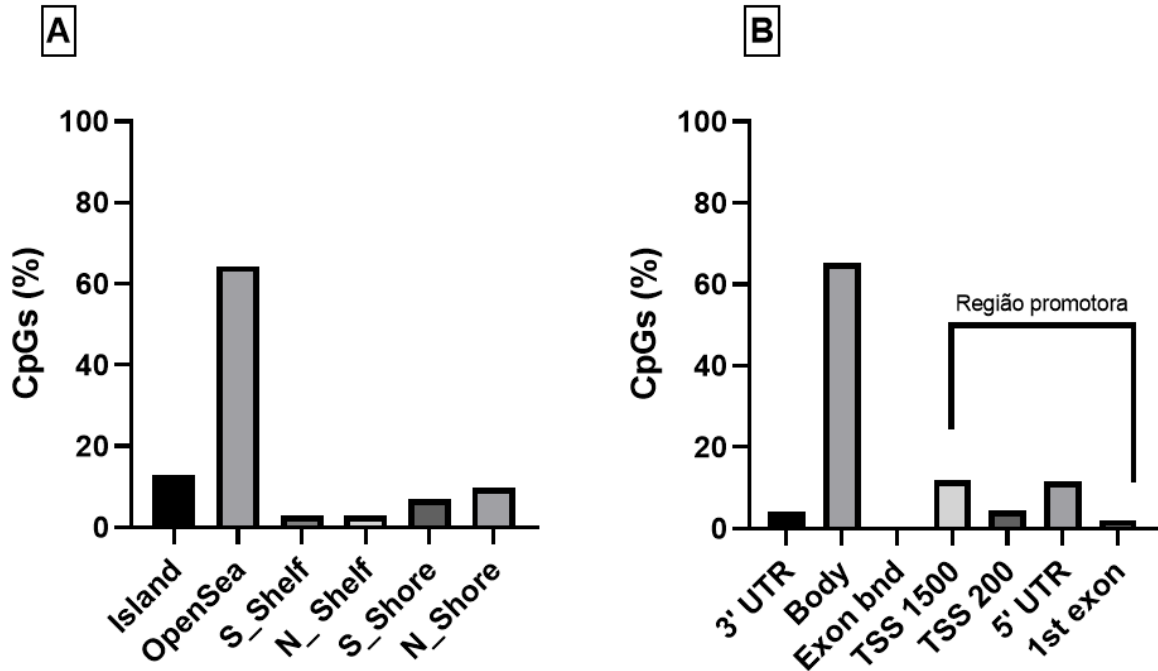
Figura 24 - Heatmap das 2699 CpGs diferencialmente metiladas entre as culturas de células do Grupo peso adequado tratamento e obesidade tratamento.



Fonte: O autor.

A maioria dessas CpGDMs (64,4%) encontrava-se em regiões de *OpenSea* e 13% em ilhas CpGs (Figura 25A). Ainda, em relação a posição das CpGs referentes ao gene, 65,4% encontravam-se distribuídas no corpo do gene e 30% na região promotora (Figura 25B).

Figura 25 - Caracterização dos sítios CpGs diferencialmente metilados entre pacientes com LES e peso adequado tratamento e LES e obesidade tratamento.

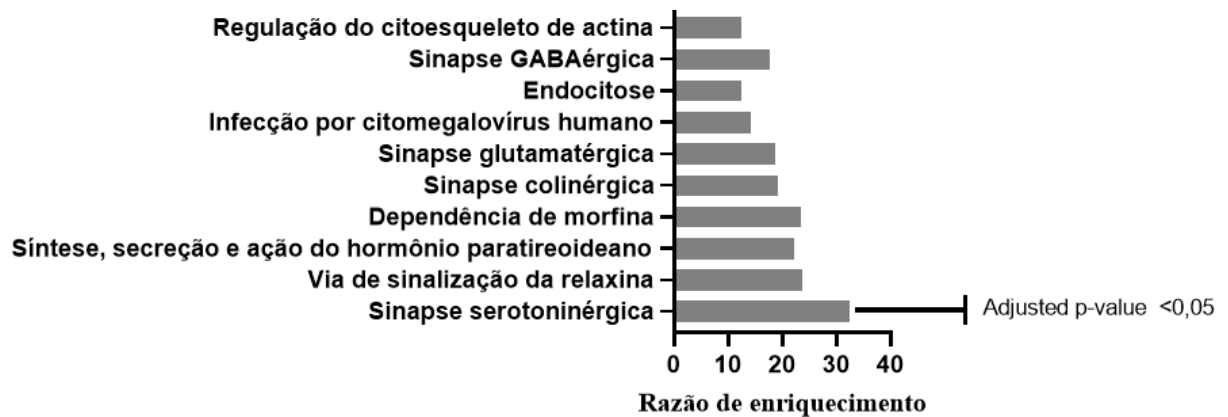


A: distribuição genômica de sítios diferencialmente metilados em relação a ilhas CpG. B: proporções das regiões gênicas dos sítios diferencialmente metilados.

Fonte: O autor.

Dentre as CpGDMs hipermetiladas e hipometiladas, respectivamente, 397 e 306 genes foram anotados para as categorias funcionais selecionadas e na lista de referências, sendo assim utilizados para a análise de enriquecimento (Figuras 26 e 27).

Figura 26 - Análise de enriquecimento das CpGs hipometiladas na cultura obesidade tratamento quando comparada à cultura peso adequado tratamento.



Fonte: O autor.

Figura 27 - Análise de enriquecimento das CpGs hipermetiladas na cultura obesidade tratamento quando comparada à cultura peso adequado tratamento.

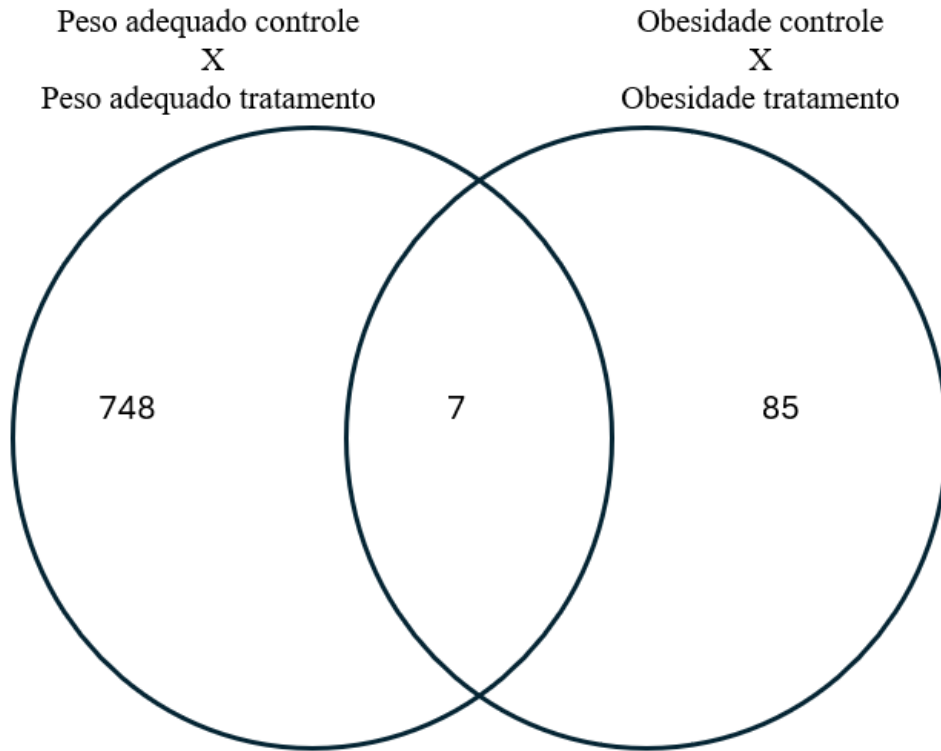


Fonte: O autor.

5.1.5 Intersecção das CpGDMs entre a comparação das culturas peso adequado controle X peso adequado tratamento e obesidade controle X obesidade tratamento

A intersecção das CpGDMs entre a comparação das culturas peso adequado controle X peso adequado tratamento e obesidade controle X obesidade tratamento revelou 7 regiões CpGs, indicando que o tratamento modificou os níveis de metilação do DNA desses sítios tanto no Grupo peso adequado quanto no Grupo obesidade, independentemente da condição nutricional representada (Figura 28). A tabela 1 descreve as CpGs em intersecção no diagrama de Venn, os genes nos quais elas se encontram e as funções dos mesmos.

Figura 28 – Intersecção das CpGDMs entre as culturas peso adequado controle X peso adequado tratamento e obesidade controle X obesidade tratamento



Fonte: O autor.

Tabela 1 - Descrição das CpGDMs contidas em intersecção da comparação entre as culturas peso adequado controle X peso adequado tratamento e obesidade controle X obesidade tratamento

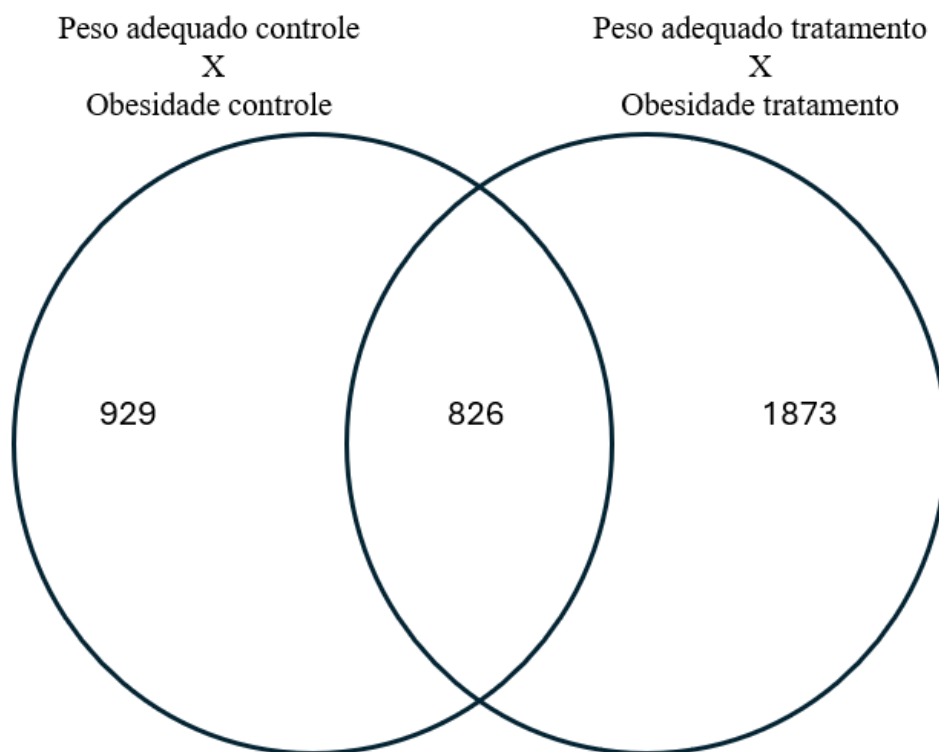
CpGs	Gene (região do gene)	Função
cg00912518	<i>MBP</i> (body)	Codificação de proteínas de mielina essenciais para a bainha de mielina no sistema nervoso, com variantes que também atuam na medula óssea e no sistema imunológico.
cg07342845	<i>TAF4</i> (body)	Codificação de uma subunidade de fator de transcrição para a iniciação da transcrição e modulação da resposta a sinais regulatórios, com implicações em doenças neurodegenerativas.
cg20478468	<i>EIF4E</i> (TS1500)	Parte do complexo de fator de iniciação da tradução 4E, para iniciar a tradução. Atua como um proto-oncogene, com sua expressão e ativação associadas à tumorigênese.
cg03689146	Desconhecido (ilha)	-
cg18605377	Desconhecido (ilha)	-
cg26669806	<i>COMP</i> (body)	Proteína não colagenosa da matriz extracelular. Funções estruturais.
cg15319704	<i>KLF5</i> (TSS1500;5'UTR)	Participa da promoção e supressão da proliferação celular
<p><i>MBP</i>: proteína básica da mielina. <i>TAF4</i>: fator associado à proteína de ligação à caixa TATA 4. <i>EIF4E</i>: fator de iniciação da tradução eucariótico 4E. <i>COMP</i>: proteína oligomérica da matriz da cartilagem. <i>KLF5</i>: fator de transcrição KLF5</p>		

Fonte: Adaptado de ¹³⁰.

5.1.6 Intersecção das CpGDMs entre a comparação das culturas peso adequado controle X obesidade controle e peso adequado tratamento X obesidade tratamento

A intersecção das CpGDMs entre a comparação das culturas peso adequado controle X obesidade controle e peso adequado tratamento X obesidade tratamento revelou 826 regiões CpGs, indicando que estas regiões eram e continuaram diferencialmente metiladas entre os grupos independentemente do tratamento com ácido fólico ou não (Figura 29).

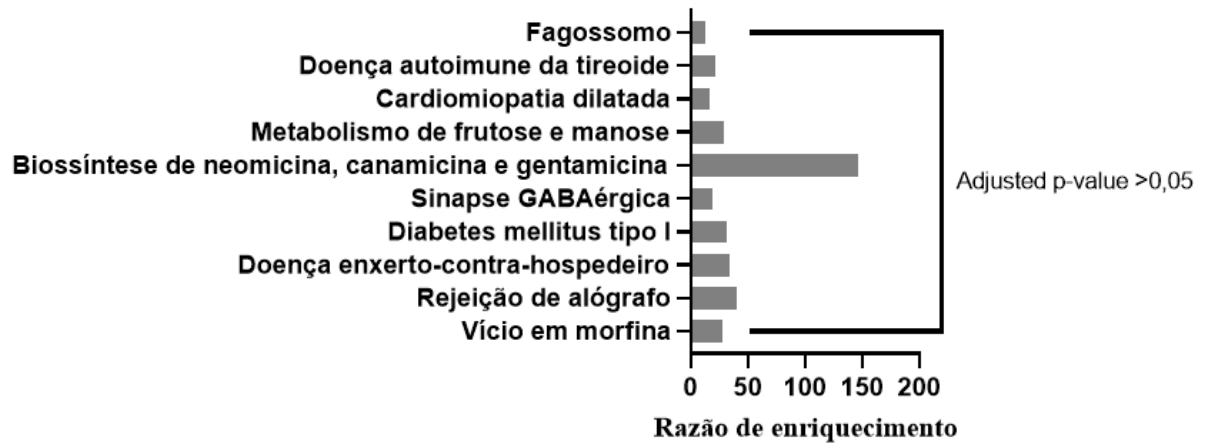
Figura 29 - Intersecção (CpGDMs) entre as culturas peso adequado controle X obesidade controle e peso adequado tratamento X obesidade tratamento.



Fonte: O autor.

Partindo de 826 CpGDMs, 469 genes foram anotados para as categorias funcionais selecionadas e na lista de referências, sendo assim utilizados para a análise de enriquecimento (Figura 30).

Figura 30 - Análise de enriquecimento das CpGs em intersecção entre a comparação das culturas peso adequado controle X obesidade controle e peso adequado tratamento X obesidade tratamento.



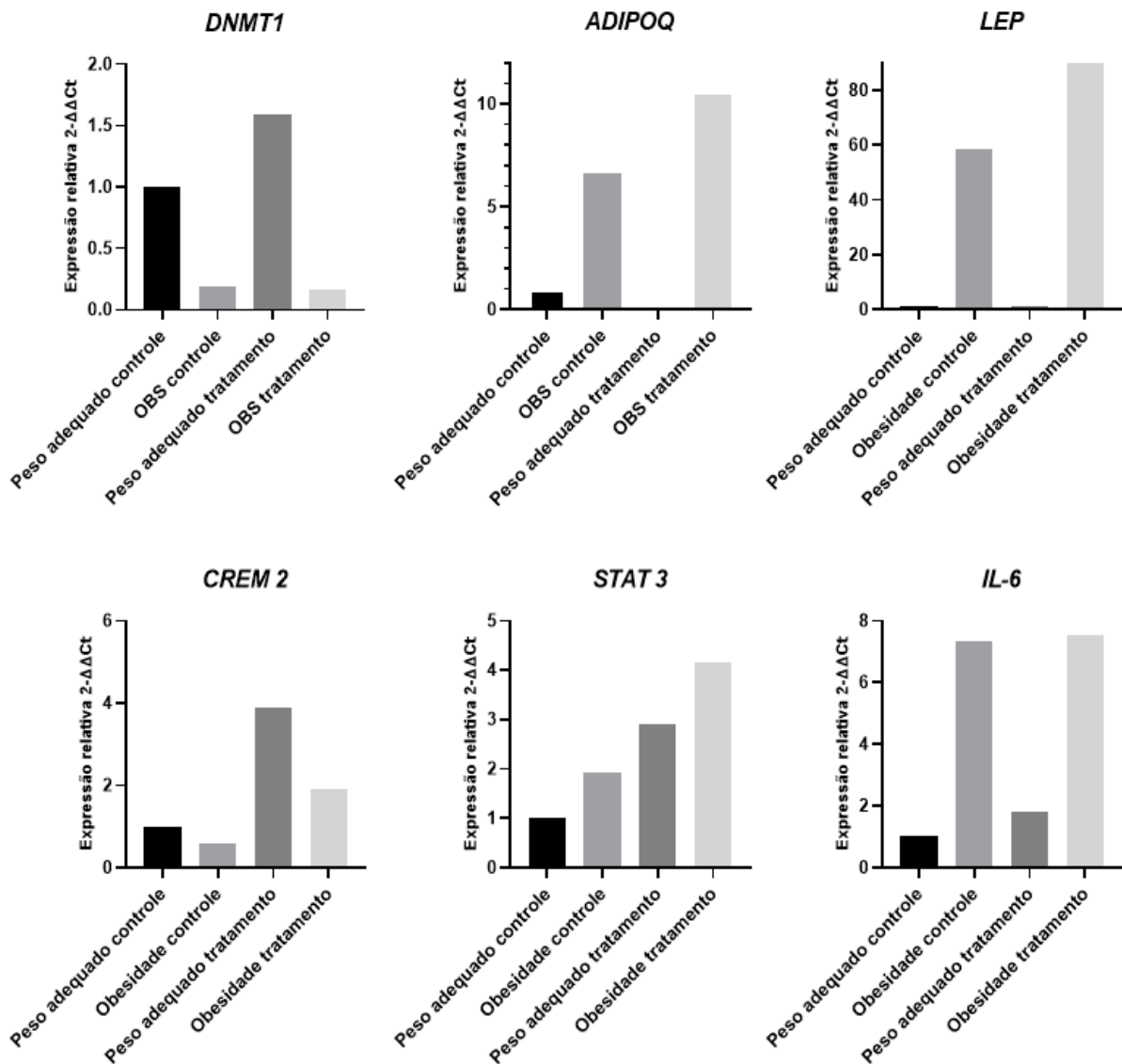
Fonte: O autor.

5.2 Expressão gênica

Os resultados da expressão dos genes *DNMT1*, *CREM2*, *STAT3*, *ADIPOQ*, *LEP* e *IL-6* estão demonstrados na Figura 31.

Observou-se que a expressão apresentou-se de forma muito heterogênea, variando entre os grupos peso adequado e obesidade. Ao comparar as culturas controle dos grupos peso adequado e obesidade, foi observado que os genes *ADIPOQ*, *IL-6*, *LEP* e *STAT3* encontraram-se mais expressos na cultura obesidade, enquanto os genes *DNMT1* e *CREM2* não mostraram alterações de expressão entre os grupos. No grupo peso adequado após o tratamento foi observado o aumento de expressão dos genes *CREM2*, *STAT3*, *IL-6* e *DNMT1* enquanto os genes *LEP* e *ADIPOQ* não demonstraram alteração. No Grupo obesidade, após o tratamento, foi observado o aumento de expressão dos genes *ADIPOQ*, *LEP*, *CREM2*, e *STAT3*, sem alterações de expressão nos genes *DNMT1* e *IL-6*. Por sua vez, ao comparar as culturas dos grupos peso adequado e obesidade após o tratamento foi observado que os genes *ADIPOQ*, *IL-6* e *LEP* demonstraram-se mais expressos na cultura obesidade, enquanto os genes *DNMT1*, *CREM2* e *STAT3* não demonstraram alterações de expressão entre os grupos.

Figura 31 - Expressão de genes alvos em cultura celular de adipócitos dos grupos LES e peso adequado e LES e obesidade.



DNMT1: DNA metiltransferase 1. *CREM2*: gene modulador do elemento responsivo ao cAMP
STAT3: proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição 3. *ADIPOQ*: adiponectina. *LEP*: leptina. *IL-6*: interleucina 6.

Fonte: O autor.

Discussão

6. DISCUSSÃO

Antes de darmos início à discussão dos resultados observados neste estudo, cabe ressaltar que ao nosso conhecimento e até o presente momento, este é o primeiro estudo a testar o efeito da suplementação com ácido fólico no perfil de metilação do DNA de adipócitos representativos de pacientes com LES em diferentes estados nutricionais e que como um estudo de caráter exploratório realizado *in vitro*, todos os achados aqui descritos se caracterizam como achados de importância não só relacionados às análises estatísticas mas também observacionais e suscetíveis a variáveis que serão discutidas ao longo deste tópico.

Ao comparar as culturas peso adequado controle e obesidade controle (ambas culturas antes da suplementação com ácido fólico), observou-se que das 1.755 CpGDMs, 951 encontravam-se hipometiladas na cultura LES e obesidade, evidenciando um perfil levemente predominante (54,2%) de hipometilação do DNA na cultura obesidade em relação a cultura peso adequado. São poucos os estudos da literatura que avaliam o perfil de metilação do DNA associado a obesidade de maneira global¹³¹⁻¹³⁶, sendo que a maioria dos estudos avaliam genes alvo, principalmente associados a adipogênese¹³², lipogênese¹³⁶ e inflamação^{133,134}.

O enriquecimento das vias metabólicas das CpGDMs hipometiladas na cultura de LES e obesidade (comparada a cultura LES e peso adequado) mostrou que essas localizavam-se em genes associados a vias do diabetes mellitus tipo I (DM1), doença autoimune da tireoide e via de moléculas de adesão celular. No que diz respeito ao DM1, novos estudos estão buscando estabelecer conexões da doença com o LES, uma vez que ambas apresentam caráter autoimune¹³⁷. Um estudo observacional conduzido por Moller et Al. (2017) mostrou que membros de uma coorte cujos parentes de primeiro grau foram afetados pelo LES tiveram um risco significativamente aumentado de desenvolver DM1¹³⁸. Entretanto, poucos estudos abordam a relação do DM1 e obesidade nesses pacientes.

Considerando as vias de autoimunidade, foi observado que as doenças da tireoide estão frequentemente associadas a outros distúrbios autoimunes, e essa relação é particularmente relevante quando se considera o LES. Os resultados do estudo conduzido por Athanassiou et al. (2023) mostram que a incidência de doenças clínicas da tireoide é mais alta entre pacientes com LES em comparação com a população geral. Uma revisão sistemática e metanálise conduzida por Song et al (2019) para estimar a associação entre os riscos de doenças da tireoide e a obesidade, evidenciou que a obesidade está significativamente relacionada ao hipotireoidismo, à tireoidite de Hashimoto e à presença de antiperoxidase tireoidiana, indicando que a prevenção da obesidade é crucial para o manejo de distúrbios e doenças da tireoide¹³⁹. Estas vias

encontram-se hipermetiladas no DNA referente a cultura LES e peso adequado em comparação com a cultura LES e obesidade, contribuindo para o cenário descrito acima, onde a obesidade se destaca como fator agravante das complicações associadas ao LES.

A via das moléculas de adesão celular também está intimamente relacionada a presença da obesidade e se correlaciona com o resultado observado. Um dos mecanismos envolvidos na conexão entre obesidade e outras doenças metabólicas corresponde ao processo de secreção de citocinas pró-inflamatórias pelo tecido adiposo e pelos macrófagos presentes no mesmo, as quais contribuem para a disfunção endotelial e a aterogênese subsequente ao aumento da permeabilidade do endotélio, promoção do recrutamento de leucócitos e à elevação da expressão de moléculas de adesão celular ¹⁴⁰. Estas moléculas desempenham um papel crucial na formação das estrias gordurosas, a etapa inicial da aterosclerose, sendo responsáveis por recrutar leucócitos, ligá-los ao endotélio e facilitar sua passagem através da barreira endotelial (3). Dessa forma, essas proteínas podem ser vistas como potenciais preditores precoces da aterosclerose e têm sido associadas à adiposidade, estando entre estas as mais comumente destacadas a molécula de adesão celular intercelular-1 (ICAM-1), a molécula de adesão de células vasculares-1 (VCAM-1) e a P-selectina ^{140,141}. Um estudo conduzido por Mulhem et al. (2020) sugere que o aumento do risco cardiovascular relacionado à obesidade é refletido e pode ser mediado por moléculas de adesão celular significativamente mais altas ¹⁴². Nesse cenário, Miller e Capuccio (2006) evidenciaram que os níveis de sE-selectina estão fortemente correlacionados ao IMC e à relação cintura-quadril dos indivíduos, mesmo quando ajustados os resultados para fatores como idade, sexo, etnia, tabagismo, pressão arterial, níveis de gordura no sangue e insulina, indicando que um pequeno aumento no IMC ou na relação cintura-quadril está relacionado a um pequeno aumento dos níveis dessa molécula ¹⁴³. Tais dados enfatizam a presença da obesidade como fator agravante para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares como a aterosclerose, e a importância da sua interação com o LES.

Sem valor estabelecido estatisticamente, mas de relevância a nível desta discussão, os genes relacionados às CpGDMs hipermetiladas na cultura de LES e obesidade (comparada à cultura LES e peso adequado) relacionavam-se à via de sinalização da proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK), via de sinalização da insulina e regulação da lipólise nos adipócitos, as quais se comunicam através de cascatas de sinalização interligadas. A via AMPK desempenha um papel crucial na regulação do metabolismo celular e é ativada em resposta a aumentos na relação AMP/ATP, indicando um estado de baixo nível de energia na célula. Ao ser ativada, a AMPK atua como um sensor metabólico que ajusta a atividade celular para restaurar o equilíbrio energético. Esta ativação leva à promoção de processos que geram

energia, enquanto inibe processos que consomem energia, como a lipogênese e a proliferação celular ¹⁴⁴. No tecido adiposo, evidências recentes apontam que a ativação da AMPK está associada à lipogênese/adipogênese, à oxidação de ácidos graxos, à termogênese e ao escurecimento do tecido adiposo branco ^{145,146}. Com a ativação da AMPK, as vias anabólicas, como a lipogênese e a síntese de glicogênio, são reguladas negativamente e a oxidação de ácidos graxos e a captação de glicose, são regulados positivamente ¹⁴⁷. Entretanto, em condições de alta disponibilidade de nutrientes e/ou obesidade, a alta demanda de glicose e a inflamação reduzem a atividade da AMPK ao aumentar a atividade de fosfatases (como PP2A/2C e PHLPP2) ¹⁴⁸. A expressão atenuada de AMPK está associada a um aumento inverso em marcadores inflamatórios em modelos de camundongos ¹⁴⁹ e em humanos com obesidade ¹⁵⁰.

Nesse contexto, destaca-se o papel da IL-6. Como mencionado anteriormente, a IL-6 é uma citocina pleiotrópica amplamente conhecida por seus efeitos no sistema imunológico ³⁹. Na ausência de processos inflamatórios agudos, grande parte da IL-6 presente no plasma é derivada do tecido adiposo, com concentrações aumentadas observadas em indivíduos com obesidade ¹⁵¹. Corroborando com a literatura, o presente estudo evidenciou a expressão aumentada do gene *IL-6* na cultura LES e obesidade em relação a cultura LES e peso adequado.

No que diz respeito a expressão do gene *LEP*, os achados do nosso estudo corroboram com a literatura, uma vez que se esperava que a cultura obesidade apresentasse uma maior expressão gênica de *LEP*, já que segundo a literatura, a obesidade está associada à produção de leptina e à alta concentração da mesma no plasma ¹⁵², o que de fato foi observado, tendo a cultura obesidade controle apresentado um aumento de 58.5X em relação a cultura peso adequado controle.

Seguindo com as adipocinas características do tecido adiposo, foi observado uma expressão aumentada do gene *ADIPOQ* na cultura obesidade em relação a cultura peso adequado, dado que contraria o esperado em literatura, que comumente indica maior expressão de adiponectina em indivíduos com peso adequado que em indivíduos com obesidade ⁶⁶. No entanto, embora sejam menos frequentes em literatura, há dados que abordam a resistência à adiponectina, que pode estar presente e associada à casos de resistência à insulina, onde os níveis elevados de adiponectina com resistência à mesma são uma resposta compensatória à condição de uma discordância incomum entre a resistência à insulina e à falta de resposta à adiponectina ¹⁵³. Além disso, diferentes mecanismos estão envolvidos na resistência vascular à adiponectina em diferentes estágios da obesidade e, evidências de resistência à adiponectina foram observadas na obesidade e após dietas com alto teor de lipídeos ¹⁵⁴.

Considerando o gene *DNMT1*, não foram observadas diferenças nos níveis de expressão entre as culturas peso adequado e obesidade. Considerando nossos achados sobre um perfil global característico de hipometilação do DNA na cultura obesidade em relação a cultura peso adequado, esperava-se que os níveis de expressão de *DNMT1* estivessem reduzidos nessa mesma cultura. Ainda são escassos na literatura estudos avaliando os níveis de DNMT1 associados aos estados nutricionais. Em um estudo conduzido por PARK et. al. (2021) foi observado que na presença da ablação genética da enzima DNMT1, houve um aumento na adiposidade corporal devido ao crescimento excessivo dos adipócitos, e que a expressão de *DNMT1* no tecido adiposo correlacionou-se inversamente com a adiposidade e com marcadores de saúde metabólica ¹⁵⁵, ponto comum e reflexivo entre a interação da hipometilação da cultura obesidade em relação a cultura peso adequado e as características da obesidade em si.

A expressão do gene *CREM2* não demonstrou alterações significativas na cultura obesidade em relação a cultura peso adequado, enquanto a expressão do gene *STAT3* demonstrou-se elevada. Embora incluídos neste trabalho como alvos diretamente relacionados ao LES e não à obesidade, há em literatura a associação entre os genes *CREM2* e *STAT3* e o excesso de peso, ainda que de forma indireta ^{156,157}. Neste contexto, a capacidade de indução da adipogênese em precursores de adipócitos maduros, associada à ativação da via de sinalização JAK/STAT3 é capaz de promover um aumento na diferenciação dos pré-adipócitos e no acúmulo de lipídios. Essa via é importante para o equilíbrio do metabolismo e para a prevenção de doenças metabólicas, pois sua disfunção pode contribuir para o desenvolvimento e a progressão da obesidade ¹⁵⁶. E, devido a essa função importante, esperava-se que a expressão da via JAK/STAT3 estivesse mais pronunciada na cultura obesidade em comparação com a cultura peso adequado, o que foi de fato observado em nossos achados. Da mesma forma, esperava-se que a expressão do gene *CREM2*, devido ao seu papel na regulação do metabolismo da glicose e lipídios, na resposta inflamatória e na resistência à insulina ¹⁵⁷, apresentasse diferenças significativas entre obesidade e peso adequado. No entanto, esse padrão não foi observado em nossos resultados.

Estudos mostram que fatores relacionados à obesidade como ingestão inadequada de alimentos ¹⁵⁸, inflamação, condições de hipóxia ¹⁵⁹ e microbiota intestinal ¹⁶⁰ podem induzir alterações epigenéticas em tecidos-alvo. Por exemplo, o estresse oxidativo pode promover a indução de danos ao DNA (e.g. modificações de base, deleções, quebras de fita) os quais reduzem a capacidade do mesmo de ser metilado pelas enzimas DNMTs ^{161,162}. Ainda, várias enzimas envolvidas nas modificações epigenéticas utilizam cofatores ou substratos que são metabólitos cruciais como a SAM, que é sintetizada dentro da via da metionina com a

capacidade de modulação do padrão de metilação do DNA ^{14,111}. Uma revisão sistemática recente demonstrou que os efeitos da suplementação com ácido fólico variaram, mostrando tanto um aumento na metilação global, quanto a ausência de alterações ou até mesmo uma redução na metilação do DNA ¹⁵. Após o período de suplementação e das análises de metilação do DNA das culturas celulares, foram observados resultados variados que destacam a importância do estudo, uma vez que a literatura é escassa a respeito dos efeitos da suplementação com ácido fólico no perfil de metilação do DNA do tecido adiposo e/ou adipócitos representativos de LES. Ressalta-se ainda, a diferença de resultado de acordo com a presença ou não da obesidade associada.

Ao compararmos as culturas peso adequado controle e peso adequado tratamento, ou seja, o grupo peso adequado antes e depois da suplementação, foi observado que das 755 CpGDMs, 567 (75,1%) foram hipometiladas após o tratamento. Ainda, as análises de enriquecimento mostraram que as CpGs hipometiladas após o tratamento relacionavam-se com diferentes vias metabólicas, destacando-se a via de diferenciação dos linfócitos T helpers do tipo 1 e 2 (Th1 e Th2). Os linfócitos Th1 e Th2 desempenham papéis importantes na resposta imunológica do LES. Enquanto os linfócitos Th1 são responsáveis por mediar a resposta inflamatória e estimular a produção de autoanticorpos, os linfócitos Th2 estão envolvidos na regulação e amplificação dessa resposta através da secreção de várias citocinas. A desregulação nos níveis dessas citocinas é um dos principais fatores que contribuem para a patogênese e gravidade do LES ¹⁶³. O papel do folato no sistema imunológico não foi totalmente caracterizado. Alguns autores sugerem que o *status* do folato pode afetar o sistema imunológico reduzindo a capacidade das células CD8+ de proliferar em resposta à ativação ¹⁶⁴. Um estudo *in vivo* mostrou que a administração oral de altas doses de ácido fólico (160 µg/d a 10 mg/d) reduziu a resposta inflamatória em camundongos ao suprimir a proliferação de células T, a secreção de citocinas pró-inflamatórias e células Th2 ¹⁶⁵.

Em relação as CpGs hipermetiladas após o tratamento, estas relacionavam-se a diversas vias metabólicas, destacando-se a via das quinases de proteína ativadas por mitógenos (MAPK). A MAPK é uma ponte importante na conversão de sinais extracelulares (mitógenos) em respostas intracelulares. Alterações nas cascatas de sinalização são encontradas em várias doenças, e essa via desempenha papéis importantes nas respostas imunes e na patogênese autoimune incluindo o LES, por meio da indução de citocinas e quimiocinas ¹⁶⁶. Como tentativa terapêutica, inibidores de MAPK foram desenvolvidos para a atenuação das respostas autoimunes, sugerindo que uma menor expressão dessa via pode ser benéfica ^{167,168}. Estes estudos indicam que a redução da atividade de MAPK pode resultar na diminuição das respostas

inflamatórias, o que é desejável no contexto do LES, dado que condiz com o perfil de hipermetilação da cultura tratamento, o que poderia contribuir para a sua menor atividade.

No presente estudo, observou-se que o tratamento com ácido fólico aumentou a expressão dos genes *IL-6*, *CREM2* e *STAT3*, associados as vias imunológicas características do LES, enquanto a expressão dos genes *LEP* e *ADIPOQ* não demonstrou alterações significativas. Tal resultado contradiz a hipótese inicial do estudo de que o tratamento com ácido fólico seria capaz de metilar o DNA da cultura tratamento e por consequência, diminuir a expressão de genes relacionados à inflamação e a cascata do LES. Garg et al. (2024) evidenciaram em seus resultados de cultivo de células T CD4⁺ de pacientes com LES que baixos níveis de micronutrientes envolvidos na transferência de grupos metil podem aumentar a expressão de genes de células T sensíveis à metilação ¹⁶⁹. Nesse mesmo sentido, apesar de não avaliar o LES, outros autores evidenciaram em seus estudos o efeito da suplementação com ácido fólico em relação ao aumento de metilação do DNA e capacidade de prevenção da perda global de metilação e supressão da inflamação ¹⁷⁰, bem como redução de respostas ao estresse celular ¹⁷¹. Em contrapartida, um estudo *in vitro* com populações de células B CD19⁺ de pacientes com LES cultivadas na presença de ácido fólico não demonstrou efeito do tratamento nos níveis de metilação do DNA ¹²⁴.

Em relação ao aumento de expressão dos genes *IL-6*, *STAT3* e *CREM2*, Hensen et. al. (2015) evidenciaram em seu estudo, após o tratamento de células HeLa com ácido fólico que a via JAK/STAT pode ser ativada pelo folato, através do receptor de folato α . Essa ativação do gene *STAT3* pelo ácido fólico acrescenta uma maior complexidade aos papéis já estabelecidos das vitaminas B9 no metabolismo de um carbono. E essa via de transdução de sinal pode influenciar vários processos celulares, incluindo proliferação celular ¹⁷², dado que talvez possa explicar o aumento de expressão desta via após o tratamento.

Por sua vez, o gene *DNMT1* demonstrou-se aumentado na cultura tratamento em relação a cultura controle e, como mencionado anteriormente, já está bem estabelecido na literatura que o LES se relaciona a um perfil de hipometilação generalizada do DNA e expressão reduzida de *DNMT1* em células T ^{94,173,174}. Apesar de ter sido observado em predominância um perfil de hipometilação do DNA na cultura peso adequado tratamento em relação a cultura peso adequado controle, muitos fatores estão envolvidos nos mecanismos epigenéticos e o aumento de expressão do gene *DNMT1* pode indicar outros meios pelos quais o tratamento foi capaz de alterar o padrão de metilação do DNA. Ressalta-se que a hipometilação do DNA também pode ser alcançada por meio de desmetilação ativa por um conjunto diferente de enzimas como, por exemplo, a 3-hidroxi-butirato desidrogenase 2 (BDH2), que é uma desidrogenase de cadeia curta

envolvida na manutenção da homeostase do ferro intracelular^{94,175}. No LES, análises de células T CD4⁺ mostraram que diminuição da BDH2 contribuiu para a hipometilação do DNA por meio do aumento do ferro intracelular^{94,175}.

Ainda no contexto da suplementação com ácido fólico, ao comparar as culturas obesidade controle e obesidade tratamento, ou seja, as duas culturas do grupo obesidade antes e depois da suplementação com ácido fólico, observou-se que a maioria das CpGs foram hipermetiladas após o tratamento, resultado condizente com a hipótese esperada do trabalho. O enriquecimento das vias metabólicas demonstrou diferentes vias associadas aos genes diferencialmente metilados, destacando-se entre estas, a via de sinalização da adenosina monofosfato cíclico (cAMP) no perfil de hipometilação da cultura tratamento em relação a cultura controle. A via cAMP relaciona-se diretamente com o gene *CREM*, importante contribuinte na patogênese do LES conforme já abordado na revisão de literatura deste trabalho. Em 1999, Powell et al. associou o *CREM* à diminuição da produção de IL-2 em uma linhagem de células T murinas (anergia), ao demonstrar que o CREM se liga diretamente ao sítio -180 do promotor do gene *IL2*¹⁷⁶. Com base nessa relação, o grupo de George Tsokos estabeleceu a importância do CREM como uma das principais razões para a produção reduzida de IL-2 em células T de LES *in vitro*^{177,178}. Além disso, Juang et. al. (2010) também reforçaram a informação de que, devido à expressão basal aumentada do *CREM* nas células T de pacientes com LES, ocorre uma produção diminuída de IL-2 com consequente anergia das células T¹⁷⁹. A hipometilação de CpGs associadas à via cAMP na cultura peso adequado após tratamento, é sugestiva de uma maior expressão de genes associados a essa via na cultura tratamento em relação ao controle, fato observado na expressão gênica, onde obtivemos o aumento significativo do gene *CREM2* para essa comparação nos resultados do presente estudo. Ressalta-se ainda, a respeito do *CREM* que estudos prévios avaliando a via cAMP no LES foram conduzidos em células T¹⁷⁶⁻¹⁷⁹ e que dados da literatura a respeito do perfil de metilação do DNA e da expressão do gene *CREM* e da via cAMP em tecido adiposo são escassos. Estudo *in vivo* com camundongos obesos alimentados com uma dieta rica em gorduras demonstrou que a atividade transcricional do CREB (um dos fatores de transcrição da proteína ligadora do elemento responsivo ao cAMP) está anormalmente elevada em adipócitos¹⁸⁰, o que evidencia a necessidade de novos estudos exploratórios a respeito da participação desta via metabólica na condição de LES e obesidade.

Em relação as CpGs hipermetiladas após o tratamento com ácido fólico na cultura LES e obesidade, observou-se que essas relacionavam-se a diversas vias, destacando-se como via de interesse, a via de sinalização NOTCH. A sinalização NOTCH constitui uma via que transmite

sinais entre células adjacentes e que determina decisões importantes na proliferação, sobrevivência e diferenciação celular. Os receptores dessa via formam uma família de moléculas transmembrana que estão envolvidas em processos de comunicação célula-célula de curta distância durante a organogênese, decisões de destino celular e polaridade celular, principalmente de linfócitos T helpers e linfócitos T periféricos ¹⁸¹. Rauen et al. (2012) observaram em seu estudo quantidades significativamente reduzidas de Notch-1 em células T de pacientes com LES clinicamente ativo e apresentaram evidências de que a expressão do gene *Notch-1* é altamente controlada por meio de mudanças na conformação epigenética do seu promotor, incluindo metilação de histonas e DNA, e repressão transcricional mediada por CREM ¹⁸¹. Os resultados do presente estudo corroboram com tais dados, visto que a análise de metilação do DNA da cultura controle em relação a cultura tratamento evidenciou a via de sinalização NOTCH em um perfil de hipometilação, em um possível paralelo com resultados negativos em relação ao efeito da suplementação nessa via. Ainda, no raciocínio de uma correlação do lúpus com a obesidade, foi observado por Moulton e Tsokos (2015) que além de reduzida em células T de pacientes com LES, a via de sinalização NOTCH também foi implicada na geração de macrófagos M2 ¹⁸², também relacionados a patogênese da obesidade e a despolarização de macrófagos envolvida nos mecanismos de inflamação, sendo de interesse para os indivíduos com LES que a mesma se encontre em um perfil de hipermetilação do DNA e não hipometilação.

Além disso, observou-se que a cultura tratamento apresentou expressão elevada dos genes *ADIPOQ* e *LEP* (genes relacionados intimamente com a atividade metabólica da obesidade) em relação a cultura controle. Sabe-se que os efeitos e os mecanismos de ação do ácido fólico a respeito do metabolismo relacionado à obesidade induzida por dieta rica em gordura ainda não estão bem elucidados, no entanto, em dois estudos recentes, foi observado, após a suplementação com ácido fólico em modelos animais, um efeito modulador do metabolismo de lipídeos ^{183,184}, onde a suplementação reduziu a massa adiposa, os níveis séricos de glicose e melhorou a resistência à insulina em camundongos alimentados com dieta hipercalórica. Ainda, ambos os estudos também demonstraram um perfil de hipermetilação global ao longo do DNA dos adipócitos após a suplementação e a análise de vias metabólicas demonstrou mudanças de metilação em genes do tecido adiposo associados à secreção de insulina, secreção pancreática e diabetes tipo 2, tendo a suplementação com ácido fólico induzido mudanças na expressão de genes associados à obesidade ^{183,184}.

Ainda neste raciocínio e conforme citado anteriormente, grande parte da IL-6 presente no plasma é derivada do tecido adiposo ¹⁵¹. Deste modo, e de acordo com a hipótese do trabalho,

esperava-se que a expressão do gene *IL-6* fosse reduzida após a suplementação com ácido fólico o que não foi observado. Não houve alteração nos níveis de expressão deste gene. Asbaghi et al. (2021) relataram em sua metanálise que a suplementação com ácido fólico foi capaz de melhorar a inflamação em um contexto geral, mas sem efeitos significativos sobre *IL-6* e *TNF- α* , enfatizando também a necessidade de estudos mais completos e em larga escala para melhor compreensão a respeito dos efeitos do ácido fólico nesta citocina ¹⁸⁵.

O gene *DNMT1* também não apresentou alterações em sua expressão após o tratamento com ácido fólico. Esperava-se um aumento de expressão de *DNMT1* após a suplementação, visto que foi observado um padrão de hipermetilação da maioria dos sítios CpGs na cultura tratamento. Considerando que o processo de metilação do DNA é catalisado pelas enzimas metiltransferases do DNA, como a *DNMT1* e a *DNMT3A*, sugere-se que outros mecanismos além de alterações na regulação da *DNMT1*, possam estar envolvidas ¹⁸⁶, como por exemplo a regulação das outras *DNMTs*.

Ainda, após a suplementação com ácido fólico houve o aumento de expressão dos genes *STAT3* e *CREM2* na cultura obesidade tratamento em relação a cultura obesidade controle, resultado esse condizente com as outras comparações. Conforme citado na comparação entre as culturas peso adequado controle e tratamento, o ácido fólico tem um papel importante como ativador da via *JAK/STAT* ¹⁷², podendo estar associado ao aumento desta expressão.

Ainda no contexto da suplementação com ácido fólico, a comparação de ambas as culturas após o tratamento mostrou um perfil de hipometilação do DNA da cultura de adipócitos representativos de LES e obesidade em relação a cultura de LES e peso adequado. O enriquecimento das vias metabólicas demonstrou diferentes vias associadas a esta comparação, sendo que as CpGs hipometiladas na cultura obesidade relacionavam-se com a via das sinapses serotoninérgicas.

Sabe-se que a prevalência de depressão em pacientes com LES é duas vezes maior do que na população em geral ¹⁸⁷ e que os transtornos de ansiedade são duas vezes mais frequentes em pacientes com LES se comparados com os grupos controle (AINIALA et al., 2001), e que tanto a depressão quanto a ansiedade têm impactos profundos na saúde e bem-estar dos indivíduos, incluindo um aumento na incidência de doenças cardiovasculares¹⁸⁹ infarto do miocárdio ¹⁹⁰, ideação suicida ¹⁹¹, além de um risco maior de mortalidade prematura ¹⁹². No que diz respeito às sinapses serotoninérgicas e ao comportamento alimentar, evidências apoiam um papel da sinalização da serotonina na regulação do comportamento alimentar e do peso corporal a longo prazo ¹⁹³⁻¹⁹⁶. Investigações por meio de neuroimagem molecular, que permitem a visualização e quantificação da disponibilidade de receptores centrais de serotonina

ou transportadores, indicam que a obesidade humana está frequentemente associada a uma redução na sinalização serotoninérgica ¹⁹³. A administração sistêmica de serotonina tem mostrado reduzir a ingestão de alimentos ¹⁹⁴, enquanto o tratamento com antidepressivos, como os inibidores seletivos da recaptação de serotonina, também afeta a ingestão alimentar em animais e humanos. Uma metanálise revelou que essas terapias estão ligadas a um maior risco de ganho de peso ao longo de um período de dez anos ¹⁹⁵. Em contraste, a sinalização periférica da serotonina promove a absorção e o armazenamento de energia, e os efeitos periféricos podem ajudar a explicar o aumento de peso observado com o uso de inibidores seletivos da recaptação de serotonina ¹⁹⁶.

Por outro lado, as CpGs hipermetiladas na cultura obesidade comparada a cultura peso adequado, ambas após a suplementação, relacionavam-se com a via de sinalização de ocitocinas. A ocitocina é um neuropeptídeo hipotalâmico originalmente conhecido por sua capacidade de induzir contrações uterinas, promover a ejeção de leite e, também reconhecido como um neuromodulador capaz de moldar comportamentos sociais humanos, como a formação de vínculos de casal, atividades sexuais, preferências afiliativas e comportamentos parentais ¹⁹⁷. A interação entre os sistemas nervoso e imunológico têm sido estudada a décadas e um aspecto marcante dessa comunicação é que ambos os sistemas possuem moléculas semelhantes, permitindo uma linguagem comum entre eles. Neurotransmissores podem ser produzidos por células do sistema imunológico, e, por sua vez, citocinas podem ser liberadas por células do sistema nervoso. Além disso, células de ambos os sistemas possuem receptores correlacionados, ainda que a forma como os sinais são transmitidos varie conforme o tipo celular específico. A ocitocina, e a própria via de sinalização das citocinas está presente no timo humano, responsável pela geração de linfócitos T e, embora ainda não se saiba exatamente como a ocitocina participa no desenvolvimento das células imunológicas, Francelin et al. (2021) acreditam que há evidências de que ela ajude na maturação e regulação de linfócitos ¹⁹⁸. Ainda, a oxitocina parece contribuir para a produção de antígenos específicos de tecidos pelo epitélio tímico, processo que está envolvido nas vias de autoimunidade, uma vez que a ocitocina também pode influenciar na seleção negativa, ou seja, na seleção e eliminação das células com potencial reativo autoimune ¹⁹⁸. Em relação à obesidade, alguns estudos realizados em animais e em humanos enfatizam o potencial da ocitocina na redução da ingestão de calorias e aumento da oxidação de gorduras, melhora da sensibilidade à insulina e o transporte de glicose em tecidos periféricos ^{199–201}. No entanto, as ações periféricas da ocitocina não foram amplamente avaliadas na literatura, especialmente no que diz respeito aos seus efeitos em humanos ¹⁹⁹. O resultado observado em nosso estudo, de hipermetilação da cultura obesidade tratamento em

relação a cultura peso adequado tratamento evidencia o papel do estado nutricional na resposta a suplementação.

Em relação a expressão gênica, os genes *ADIPOQ*, *LEP* e *IL-6* apresentaram-se elevados na cultura obesidade em relação a cultura peso adequado após o tratamento. No que diz respeito a *IL-6*, este aumento de expressão abre espaço para uma discussão sobre o papel da obesidade como fator agravante da inflamação, uma vez que, antes e após o tratamento com ácido fólico a mesma manteve o perfil de superexpressão, cabendo ressaltar que antes da suplementação, observou-se uma diferença de 7,33X em relação a cultura peso adequado, enquanto após a suplementação, observou-se um aumento de 4,13X em relação a cultura peso adequado tratamento, o que indica que embora aumentada, houve uma redução da expressão gênica.

A disfunção metabólica da obesidade também pôde ser evidenciada com a expressão dos genes *ADIPOQ* e *LEP*, que permaneceu aumentada na cultura obesidade em relação a cultura peso adequado após o tratamento, conservando o perfil observado de superexpressão na cultura obesidade tratamento em relação a cultura obesidade controle, cabendo ressaltar as informações contidas em literatura já citadas nas comparações acima a respeito da resistência a adiponectina ¹⁵³ e da presença de aumento de leptina na obesidade ¹⁵² bem como a influência sobre o metabolismo de lipídeos observada ⁶⁶.

Por sua vez, os genes *CREM 2* e *STAT3* não demonstraram alterações significativas de expressão entre as culturas após a suplementação. Um ponto ao qual devemos considerar é que, apesar de não apresentar aumentos significativos (1,5X) de expressão, o gene *STAT3* demonstrou-se elevado 1,4X na cultura obesidade tratamento em relação a cultura peso adequado tratamento, fato que corrobora com a literatura já citada e discutida nas outras comparações, na qual a via JAK/STAT e a sua disfunção pode contribuir para o desenvolvimento e a progressão da obesidade ¹⁵⁶. Enquanto o gene *DNMT1* apresentou-se elevado 9,9X na cultura peso adequado tratamento em relação a cultura obesidade tratamento, o que condiz com o perfil de hipermetilação da mesma.

No contexto da influência do estado nutricional na resposta a suplementação de ácido fólico, observou-se que das 755 CpGDMs modificadas após o tratamento no grupo peso adequado e das 92 no grupo obesidade, sete CpGDMs foram modificadas em ambos os grupos. Em outras palavras, observou-se que as mesmas sete CpGDMs foram modificadas com a suplementação de ácido fólico, independentemente do estado nutricional. Tais CpGs encontravam-se em sete genes distintos, cinco identificados e dois não identificados, apresentando funções diversas como a codificação de proteínas essenciais para a bainha de mielina no sistema nervoso e no sistema imunológico; codificação de uma subunidade essencial

para iniciar e modular a resposta a sinais regulatórios com implicações em doenças neurodegenerativas, e à codificação de fatores que contribuem para a estrutura da matriz extracelular com proteínas não colagenosas e que regulam tanto a promoção quanto a supressão da proliferação celular¹³⁰, demonstrando um possível potencial do ácido fólico como agente modulador de metilação do DNA podendo influenciar e contribuir para a inflamação e dano tecidual. Por outro lado, a maioria das CpGs com níveis de metilação modificados após o tratamento foram diferentes quando considerado o estado nutricional. Foi observado um padrão distinto de metilação entre as culturas peso adequado e obesidade. As vias metabólicas identificadas na análise de enriquecimento nas culturas peso adequado mostraram-se mais relacionadas aos mecanismos do LES, enquanto nas culturas obesidade, as vias metabólicas estavam mais ligadas aos distúrbios metabólicos decorrentes desse estado nutricional. Dessa forma, os resultados do presente estudo sugerem que apesar dos genes alvo relacionados ao LES (*STAT3* e *CREM2*) não tenham se apresentado menos expressos após o tratamento quando comparadas as culturas controle e tratamento, quando comparados os dois estados nutricionais após o tratamento foi observado que a obesidade possui um papel diferencial nos desfechos da suplementação quando ao direcionamento de novos padrões de metilação do DNA.

Uma segunda análise realizada a partir da comparação das culturas peso adequado controle X obesidade controle e peso adequado tratamento X obesidade tratamento com o intuito de verificar exatamente o oposto da primeira, revelou em intersecção 826 regiões CpGDMs, que eram e continuaram diferencialmente metiladas entre os grupos peso adequado e obesidade independentemente do tratamento com ácido fólico. Tais CpGs foram correlacionadas com diversas vias já citadas nesta discussão como doença autoimune da tireoide, cardiomiopatia dilatada, DM1, doença enxerto-contrá-hospedeiro e rejeição de alógrafo. Especula-se que estas regiões sejam representativas da obesidade *per se* e da diferença do perfil de metilação entre os grupos.

Dados que apontam para variáveis as quais podem e devem ser exploradas em futuros experimentos, como tempo de tratamento e dosagem do mesmo, uma vez que no presente estudo foram realizadas culturas por 48h com doses iguais de ácido fólico e que não há como afirmarmos quais seriam os efeitos do tratamento em doses menores ou maiores e com tempos variados de ação, uma vez que a dose e o tempo de suplementação poderiam gerar resultados diferentes^{90,124,170,171}. Destaca-se ainda o papel do estado nutricional e metabólico uma vez que os resultados obtidos sugerem que ainda que o LES gere um estado inflamatório importante e constante, a obesidade se sobressai como fator agravante da doença e da inflamação generalizada.

Ressalta-se que as divergências de resultados encontrados em relação ao efeito do ácido fólico decorre da heterogeneidade dos estudos, visto que os estudos citados e pré-existentes em literatura foram conduzidos em diferentes linhagens celulares, com tempos e doses de tratamento divergentes entre si, e que estas variáveis podem interferir e interagir de maneiras diferentes com os resultados dos estudos. De maneira geral, acredita-se que os achados do presente estudo contribuem tanto de forma exploratória como de forma específica para a importância das pesquisas epigenéticas a respeito de doenças autoimunes bem como para o potencial da medicina personalizada e dos tratamentos baseados em nutrientes doadores de metil.

Quadro 9 - Resumo dos resultados obtidos de metilação do DNA e expressão gênica de cada comparação realizada no presente estudo.

<p>Peso adequado X Obesidade (Controles)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Metilação do DNA: hipometilação da cultura obesidade; • Vias hipometiladas: DM1, doença autoimune da tireoide e via de adesão celular; • Vias hipermetiladas: AMPK; • Expressão gênica: <i>ADIPOQ</i>, <i>IL-6</i>, <i>LEP</i> e <i>STAT3</i> mais expressos na cultura obesidade; • <i>DNMT1</i> e <i>CREM2</i> sem alteração de expressão.
<p>Peso adequado (Controle X Tratamento)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Metilação do DNA: hipometilação da cultura tratamento; • Vias hipometiladas: diferenciação de Th1 e Th2; • Vias hipermetiladas: MAPK; • Expressão gênica: <i>CREM2</i>, <i>STAT3</i>, <i>IL-6</i> e <i>DNMT1</i> mais expressos após tratamento; • <i>LEP</i>, <i>ADIPOQ</i> sem alteração de expressão.
<p>Obesidade (Controle X Tratamento)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Metilação do DNA: hipermetilação da cultura tratamento; • Vias hipometiladas: cAMP; • Vias hipermetiladas: NOTCH; • Expressão gênica: <i>ADIPOQ</i>, <i>LEP</i>, <i>CREM2</i> e <i>STAT3</i> mais expressos após tratamento; • <i>DNMT1</i> e <i>IL-6</i>, sem alteração de expressão.
<p>Peso adequado X Obesidade (após tratamento)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Metilação do DNA: hipometilação da cultura obesidade; • Vias hipometiladas: sinapse serotoninérgica • Vias hipermetiladas: via da ocitocina • Expressão gênica: <i>ADIPOQ</i>, <i>IL-6</i> e <i>LEP</i> mais expressos na cultura obesidade; • <i>DNMT1</i>, <i>CREM2</i> e <i>STAT3</i> sem alteração de expressão na cultura obesidade.

Fonte: O autor.

Conclusão

7. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que o tratamento *in vitro* com ácido fólico por 48 horas foi capaz de alterar o perfil de metilação do DNA nas culturas celulares de adipócitos representativas do ambiente LES e que esse efeito foi diferente em relação a presença da obesidade associada ao LES. O perfil de metilação mostrou-se diferente entre as culturas representativas de LES e peso adequado e LES e obesidade e foi observado que o tratamento modifica os níveis de metilação de distintas CpGs localizadas em genes associados a diversas vias metabólicas tanto na cultura peso adequado, quanto na cultura obesidade. Assim, pôde ser observado que o tratamento com ácido fólico interagiu de maneira diferente nos grupos em relação ao estado nutricional, evidenciando o papel da obesidade como agravante da inflamação.

No que diz respeito à expressão gênica, os genes *ADIPOQ*, *IL-6* e *LEP* estiveram mais expressos na cultura obesidade em relação a cultura peso adequado em ambos os períodos (antes e após o tratamento). Ainda a suplementação aumentou os níveis de expressão do gene *STAT3* em ambas cultura obesidade e peso adequado. Após o tratamento, a expressão de *CREM2* aumentou tanto na cultura peso adequado quanto na cultura obesidade. O tratamento com ácido fólico elevou os níveis de expressão do gene *IL-6* na cultura peso adequado.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kono M, Nagafuchi Y, Shoda H, Fujio K. The impact of obesity and a high-fat diet on clinical and immunological features in systemic lupus erythematosus [Internet]. Vol. 13, *Nutrients*. MDPI AG; 2021 [citado 14 de janeiro de 2024]. p. 1–12. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33557015/>
2. Morand EF, Fernandez-Ruiz R, Blazer A, Niewold TB. Advances in the management of systemic lupus erythematosus. *BMJ*. 26 de outubro de 2023; e073980.
3. Montoya T, Castejón ML, Muñoz-García R, Alarcón-De-La-Lastra C. Epigenetic linkage of systemic lupus erythematosus and nutrition [Internet]. Vol. 36, *Nutrition Research Reviews*. Cambridge University Press; 2023 [citado 14 de janeiro de 2024]. p. 39–59. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34392862/>
4. Zhou HY, Luo Q, Sui H, Du XN, Zhao YJ, Liu L, et al. Recent advances in the involvement of epigenetics in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. [Internet]. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*. 2023. p. 109857. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/38043757>
5. Araki Y, Mimura T. Epigenetic Dysregulation in the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus. *Int J Mol Sci*. 13 de janeiro de 2024;25(2):1019.
6. Barreto G, Schäfer A, Marhold J, Stach D, Swaminathan SK, Handa V, et al. Gadd45a promotes epigenetic gene activation by repair-mediated DNA demethylation. *Nature*. 31 de fevereiro de 2007;445(7128):671–5.
7. Hedrich CM, Tsokos GC. Epigenetic mechanisms in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases [Internet]. Vol. 17, *Trends in Molecular Medicine*. 2011 [citado 14 de janeiro de 2024]. p. 714–24. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21885342/>
8. García-Gómez E, Gómez-Viais YI, Cruz-Aranda MM, Martínez-Razo LD, Reyes-Mayoral C, Ibarra-González L, et al. The Effect of Metformin and Carbohydrate-Controlled Diet on DNA Methylation and Gene Expression in the Endometrium of Women with Polycystic Ovary Syndrome. *Int J Mol Sci*. 6 de abril de 2023;24(7):6857.
9. Peixoto P, Cartron PF, Serandour AA, Hervouet E. From 1957 to nowadays: A brief history of epigenetics [Internet]. Vol. 21, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2020 [citado 14 de janeiro de 2024]. p. 1–18. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33066397/>
10. Surace AEA, Hedrich CM. The role of epigenetics in autoimmune/inflammatory disease [Internet]. Vol. 10, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2019 [citado 14 de janeiro de 2024]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6620790/>
11. Jiang Y hui, Bressler J, Beaudet AL. EPIGENETICS AND HUMAN DISEASE. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 22 de setembro de 2004;5(1):479–510.
12. Gibson F, Hanly A, Grbic N, Grunberg N, Wu M, Collard M, et al. Epigenetic Dysregulation in Autoimmune and Inflammatory Skin Diseases. *Clin Rev Allergy Immunol*. 8 de novembro de 2022;63(3):447–71.

13. Niculescu MD, Zeisel SH. Trans-HHS Workshop: Diet, DNA Methylation Processes and Health Diet, Methyl Donors and DNA Methylation: Interactions between Dietary Folate [Internet]. Vol. 132, *J. Nutr.* 2002. Disponível em: <https://academic.oup.com/jn/article-abstract/132/8/2333S/4687556>
14. Ly A, Hoyt L, Crowell J, Kim YI. Folate and DNA methylation [Internet]. Vol. 17, *Antioxidants and Redox Signaling*. 2012 [citado 14 de janeiro de 2024]. p. 302–26. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3262611/>
15. da Mota JCNL, Ribeiro AA, Carvalho LM, Esteves GP, Sieczkowska SM, Goessler KF, et al. Impact of Methyl-Donor Micronutrient Supplementation on DNA Methylation Patterns: A Systematic Review and Meta-Analysis of in vitro, animal, and Human Studies [Internet]. *Lifestyle Genomics*. S. Karger AG; 2023 [citado 14 de janeiro de 2024]. p. 192–213. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37935134/>
16. Nikolova-Ganeva K, Tchorbanov A. Folic acid in systemic lupus erythematosus – a new aspect [Internet]. Vol. 42, *Clinical Rheumatology*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2023 [citado 14 de janeiro de 2024]. p. 1729–30. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37106121/>
17. Versini M, Jeandel PY, Rosenthal E, Shoenfeld Y. Obesity in autoimmune diseases: Not a passive bystander [Internet]. Vol. 13, *Autoimmunity Reviews*. Elsevier B.V.; 2014 [citado 14 de dezembro de 2023]. p. 981–1000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25092612/>
18. Oeser A, Chung CP, Asanuma Y, Avalos I, Stein CM. Obesity is an independent contributor to functional capacity and inflammation in systemic lupus erythematosus [Internet]. Vol. 52, *Arthritis and Rheumatism*. 2005 [citado 14 de janeiro de 2024]. p. 3651–9. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/art.21400>
19. Borges MC, dos Santos F de MM, Telles RW, Lanna CCD, Correia MITD. Nutritional status and food intake in patients with systemic lupus erythematosus [Internet]. Vol. 28, *Nutrition*. 2012 [citado 14 de janeiro de 2024]. p. 1098–103. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0899900712000500?via%3Dihub>
20. Teh P, Zakhary B, Sandhu VK. The impact of obesity on SLE disease activity: findings from the Southern California Lupus Registry (SCOLR) [Internet]. Vol. 38, *Clinical Rheumatology*. Springer London; 2019 [citado 14 de janeiro de 2024]. p. 597–600. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10067-018-4336-3>
21. 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 Med.* junho de 2020;
22. Saúde M da. PORTARIA CONJUNTA N°21, de 01 de NOVEMBRO de 2022 - Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas do Lúpus Eritematoso Sistêmico. 2022; Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/pcdt>,
23. Lazar S, Kahlenberg JM. Systemic Lupus Erythematosus: New Diagnostic and Therapeutic Approaches. *Annu Rev Med.* 27 de janeiro de 2023;74(1):339–52.
24. KOYAMA RVL, YOSHIKAWA GT, AMARAL JLA do. *Manual de Reumatologia*. Belém: UEPA - EDUEPA; 2022.

25. Sociedade Brasileira de Reumatologia. Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) [Internet]. 2022 [citado 14 de janeiro de 2024]. Disponível em: <https://www.reumatologia.org.br/doencas-reumaticas/lupus-eritematoso-sistemico-les/>
26. Tian J, Zhang D, Yao X, Huang Y, Lu Q. Global epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comprehensive systematic analysis and modelling study. *Ann Rheum Dis.* março de 2023;82(3):351–6.
27. SAÚDE M, SEIDIGI. DATASUS [Internet]. 2024 [citado 21 de abril de 2024]. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obt10uf.def>
28. Vasconcelos JTS. Livro Da Sociedade Brasileira De Reumatologia. 1 ed. Barueri; 2019.
29. Kiriakidou M, Ching CL. Systemic Lupus Erythematosus [Internet]. Vol. 18, *Annals of Internal Medicine. Indian Journal of Practical Pediatrics*; 2020 [citado 14 de janeiro de 2024]. Disponível em: https://www.acpjournals.org/doi/10.7326/AITC202006020?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed
30. Quiroz EN, Chavez-Estrada V, Macias-Ochoa K, Ayala-Navarro MF, Flores-Aguilar AS, Morales-Navarrete F, et al. Epigenetic mechanisms and posttranslational modifications in systemic lupus erythematosus [Internet]. Vol. 20, *International Journal of Molecular Sciences.* MDPI AG; 2019 [citado 14 de janeiro de 2024]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6888206/>
31. Durcan L, O'Dwyer T, Petri M. Management strategies and future directions for systemic lupus erythematosus in adults [Internet]. Vol. 393, *The Lancet.* Lancet Publishing Group; 2019 [citado 14 de janeiro de 2024]. p. 2332–43. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31180030/>
32. Uribe AG, Vilá LM, Mcgwin G, Sanchez ML, Reveille JD, Alarcón GS. The Systemic Lupus Activity Measure-Revised, the Mexican Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI), and a Modified SLEDAI-2K Are Adequate Instruments to Measure Disease Activity in Systemic Lupus Erythematosus [Internet]. Vol. 31, *The Journal of Rheumatology.* 2004. Disponível em: www.jrheum.org
33. Fanouriakis A, Kostopoulou M, Andersen J, Aringer M, Arnaud L, Bae SC, et al. EULAR recommendations for the management of systemic lupus erythematosus: 2023 update [Internet]. *Annals of Rheumatic Diseases.* BMJ Publishing Group; 2023 [citado 14 de janeiro de 2024]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37827694/#:~:text=Advice%20is%20also%20provided%20on,for%20flares%20and%20retinal%20toxicity.>
34. Faria BA, Silva SM, Theresa M, Abreu CL, Napimoga MH. Ação dos linfócitos T regulatórios em transplantes [Internet]. Vol. 30, *Rev. bras. hematol. hemoter.* 2008 [citado 14 de janeiro de 2024]. p. 309–15. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbhh/a/kCT99rt8WPZ87gb7ZQfWVmv/>
35. Wei X, Niu X. T follicular helper cells in autoimmune diseases [Internet]. Vol. 134, *Journal of Autoimmunity.* Academic Press; 2023 [citado 14 de janeiro de 2024]. Disponível em: [https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36525939/#:~:text=With%20the%20ability%20to%20promote,syndrome%20\(pSS\)%2C%20etc.](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36525939/#:~:text=With%20the%20ability%20to%20promote,syndrome%20(pSS)%2C%20etc.)

36. Alonso GT, Fomin DS, Rizzo LV. Human follicular helper T lymphocytes critical players in antibody responses. *Einstein (São Paulo)*. 25 de fevereiro de 2021;19.
37. Xu WD, Zhang YJ, Wang W, Li R, Pan HF, Ye DQ. Role of CREM in systemic lupus erythematosus [Internet]. Vol. 276, *Cellular Immunology*. 2012 [citado 14 de janeiro de 2024]. p. 10–5. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0008874912000810?via%3Dihub>
38. Goropevšek A, Holcar M, Avčin T. The Role of STAT Signaling Pathways in the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus. *Clin Rev Allergy Immunol*. 23 de abril de 2017;52(2):164–81.
39. Banerjee S, Biehl A, Gadina M, Hasni S, Schwartz DM. JAK–STAT Signaling as a Target for Inflammatory and Autoimmune Diseases: Current and Future Prospects [Internet]. Vol. 77, *Drugs*. Springer International Publishing; 2017 [citado 14 de janeiro de 2024]. p. 521–46. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28255960/>
40. Chen SY, Liu MF, Kuo PY, Wang CR. Upregulated expression of STAT3/IL-17 in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol*. 15 de maio de 2019;38(5):1361–6.
41. Harada T, Kyttaris V, Li Y, Juang YT, Wang Y, Tsokos GC. Increased expression of STAT3 in SLE T cells contributes to enhanced chemokine-mediated cell migration. *Autoimmunity*. 7 de janeiro de 2007;40(1):1–8.
42. Durant L, Watford WT, Ramos HL, Laurence A, Vahedi G, Wei L, et al. Diverse Targets of the Transcription Factor STAT3 Contribute to T Cell Pathogenicity and Homeostasis. *Immunity*. maio de 2010;32(5):605–15.
43. Liu X, Lee YS, Yu CR, Egwuagu CE. Loss of STAT3 in CD4+ T Cells Prevents Development of Experimental Autoimmune Diseases. *The Journal of Immunology*. 1º de maio de 2008;180(9):6070–6.
44. Thomas R, Klaus T. The role of cAMP dependent gene transcription in lupus pathophysiology. *Clinical Immunology*. maio de 2024; 262:110179.
45. Yougbare I. Alterations of cAMP/cGMP Signaling Pathways in Lupus Nephritis. *Journal of Nephrological Science*. 8 de junho de 2021;3(2):8–12.
46. Lamas M. CREM: A master-switch in the transcriptional response to cAMP [Internet]. Vol. 351, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. Royal Society; 1996 [citado 14 de janeiro de 2024]. p. 561–7. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/56312#:~:text=The%20CRE%20germ%20cells%20is,in%20the%20reg%20meiotic%20genes.&text=functions%20as%20a%20powerful%20repressor,constituting%20a%20negative%20autoregulatory%20loop>.
47. SAÚDE M DA. PORTARIA SCTIE/MS Nº 53, DE 11 DE NOVEMBRO DE 2020 - Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas de Sobrepeso e Obesidade em Adultos [Internet]. 2020 [citado 14 de janeiro de 2024]. Disponível em: https://www.gov.br/conitec/pt-br/midias/protocolos/20201113_pcdt_sobrepeso_e_obesidade_em_adultos_29_10_2020_final.pdf

48. Tutor AW, Lavie CJ, Kachur S, Milani R V., Ventura HO. Updates on obesity and the obesity paradox in cardiovascular diseases. *Prog Cardiovasc Dis.* maio de 2023; 78:2–10.
49. OMS. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. Vol. 894, World Health Organization technical report series. 2000. p. i–xii, 1–253.
50. ABESO. POSICIONAMENTO SOBRE O TRATAMENTO NUTRICIONAL DO SOBREPESO E DA OBESIDADE [Internet]. 1º ed. 2022 [citado 14 de janeiro de 2024]. Disponível em: https://abeso.org.br/wp-content/uploads/2022/11/posicionamento_2022-alterado-nov-22-1.pdf
51. Lobstein T, Jackson-Leach R, Powis J, Brinsden H, Gray M. World Obesity Atlas 2023 [Internet]. Londres: World Obesity Federation; 2023 [citado 14 de janeiro de 2024]. Disponível em: <https://www.johnclarksondesign.co.uk/wof-atlast>
52. Saúde M DA. VIGITEL BRASIL 2023 [Internet]. 2023. Disponível em: www.saude.gov.br/svs
53. Zhang X, Ha S, Lau HCH, Yu J. Excess body weight: Novel insights into its roles in obesity comorbidities. *Semin Cancer Biol.* julho de 2023; 92:16–27.
54. Mancini MC. Tratado de Obesidade - Marcio Mancini. 2ed ed. Guanabara Koogan LTDA.; 2017. 700–720 p.
55. Perdomo CM, Cohen R V, Sumithran P, Clément K, Frühbeck G. Contemporary medical, device, and surgical therapies for obesity in adults. *The Lancet.* abril de 2023;401(10382):1116–30.
56. Chait A, den Hartigh LJ. Adipose Tissue Distribution, Inflammation and Its Metabolic Consequences, Including Diabetes and Cardiovascular Disease [Internet]. Vol. 7, *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. Frontiers Media S.A.; 2020 [citado 14 de janeiro de 2024]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32158768/>
57. Frigolet ME, Aguilar RG. Los colores del tejido adiposo [Internet]. *Gaceta Médica de México*. 2020 [citado 14 de janeiro de 2024]. p. 143–50. Disponível em: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0016-38132020000200143
58. Reyes-Farias M, Fos-Domenech J, Serra D, Herrero L, Sánchez-Infantes D. White adipose tissue dysfunction in obesity and aging. *Biochem Pharmacol.* outubro de 2021; 192:114723.
59. Junqueira LCU, Carneiro J. *Histologia Básica, Texto e Atlas*. 12º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2013.
60. Santillana N, Astudillo-Guerrero C, D’Espessailles A, Cruz G. White Adipose Tissue Dysfunction: Pathophysiology and Emergent Measurements. *Nutrients*. 31 de março de 2023;15(7):1722.
61. Auger C, Kajimura S. Adipose Tissue Remodeling in Pathophysiology. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 24 de janeiro de 2023;18(1):71–93.
62. Kawai T, Autieri M V., Scalia R. Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity [Internet]. Vol. 320, *American Journal of Physiology - Cell Physiology*.

- American Physiological Society; 2021 [citado 14 de janeiro de 2024]. p. C375–91. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8294624/>
63. Ghesmati Z, Rashid M, Fayezi S, Gieseler F, Alizadeh E, Darabi M. An update on the secretory functions of brown, white, and beige adipose tissue: Towards therapeutic applications. *Rev Endocr Metab Disord*. 5 de abril de 2024;25(2):279–308.
 64. Kuryłowicz AE. Adipose tissue as a cause of endocrine dysfunction. *Endokrynol Pol*. 30 de outubro de 2023;74(5):468–79.
 65. Lacerda MS, Malheiros GC, Abreu A de OW. TECIDO ADIPOSEO, UMA NOVA VISÃO: AS ADIPOCINAS E SEU PAPEL ENDÓCRINO / ADIPOSEO [Internet]. Vol. 11, *Revista Científica da FMC*. 2016 [citado 14 de janeiro de 2024]. Disponível em: <https://revista.fmc.br/ojs/index.php/RCFMC/article/view/6>
 66. Zhao S, Kusminski CM, Scherer PE. Adiponectin, Leptin and Cardiovascular Disorders. *Circ Res*. 8 de janeiro de 2021;128(1):136–49.
 67. Fang H, Judd RL. Adiponectin Regulation and Function. Em: *Comprehensive Physiology*. Wiley; 2018. p. 1031–63.
 68. Oliveira CBC de, Brito LA, Freitas MA, Souza MPA de, Rêgo JM da C, Machado RJ de A. Obesidade: inflamação e compostos bioativos [Internet]. Vol. 8, *Journal of Health & Biological Sciences*. Instituto para o Desenvolvimento da Educacao; 2020 [citado 14 de janeiro de 2024]. p. 1–5. Disponível em: <https://docs.bvsalud.org/biblioref/2020/06/1100088/2785-publicado.pdf>
 69. Barbosa PH, Carneiro F, Martelli A, Trigo EL. Via de sinalização do Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), síntese e liberação no exercício físico. *ARCHIVES OF HEALTH INVESTIGATION*. 10 de abril de 2018;7(3).
 70. Luiz Do Prado W, Lofrano MC, Oyama LM, Dâmaso AR. Artigo de revisão Obesidade e Adipocinas Inflamatórias: Implicações Práticas para a Prescrição de Exercício Obesity and Inflammatory Adipokines: Practical Implications for Exercise Prescription Endereço para correspondência. Vol. 15, *Rev Bras Med Esporte*. 2009.
 71. Esteves D, Guimarães D, Lúcia De Carvalho Sardinha F, De D, Mizurini M. Adipokines: a new view of adipose tissue [Internet]. Vol. 20, *ADIPOCOTOCINAS* | 549 *Rev. Nutr*. 2007 [citado 14 de janeiro de 2024]. p. 549–59. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rn/a/7RrBzWMZF4WKpZJwRYV83Bj/?format=pdf>
 72. Oliveira CBC de, Brito LA, Freitas MA, Souza MPA de, Rêgo JM da C, Machado RJ de A. Obesidade: inflamação e compostos bioativos. *Journal of Health & Biological Sciences*. 3 de janeiro de 2020;8(1):1–5.
 73. Chylikova J, Dvorackova J, Tauber Z, Kamarad V. M1/M2 macrophage polarization in human obese adipose tissue [Internet]. Vol. 162, *Biomedical Papers*. PALACKY UNIV; 2018 [citado 14 de janeiro de 2024]. p. 79–82. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29765169/>
 74. Luiz Do Prado W, Lofrano MC, Oyama LM, Dâmaso AR. Artigo de revisão Obesidade e Adipocinas Inflamatórias: Implicações Práticas para a Prescrição de Exercício Obesity and Inflammatory Adipokines: Practical Implications for Exercise Prescription Endereço para correspondência [Internet]. Vol. 15, *Rev Bras Med Esporte*. 2009 [citado 14 de

- janeiro de 2024]. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbme/a/8Nydb6F3BjyRRsqDDMdm7pD/>
75. Grebenciucova E, VanHaerents S. Interleukin 6: at the interface of human health and disease [Internet]. Vol. 14, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media SA; 2023 [citado 14 de janeiro de 2024]. Disponível em: [https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37841263/#:~:text=Given%20that%20IL%2D6%20is,spectrum%20disorder%20\(NMOSD\)%2C%20rheumatoid](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37841263/#:~:text=Given%20that%20IL%2D6%20is,spectrum%20disorder%20(NMOSD)%2C%20rheumatoid)
 76. Oliboni L, Casarin JN, Chielle EO. Correlação entre a concentração sérica de interleucina-6 (IL-6) e biomarcadores de resistência insulínica em adultos jovens obesos. *Clinical & Biomedical Research*. 2016;36(3):148–55.
 77. Oliveira CBC de, Brito LA, Freitas MA, Souza MPA de, Rêgo JM da C, Machado RJ de A. Obesidade: inflamação e compostos bioativos. *Journal of Health & Biological Sciences*. 3 de janeiro de 2020;8(1):1–5.
 78. Da Silva NI, Sobrinho HM da R, Blanch GT, Cruvinel WM, Gomes CM. Adipocinas e sua relação com a obesidade; *Revista EVS - Revista de Ciências Ambientais e Saúde*. 24 de junho de 2019;46(1).
 79. Li Y. Modern epigenetics methods in biological research [Internet]. Vol. 187, *Methods*. Academic Press Inc.; 2021 [citado 14 de janeiro de 2024]. p. 104–13. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7785612/>
 80. Triantaphyllopoulos KA, Ikononopoulos I, Bannister AJ. Epigenetics and inheritance of phenotype variation in livestock. *Epigenetics Chromatin*. 21 de dezembro de 2016;9(1):31.
 81. Li Y. Advance epigenetics methods in biomedicine [Internet]. Vol. 187, *Methods*. Academic Press Inc.; 2021 [citado 14 de janeiro de 2024]. p. 1–2. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33545312/>
 82. Smith ZD, Meissner A. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat Rev Genet*. 12 de março de 2013;14(3):204–20.
 83. ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J, MORGAN D, RAFF M, ROBERTS K, et al. *Biologia Molecular da Célula*. 6ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2017.
 84. NCBI. 2023.
 85. Hedrich CM, Mäbert K, Rauen T, Tsokos GC. DNA methylation in systemic lupus erythematosus [Internet]. Vol. 9, *Epigenomics*. Future Medicine Ltd.; 2017 [citado 14 de janeiro de 2024]. p. 505–25. Disponível em: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6040049/#:~:text=Global%20DNA%20methylation%20is%20reduced,T%20cells%20\(Table%201\)](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6040049/#:~:text=Global%20DNA%20methylation%20is%20reduced,T%20cells%20(Table%201)).
 86. Moore LD, Le T, Fan G. DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacology*. 11 de janeiro de 2013;38(1):23–38.
 87. Tompkins JD. Discovering DNA Methylation, the History and Future of Writing on DNA. *J Hist Biol*. 14 de outubro de 2022.
 88. National Library of Medicine. PUBMED [Internet]. 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=%28obesity%29+AND+%28lupus%29>

89. Ferreté-Bonastre AG, Cortés-Hernández J, Ballestar E. What can we learn from DNA methylation studies in lupus? [Internet]. Vol. 234, *Clinical Immunology*. Academic Press Inc.; 2022 [citado 14 de janeiro de 2024]. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1521661621002576?via%3Dihub>
90. Ray D, Strickland FM, Richardson BC. Oxidative stress and dietary micronutrient deficiencies contribute to overexpression of epigenetically regulated genes by lupus T cells. *Clinical Immunology*. novembro de 2018; 196:97–102.
91. Hedrich CM, Rauen T, Apostolidis SA, Grammatikos AP, Rodriguez Rodriguez N, Ioannidis C, et al. Stat3 promotes IL-10 expression in lupus T cells through *trans*-activation and chromatin remodeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 16 de setembro de 2014; 111(37):13457–62.
92. Li Y, Zhao M, Yin H, Gao F, Wu X, Luo Y, et al. Overexpression of the growth arrest and DNA damage–induced 45 α gene contributes to autoimmunity by promoting DNA demethylation in lupus T cells. *Arthritis Rheum*. 29 de maio de 2010; 62(5):1438–47.
93. Lu Q, Kaplan M, Ray D, Ray D, Zacharek S, Gutsch D, et al. Demethylation of *ITGAL* (CD11a) regulatory sequences in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 8 de maio de 2002; 46(5):1282–91.
94. Adams DE, Shao WH. Epigenetic Alterations in Immune Cells of Systemic Lupus Erythematosus and Therapeutic Implications [Internet]. Vol. 11, *Cells*. MDPI; 2022 [citado 14 de janeiro de 2024]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8834103/>
95. Deng C, Kaplan MJ, Yang J, Ray D, Zhang Z, McCune WJ, et al. Decreased ras-mitogen-activated protein kinase signaling may cause DNA hypomethylation in T lymphocytes from lupus patients. *Arthritis Rheum*. fevereiro de 2001; 44(2):397–407.
96. Sunahori K, Juang YT, Kyttaris VC, Tsokos GC. Promoter Hypomethylation Results in Increased Expression of Protein Phosphatase 2A in T Cells from Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *The Journal of Immunology*. 1º de abril de 2011; 186(7):4508–17.
97. Sunahori K, Nagpal K, Hedrich CM, Mizui M, Fitzgerald LM, Tsokos GC. The Catalytic Subunit of Protein Phosphatase 2A (PP2Ac) Promotes DNA Hypomethylation by Suppressing the Phosphorylated Mitogen-activated Protein Kinase/Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK) Kinase (MEK)/Phosphorylated ERK/DNMT1 Protein Pathway in T-cells from Controls and Systemic Lupus Erythematosus Patients. *Journal of Biological Chemistry*. julho de 2013; 288(30):21936–44.
98. National Library of Medicine. PUBMED [Internet]. 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=%28epigenetic%29+AND+%28lupus%29&sort=>
99. Chu DT, Bui N Le, Vu Thi H, Nguyen Thi YV. Role of DNA methylation in diabetes and obesity. *Prog Mol Biol Transl Sci* [Internet]. 1º de janeiro de 2023 [citado 14 de janeiro de 2024]; 197:153–70. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1877117323000194?via%3Dihub>
100. Dick KJ, Nelson CP, Tsaprouni L, Sandling JK, Aïssi D, Wahl S, et al. DNA methylation and body-mass index: A genome-wide analysis [Internet]. Vol. 383, *The Lancet*. Lancet

- Publishing Group; 2014 [citado 14 de janeiro de 2024]. p. 1990–8. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24630777/>
101. Ling C, Rönn T. Epigenetics in Human Obesity and Type 2 Diabetes [Internet]. Vol. 29, Cell Metabolism. Cell Press; 2019 [citado 14 de janeiro de 2024]. p. 1028–44. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30982733/>
 102. Do WL, Gohar J, McCullough LE, Galaviz KI, Conneely KN, Narayan KMV. Examining the association between adiposity and DNA methylation: A systematic review and meta-analysis. *Obesity Reviews*. 18 de outubro de 2021;22(10).
 103. Suárez R, Chapela SP, Álvarez-Córdova L, Bautista-Valarezo E, Sarmiento-Andrade Y, Verde L, et al. Epigenetics in Obesity and Diabetes Mellitus: New Insights. *Nutrients*. 4 de fevereiro de 2023;15(4):811.
 104. Kvaløy K, Page CM, Holmen TL. Epigenome-wide methylation differences in a group of lean and obese women – A HUNT Study. *Sci Rep*. 5 de novembro de 2018;8(1):16330.
 105. Li W, Zhang D, Wang W, Wu Y, Mohammadnejad A, Lund J, et al. DNA methylome profiling in identical twin pairs discordant for body mass index. *Int J Obes*. 31 de dezembro de 2019;43(12):2491–9.
 106. Dhana K, Braun KVE, Nano J, Voortman T, Demerath EW, Guan W, et al. An Epigenome-Wide Association Study of Obesity-Related Traits. *Am J Epidemiol*. 1º de agosto de 2018;187(8):1662–9.
 107. Sayols-Baixeras S, Subirana I, Fernández-Sanlés A, Sentí M, Lluís-Ganella C, Marrugat J, et al. DNA methylation and obesity traits: An epigenome-wide association study. The REGICOR study. *Epigenetics*. 3 de outubro de 2017;12(10):909–16.
 108. Rohde K, Keller M, la Cour Poulsen L, Blüher M, Kovacs P, Böttcher Y. Genetics and epigenetics in obesity [Internet]. Vol. 92, *Metabolism: Clinical and Experimental*. W.B. Saunders; 2019 [citado 14 de janeiro de 2024]. p. 37–50. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30399374/>
 109. Ducker GS, Rabinowitz JD. One-Carbon Metabolism in Health and Disease. *Cell Metab*. janeiro de 2017;25(1):27–42.
 110. Clare CE, Brassington AH, Kwong WY, Sinclair KD. One-Carbon Metabolism: Linking Nutritional Biochemistry to Epigenetic Programming of Long-Term Development [Internet]. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-020518->
 111. Anderson OS, Sant KE, Dolinoy DC. Nutrition and epigenetics: An interplay of dietary methyl donors, one-carbon metabolism and DNA methylation [Internet]. Vol. 23, *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2012 [citado 14 de janeiro de 2024]. p. 853–9. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22749138/>
 112. de Oliveira Y, Lima RPA, Luna RCP, Monteiro MGCA, da Silva CSO, do Nascimento RAF, et al. Decrease of the DNA methylation levels of the ADRB3 gene in leukocytes is related with serum folate in eutrophic adults. *J Transl Med*. 5 de dezembro de 2018;16(1):152.
 113. Parrillo L, Spinelli R, Nicolò A, Longo M, Mirra P, Raciti GA, et al. Nutritional Factors, DNA Methylation, and Risk of Type 2 Diabetes and Obesity: Perspectives and Challenges. *Int J Mol Sci*. 19 de junho de 2019;20(12):2983.

114. Huskisson E, Maggini S, Ruf M. The Role of Vitamins and Minerals in Energy Metabolism and Well-Being. *Journal of International Medical Research*. 25 de maio de 2007;35(3):277–89.
115. da Silva RP, Kelly KB, Al Rajabi A, Jacobs RL. Novel insights on interactions between folate and lipid metabolism. *BioFactors*. 6 de maio de 2014;40(3):277–83.
116. Sun Y, Sun M, Liu B, Du Y, Rong S, Xu G, et al. Inverse Association Between Serum Vitamin B12 Concentration and Obesity Among Adults in the United States. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 27 de junho de 2019;10.
117. Duggan SN, Smyth ND, O’Sullivan M, Feehan S, Ridgway PF, Conlon KC. The Prevalence of Malnutrition and Fat-Soluble Vitamin Deficiencies in Chronic Pancreatitis. *Nutrition in Clinical Practice*. 11 de junho de 2014;29(3):348–54.
118. Zhou SS. Vitamin paradox in obesity: Deficiency or excess? *World J Diabetes*. 2015;6(10):1158.
119. Mlodzik-Czyzewska MA, Malinowska AM, Chmurzynska A. Low folate intake and serum levels are associated with higher body mass index and abdominal fat accumulation: a case control study. *Nutr J*. 4 de dezembro de 2020;19(1):53.
120. Price RJ, Lillycrop KA, Burdge GC. Folic acid supplementation in vitro induces cell type-specific changes in BRCA1 and BRCA2 mRNA expression but does not alter DNA methylation of their promoters or DNA repair. *Nutrition Research*. junho de 2015;35(6):532–44.
121. Clark DF, Schmelz R, Rogers N, Smith NE, Shorter KR. Acute high folic acid treatment in SH-SY5Y cells with and without MTHFR function leads to gene expression changes in epigenetic modifying enzymes, changes in epigenetic marks, and changes in dendritic spine densities. *PLoS One*. 7 de janeiro de 2021;16(1): e0245005.
122. Li Y, Feng Q, Guo M, Wang Y, Jiang Y, Xing J. Genome-wide survey reveals dynamic effects of folate supplement on DNA methylation and gene expression during C2C12 differentiation. *Physiol Genomics*. 1º de março de 2018;50(3):158–68.
123. Cui S, Li W, Lv X, Wang P, Gao Y, Huang G. Folic Acid Supplementation Delays Atherosclerotic Lesion Development by Modulating MCP1 and VEGF DNA Methylation Levels In Vivo and In Vitro. *Int J Mol Sci*. 5 de maio de 2017;18(5):990.
124. Nikolova-Ganeva K, Vasilev V, Kerezieva S, Tchorbanov A. Impact of folic acid on regulatory B lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus in vitro. *Int J Rheum Dis*. 17 de fevereiro de 2023;26(2):298–304.
125. Amarasekera M, Martino D, Ashley S, Harb H, Kesper D, Strickland D, et al. Genome-wide DNA methylation profiling identifies a folate-sensitive region of differential methylation upstream of *ZFP57* -imprinting regulator in humans. *The FASEB Journal*. 2 de setembro de 2014;28(9):4068–76.
126. Peres CM, Curi R. *Como Cultivar Células*. 1ª ed. Rio de Janeiro: 2005; 2005.
127. Assenov Y, Müller F, Lutsik P, Walter J, Lengauer T, Bock C. Comprehensive analysis of DNA methylation data with RnBeads. *Nat Methods*. 28 de novembro de 2014;11(11):1138–40.

128. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method [Internet]. Vol. 25, *Methods*. Academic Press Inc.; 2001 [citado 14 de janeiro de 2024]. p. 402–8. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11846609/>
129. Fu WJ, Hu J, Spencer T, Carroll R, Wu G. Statistical models in assessing fold change of gene expression in real-time RT-PCR experiments. *Comput Biol Chem*. fevereiro de 2006;30(1):21–6.
130. NCBI. NCBI [Internet]. 2024 [citado 7 de agosto de 2024]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
131. van Dijk SJ, Molloy PL, Varinli H, Morrison JL, Muhlhausler BS, Buckley M, et al. Epigenetics and human obesity. *Int J Obes*. 25 de janeiro de 2015;39(1):85–97.
132. Ma X, Kang S. Functional Implications of DNA Methylation in Adipose Biology. *Diabetes*. 1º de maio de 2019;68(5):871–8.
133. Wielscher M, Mandaviya PR, Kuehnel B, Joehanes R, Mustafa R, Robinson O, et al. DNA methylation signature of chronic low-grade inflammation and its role in cardio-respiratory diseases. *Nat Commun*. 3 de maio de 2022;13(1):2408.
134. Ramos-Lopez O, Milagro FI, Riezu-Boj JI, Martinez JA. Epigenetic signatures underlying inflammation: an interplay of nutrition, physical activity, metabolic diseases, and environmental factors for personalized nutrition. *Inflammation Research*. 24 de janeiro de 2021;70(1):29–49.
135. Heikkinen A, Bollepalli S, Ollikainen M. The potential of DNA methylation as a biomarker for obesity and smoking. *J Intern Med*. 19 de setembro de 2022;292(3):390–408.
136. Yang X, Wu R, Shan W, Yu L, Xue B, Shi H. DNA Methylation Biphasically Regulates 3T3-L1 Preadipocyte Differentiation. *Molecular Endocrinology*. 1º de junho de 2016;30(6):677–87.
137. Liu S, Si S, Li J, Zhao Y, Yu Q, Xue F. Association between type 1 diabetes and systemic lupus erythematosus: a Mendelian randomization study. *Clin Rheumatol*. 10 de janeiro de 2024;43(1):41–8.
138. Ulf-Møller CJ, Simonsen J, Kyvik KO, Jacobsen S, Frisch M. Family history of systemic lupus erythematosus and risk of autoimmune disease: Nationwide Cohort Study in Denmark 1977–2013. *Rheumatology*. junho de 2017;56(6):957–64.
139. Song R hua, Wang B, Yao Q ming, Li Q, Jia X, Zhang J an. The Impact of Obesity on Thyroid Autoimmunity and Dysfunction: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Immunol*. 1º de outubro de 2019;10.
140. Lau DCW, Dhillon B, Yan H, Szmítko PE, Verma S. Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. maio de 2005;288(5):H2031–41.
141. Christoph MJ, Allison MA, Pankow JS, Decker PA, Kirsch PS, Tsai MY, et al. Impact of adiposity on cellular adhesion: The Multi-Ethnic Study of atherosclerosis (MESA). *Obesity*. 6 de janeiro de 2016;24(1):223–30.

142. Mulhem A, Moulla Y, Klötting N, Ebert T, Tönjes A, Fasshauer M, et al. Circulating cell adhesion molecules in metabolically healthy obesity. *Int J Obes.* 1º de fevereiro de 2021;45(2):331–6.
143. Miller MA, Cappuccio FP. Cellular adhesion molecules and their relationship with measures of obesity and metabolic syndrome in a multiethnic population. *Int J Obes.* 7 de agosto de 2006;30(8):1176–82.
144. Castro ACG, Bizzi MF, Ribeiro-de-Oliveira-Júnior A. Amp- Activated Protein Kinase (Ampk): The Protein Link Between Metabolism and Cancer. *Revista Médica de Minas Gerais.* 2020;30.
145. Day EA, Ford RJ, Steinberg GR. AMPK as a Therapeutic Target for Treating Metabolic Diseases. *Trends in Endocrinology & Metabolism.* agosto de 2017;28(8):545–60.
146. López M. EJE PRIZE 2017: Hypothalamic AMPK: a golden target against obesity? *Eur J Endocrinol.* maio de 2017;176(5):R235–46.
147. King-Himmelreich TS, Schramm S, Wolters MC, Schmetzer J, Möser C V., Knothe C, et al. The impact of endurance exercise on global and AMPK gene-specific DNA methylation. *Biochem Biophys Res Commun.* maio de 2016;474(2):284–90.
148. Steinberg GR, Hardie DG. New insights into activation and function of the AMPK. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 31 de abril de 2023;24(4):255–72.
149. Galic S, Fullerton MD, Schertzer JD, Sikkema S, Marcinko K, Walkley CR, et al. Hematopoietic AMPK β 1 reduces mouse adipose tissue macrophage inflammation and insulin resistance in obesity. *Journal of Clinical Investigation.* 1º de dezembro de 2011;121(12):4903–15.
150. Gauthier MS, O'Brien EL, Bigornia S, Mott M, Cacicedo JM, Xu XJ, et al. Decreased AMP-activated protein kinase activity is associated with increased inflammation in visceral adipose tissue and with whole-body insulin resistance in morbidly obese humans. *Biochem Biophys Res Commun.* janeiro de 2011;404(1):382–7.
151. Kern PA, Ranganathan S, Li C, Wood L, Ranganathan G. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism.* 1º de maio de 2001;280(5):E745–51.
152. Yadav A, Kataria MA, Saini V, Yadav A. Role of leptin and adiponectin in insulin resistance. *Clinica Chimica Acta.* fevereiro de 2013; 417:80–4.
153. Engin A. Adiponectin-Resistance in Obesity. Em 2017. p. 415–41.
154. Mullen KL, Pritchard J, Ritchie I, Snook LA, Chabowski A, Bonen A, et al. Adiponectin resistance precedes the accumulation of skeletal muscle lipids and insulin resistance in high-fat-fed rats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology.* fevereiro de 2009;296(2): R243–51.
155. Park YJ, Lee S, Lim S, Nahmgoong H, Ji Y, Huh JY, et al. DNMT1 maintains metabolic fitness of adipocytes through acting as an epigenetic safeguard of mitochondrial dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 16 de março de 2021;118(11).

156. Hu W, Lv J, Han M, Yang Z, Li T, Jiang S, et al. STAT3: The art of multi-tasking of metabolic and immune functions in obesity. *Prog Lipid Res.* abril de 2018; 70:17–28.
157. Favre D, Le Gouill E, Fahmi D, Verdumo C, Chinetti-Gbaguidi G, Staels B, et al. Impaired Expression of the Inducible cAMP Early Repressor Accounts for Sustained Adipose CREB Activity in Obesity. *Diabetes.* 1º de dezembro de 2011;60(12):3169–74.
158. Cao-Lei L, Dancause KN, Elgbeili G, Massart R, Szyf M, Liu A, et al. DNA methylation mediates the impact of exposure to prenatal maternal stress on BMI and central adiposity in children at age 13½ years: Project Ice Storm. *Epigenetics.* 3 de agosto de 2015;10(8):749–61.
159. Gaspar JM, Velloso LA. Hypoxia Inducible Factor as a Central Regulator of Metabolism – Implications for the Development of Obesity. *Front Neurosci.* 1º de novembro de 2018;12.
160. Cuevas-Sierra A, Ramos-Lopez O, Riezu-Boj JI, Milagro FI, Martinez JA. Diet, Gut Microbiota, and Obesity: Links with Host Genetics and Epigenetics and Potential Applications. *Advances in Nutrition.* janeiro de 2019;10: S17–30.
161. Franco R, Schoneveld O, Georgakilas AG, Panayiotidis MI. Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. *Cancer Lett.* julho de 2008;266(1):6–11.
162. Lim SO, Gu JM, Kim MS, Kim HS, Park YN, Park CK, et al. Epigenetic Changes Induced by Reactive Oxygen Species in Hepatocellular Carcinoma: Methylation of the E-cadherin Promoter. *Gastroenterology.* dezembro de 2008;135(6):2128-2140.e8.
163. Muhammad Yusoff F, Wong KK, Mohd Redzwan N. Th1, Th2, and Th17 cytokines in systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity.* 2 de janeiro de 2020;53(1):8–20.
164. Courtemanche C, Elson-Schwab I, Mashiyama ST, Kerry N, Ames BN. Folate Deficiency Inhibits the Proliferation of Primary Human CD8+ T Lymphocytes In Vitro. *The Journal of Immunology.* 1º de setembro de 2004;173(5):3186–92.
165. Makino E, Fukuyama T, Watanabe Y, Tajiki-Nishino R, Tajima H, Ohnuma-Koyama A, et al. Subacute oral administration of folic acid elicits anti-inflammatory response in a mouse model of allergic dermatitis. *J Nutr Biochem.* maio de 2019; 67:14–9.
166. Braicu C, Buse M, Busuioc C, Drula R, Gulei D, Raduly L, et al. A Comprehensive Review on MAPK: A Promising Therapeutic Target in Cancer. *Cancers (Basel).* 22 de outubro de 2019;11(10):1618.
167. Gorelik G, Richardson B. Key role of ERK pathway signaling in lupus. *Autoimmunity.* 7 de fevereiro de 2010;43(1):17–22.
168. Mavropoulos A, Orfanidou T, Liaskos C, Smyk DS, Billinis C, Blank M, et al. p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK)-mediated autoimmunity: Lessons to learn from ANCA vasculitis and pemphigus vulgaris. *Autoimmun Rev.* março de 2013;12(5):580–90.
169. Garg SK, Kaur G, Haider Z, Rodriguez E, Beatson C, Snell-Bergeon J. Efficacy of Semaglutide in Overweight and Obese Patients with Type 1 Diabetes. *Diabetes Technol Ther.* 1º de março de 2024;26(3):184–9.

170. Li W, Liu H, Yu M, Zhang X, Zhang Y, Liu H, et al. Folic Acid Alters Methylation Profile of JAK-STAT and Long-Term Depression Signaling Pathways in Alzheimer's Disease Models. *Mol Neurobiol*. 1º de novembro de 2016;53(9):6548–56.
171. Gonda TA, Kim Y, Salas MC, Gamble M V., Shibata W, Muthupalani S, et al. Folic Acid Increases Global DNA Methylation and Reduces Inflammation to Prevent Helicobacter-Associated Gastric Cancer in Mice. *Gastroenterology*. abril de 2012;142(4):824-833.e7.
172. Hansen MF, Greibe E, Skovbjerg S, Rohde S, Kristensen ACM, Jensen TR, et al. Folic acid mediates activation of the pro-oncogene STAT3 via the Folate Receptor alpha. *Cell Signal*. julho de 2015;27(7):1356–68.
173. Richardson B. Epigenetically Altered T Cells Contribute to Lupus Flares. *Cells*. 5 de fevereiro de 2019;8(2):127.
174. Jeffries M, Dozmorov M, Tang Y, Merrill JT, Wren JD, Sawalha AH. Genome-wide DNA methylation patterns in CD4+ T cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Epigenetics*. 27 de maio de 2011;6(5):593–601.
175. Zhao M, Li M ying, Gao X fei, Jia S jie, Gao K qin, Zhou Y, et al. Downregulation of BDH2 modulates iron homeostasis and promotes DNA demethylation in CD4 + T cells of systemic lupus erythematosus. *Clinical Immunology*. fevereiro de 2018; 187:113–21.
176. Powell JD, Lerner CG, Ewoldt GR, Schwartz RH. The –180 Site of the IL-2 Promoter Is the Target of CREB/CREM Binding in T Cell Anergy. *The Journal of Immunology*. 15 de dezembro de 1999;163(12):6631–9.
177. Solomou EE, Juang YT, Gourley MF, Kammer GM, Tsokos GC. Molecular Basis of Deficient IL-2 Production in T Cells from Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *The Journal of Immunology*. 15 de março de 2001;166(6):4216–22.
178. Tenbrock K, Juang YT, Gourley MF, Nambiar MP, Tsokos GC. Antisense Cyclic Adenosine 5'-Monophosphate Response Element Modulator Up-Regulates IL-2 in T Cells from Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *The Journal of Immunology*. 15 de outubro de 2002;169(8):4147–52.
179. Juang YT, Rauen T, Wang Y, Ichinose K, Benedyk K, Tenbrock K, et al. Transcriptional Activation of the cAMP-responsive Modulator Promoter in Human T Cells Is Regulated by Protein Phosphatase 2A-mediated Dephosphorylation of SP-1 and Reflects Disease Activity in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Journal of Biological Chemistry*. janeiro de 2011;286(3):1795–801.
180. Qi L, Saberi M, Zmuda E, Wang Y, Altarejos J, Zhang X, et al. Adipocyte CREB Promotes Insulin Resistance in Obesity. *Cell Metab*. março de 2009;9(3):277–86.
181. Rauen T, Grammatikos AP, Hedrich CM, Floege J, Tenbrock K, Ohl K, et al. cAMP-responsive Element Modulator α (CREM α) Contributes to Decreased Notch-1 Expression in T Cells from Patients with Active Systemic Lupus Erythematosus (SLE). *Journal of Biological Chemistry*. dezembro de 2012;287(51):42525–32.
182. Moulton VR, Tsokos GC. T cell signaling abnormalities contribute to aberrant immune cell function and autoimmunity. *Journal of Clinical Investigation*. 1º de junho de 2015;125(6):2220–7.

183. Li W, Tang R, Ma F, Ouyang S, Liu Z, Wu J. Folic acid supplementation alters the DNA methylation profile and improves insulin resistance in high-fat-diet-fed mice. *J Nutr Biochem.* setembro de 2018; 59:76–83.
184. He H, Zhang Y, Sun Y, Zhang Y, Xu J, Yang Y, et al. Folic Acid Attenuates High-Fat Diet-Induced Osteoporosis Through the AMPK Signaling Pathway. *Front Cell Dev Biol.* 3 de janeiro de 2022;9.
185. Asbaghi O, Ashtary-Larky D, Bagheri R, Moosavian SP, Nazarian B, Afrisham R, et al. Effects of Folic Acid Supplementation on Inflammatory Markers: A Grade-Assessed Systematic Review and Dose–Response Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Nutrients.* 6 de julho de 2021;13(7):2327.
186. Laisné M, Gupta N, Kirsh O, Pradhan S, Defossez PA. Mechanisms of DNA Methyltransferase Recruitment in Mammals. *Genes (Basel).* 10 de dezembro de 2018;9(12):617.
187. Bachen EA, Chesney MA, Criswell LA. Prevalence of mood and anxiety disorders in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 15 de junho de 2009;61(6):822–9.
188. Ainiala H, Loukkola J, Peltola J, Korpela M, Hietaharju A. The prevalence of neuropsychiatric syndromes in systemic lupus erythematosus. *Neurology.* 14 de agosto de 2001;57(3):496–500.
189. GRECO CM, LI T, SATTAR A, KAO AH, DANCHENKO N, EDMUNDOWICZ D, et al. Association Between Depression and Vascular Disease in Systemic Lupus Erythematosus. *J Rheumatol.* fevereiro 2012;39(2):262–8.
190. Lisitsyna TA, Vel'tishchev DI, Seravina OF, Kovalevskaia OB, Marchenko AS, Novikova DS, et al. [Prevalence of mental disorders in SLE patients: correlations with the disease activity and comorbid chronic conditions]. *Ter Arkh.* 2009;81(6):10–6.
191. Mok CC, Chan KL, Cheung EFC, Yip PSF. Suicidal ideation in patients with systemic lupus erythematosus: incidence and risk factors. *Rheumatology.* 1º de abril de 2014;53(4):714–21.
192. Xie LF, Chen PL, Pan HF, Tao JH, Li XP, Zhang YJ, et al. Prevalence and correlates of suicidal ideation in SLE inpatients: Chinese experience. *Rheumatol Int.* 27 de setembro de 2012;32(9):2707–14.
193. van Galen KA, ter Horst KW, Booij J, la Fleur SE, Serlie MJ. The role of central dopamine and serotonin in human obesity: lessons learned from molecular neuroimaging studies. *Metabolism.* agosto de 2018; 85:325–39.
194. Fletcher PJ, Burton MJ. Microstructural analysis of the anorectic action of peripherally administered 5-HT. *Pharmacol Biochem Behav.* abril de 1986;24(4):1133–6.
195. Gafoor R, Booth HP, Gulliford MC. Antidepressant utilisation and incidence of weight gain during 10 years' follow-up: population-based cohort study. *BMJ.* 23 de maio de 2018; k1951.
196. Yabut JM, Crane JD, Green AE, Keating DJ, Khan WI, Steinberg GR. Emerging Roles for Serotonin in Regulating Metabolism: New Implications for an Ancient Molecule. *Endocr Rev.* 1º de agosto de 2019;40(4):1092–107.

197. Love TM. Oxytocin, motivation and the role of dopamine. *Pharmacol Biochem Behav.* abril de 2014; 119:49–60.
198. Francelin C, Veneziani LP, Farias A dos S, Mendes-da-Cruz DA, Savino W. Neurotransmitters Modulate Intrathymic T-cell Development. *Front Cell Dev Biol.* 13 de abril de 2021;9.
199. Ding C, Leow MK -S., Magkos F. Oxytocin in metabolic homeostasis: implications for obesity and diabetes management. *Obesity Reviews.* 25 de janeiro de 2019;20(1):22–40.
200. Arletti R, Benelli A, Bertolini A. Influence of oxytocin on feeding behavior in the rat. *Peptides (NY).* janeiro de 1989;10(1):89–93.
201. Ott V, Finlayson G, Lehnert H, Heitmann B, Heinrichs M, Born J, et al. Oxytocin Reduces Reward-Driven Food Intake in Humans. *Diabetes.* 1º de outubro de 2013;62(10):3418–25.